

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FISICA DE SÃO CARLOS

RAFAEL MARQUES DA SILVA

Caracterização estrutural das septinas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)
Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12

São Carlos

2022

RAFAEL MARQUES DA SILVA

Caracterização estrutural das septinas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)
Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Rafael Marques da
Caracterização estrutural das septinas de levedura
(*Saccharomyces cerevisiae*) Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 /
Rafael Marques da Silva; orientador Richard Charles
Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2022.
137 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Septinas. 2. Leveduras. 3. Cristalografia. I.
Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

Aos meus pais, Edgar e Rosangela, por todos os anos dedicados à minha formação, em especial minha mãe, que sempre acreditou no meu potencial e se fez forte quando mais necessário. Amo vocês.

Agradecimentos

Por trás deste trabalho estão anos de dedicação e apoio por parte daqueles que foram meus principais fiadores e maiores fãs, meu pai, Edgar Marques, e minha mãe, Rosângela Massaferrro. Não existem palavras, em nenhum idioma, que possa expressar toda minha gratidão e amor por tudo o que vocês passaram para que eu chegasse onde eu estou.

Ao apoio dos meus irmãos por “segurarem as pontas”, Edgar jr e Eduardo, quando a vida da nossa família atravessou grandes tempestades. Assim como sou grato à minha família: cunhada e sobrinhos, Erika, Kauê e Yasmin, por sempre colocarem um sorriso no meu rosto.

Aos meus amigos, tão presentes na minha vida e com quem eu divido minhas conquistas, Lucas Ribeiro, Ana Aono, Irina, Enzo, Zadora, Aníbal, Gui, Luiza e tantos outros. A amizade de vocês com certeza me deu a calma pra que eu pudesse chegar mais longe. Tão importante quanto os amigos que eu conheci no laboratório, Diego, Fernanda, Adriano, Tchucklin, Leonardo (s), Evandro, Higorzinho, Jakeline, Gabriel Jesus, Nat, Tom e Deborah. Os dias foram melhores ao lado de vocês, sejam pelas piadas, os bares e cafés, as risadas ou os ensinamentos.

Aos técnicos do laboratório, Andressa, Susana, Rafa, Isabel e Humberto. O presente trabalho não seria possível sem toda a paciência, ajuda e questionamentos de vocês. Gostaria principalmente de agradecer os dois últimos, Bel e Tinho, que mais do que parceiros se tornaram amigos com quem foi um privilégio trabalhar.

Ao meu orientador, Richard Garratt, por ter me aceitado e me guiado no início da minha trajetória acadêmica. Espero um dia alcançar todo o amor que o senhor tem tanto pela pesquisa acadêmica como pelas proteínas e pela prática de lecionar. Assistir tuas aulas foi um deleite. Também agradeço aos professores Ana Paula Araújo e Ricardo de Marco (*in memoriam*) pela ajuda e discussões sempre necessárias.

Agradeço à Universidade de São Paulo, pela excelente infraestrutura e quadro técnico, na qual incluo meus agradecimentos ao Instituto de Física de São Carlos.

À FAPESP (processo nº 2018/09687-2) pela bolsa concedida e todo suporte financeiro.

Às agências de pesquisa CAPES e CNPq, pelo financiamento indireto desta pesquisa.

“A sorte favorece a mente bem preparada”

Louis Pasteur

Resumo

SILVA, R.M. **Caracterização estrutural das septinas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12**. 2022. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Septinas são proteínas estruturais que normalmente apresentam atividade GTPásica, desempenhando um papel importante na estrutura da célula e servindo como um arcabouço no recrutamento de proteínas parceiras. Estas proteínas são encontradas nos mais diferentes tipos de forma de vida, como protozoários, fungos e animais. Para realizar suas funções, as diferentes septinas formam filamentos que são estabilizados por interações entre as subunidades através de dois tipos de interface, chamadas de G e NC. Em levedura quatro proteínas se arranjam de modo a formar um octâmero linear, cuja ordem das proteínas é Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. Este octâmero por sua vez se polimeriza através das suas extremidades com outros octâmeros, dando origem a filamentos de maior complexidade. Compreender os mecanismos moleculares exatos que controlam a montagem correta dos filamentos individuais e posteriormente seu empacotamento em estruturas de ordem superior atualmente representa um dos maiores desafios na área de bioquímica de septinas. Das quatro proteínas mencionadas acima, apenas Cdc11 foi cristalizada e teve a estrutura reportada ¹. Porém, os dados relacionados a esta septina são de muito baixa qualidade, onde se observam sérios problemas de ordem estereoquímica, cristalográfica e estatística. Por este motivo, este trabalho buscou redeterminar a estrutura da Cdc11 usando o protocolo da literatura para depois estender os estudos estruturais para outras septinas de levedura. Este trabalho também analisou propriedades biofísicas das quatro proteínas citadas, como estado monomérico em solução, estabilidade térmica, capacidade de ligar-se a nucleotídeo de guanina e também a hidrólise de GTP. Verificou-se que Cdc3 e Cdc11 quando sem a septina parceira são monômeros em solução e são purificados livres de nucleotídeos, diferentemente do que ocorre com Cdc12 que possui tanto GDP quanto GTP em seu interior devido à sua atividade catalítica. Também foi realizada a co-expressão de Cdc3/Cdc10 e Cdc11/Cdc12 que resultou em dímeros que permitiram a purificação de Cdc12 e Cdc10 por meio de SEC. Cristais proteicos foram obtidos para as septinas Cdc11 e complexos Cdc3/Cdc10 e Cdc11/Cdc12, que infelizmente difrataram em baixa resolução (4 – 5 Å) não permitindo a elucidação da estrutura cristalográfica. Em vista dos parâmetros ruins de validação da estrutura depositada de Cdc11, esta proteína foi modelada sozinha, com a sua

parceira Cdc12 via interface G e também com outra cópia de Cdc11 via interface NC, cujos modelos são preferíveis à estrutura depositada.

Palavras chave: Septinas. Leveduras. Cristalografia.

ABSTRACT

SILVA, R. M. **Structural characterization of the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) septins Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12.** 2022. 137 p. Dissertation (Master in Sciences) – São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos 2022.

Septins are structural proteins that normally present GTPase activity, playing an important role in the cell structure and acting as a scaffold in the recruitment of partner proteins. These proteins can be found in the most different living beings, such as protozoan, fungi and animals. In order to do so, different septins organize into heterofilaments that are stabilised by interactions between subunits that show two types of interface, known as G and NC interfaces. In yeast, four proteins are arranged into a linear filament that forms an octamer, which order is Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. This octamer can then polymerize by its extremities, giving birth to more complex and longer filaments. Understanding the exact molecular mechanisms that control the correct polymerization of the individual filaments and their later packing into high order structures is one of the biggest challenges in the area of septins' biochemistry. From the four previous yeast septins cited above, only Cdc11 was crystallized and had a crystal structure reported ¹. However, the data related to this structure shows very poor quality, where serious problems concerning the stereochemical, crystallographic and statistical parameters of this crystal structure can be seen. For this reason, this work sought to re-determine the structure of Cdc11 using the protocol already described in the literature and, subsequently, to extend the structural studies to the other yeast septins. This work also aimed to analyze the biophysical properties of these four septins, such as oligomeric state in solution, thermal stability, their capacity to bind guanine nucleotides and hydrolyse GTP. It could be seen that Cdc3 and Cdc11, when expressed without their septin partner, are monomers in solution and are purified with no bound nucleotides, different than what could be verified concerning Cdc12, which is bound to both GDP and GTP due to its catalytic activity. The co-expression of Cdc3/Cdc10 and Cdc11/Cdc12 resulted in dimers that allowed the purification of Cdc12 and Cdc10 by SEC. Protein crystals were obtained for the septins Cdc11 and the complexes Cdc3/Cdc10 and Cdc11/Cdc12 that unfortunately diffracted at low resolution (4 – 5 Å), not resulting in a crystallographic structure. In view of the poor validation parameters of the crystallographic structure of Cdc11, models for this protein were generated as monomers and dimers, showing

two different interfaces (G and NC) with different partners (Cdc12 and Cdc11), which are preferable than the crystallographic structure of Cdc11.

Keywords: Septins. Yeast. Crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células de levedura mutantes crescidas em temperaturas restritivas.	23
Figura 2 - O arranjo linear de uma septina	25
Figura 3 - Modelo espacial representando um monômero de septina.	26
Figura 4 - Modelo representando a disposição de um filamento de septinas	26
Figura 5 - Eletromicrografia de dois filamentos de septinas de levedura	28
Figura 6 - Estrutura cristalográfica do complexo trimérico formado entre as septinas humanas Sept7-Sept6-Sept2..	29
Figura 7 - Comparação entre os nucleotídeos ATP e GTP.....	31
Figura 8 - Estrutura do NBP de uma septina	32
Figura 9 - Alinhamento englobando os motivos GTPase de septinas humanas (SEPTs) e de leveduras (Cdc).....	34
Figura 10 - Representação de interação antiparalela entre dois monômeros de septinas, via <i>coiled coil</i>	37
Figura 11 - Esquema proposto para a formação de uma malha bidimensional de septinas	38
Figura 12 - Painel de todas as estruturas de septinas existentes até o momento	39
Figura 13 - Estrutura cristalográfica do domínio GTPase da septina humana Sept7	40
Figura 14 - Representação do tipo <i>cartoon</i> das fitas- β em arranjo de cela e das α -hélices do domínio GTPase septina humana Sept7.	41
Figura 15 - Localização das septinas ao longo da divisão celular por brotamento..	42
Figura 16 - Septinas em diferentes células e processos celulares.....	43
Figura 17 - A evolução de septinas e a divergência em cinco grandes grupos.	46
Figura 18 - O octâmero canônico de septinas presentes em leveduras	48

Figura 19 - O protofilamento existente em <i>S. cerevisiae</i>	49
Figura 20 - O octâmero de septinas de leveduras onde Shs1 ocupa o lugar de Cdc11.....	50
Figura 21 - Modelo sobre a montagem passo a passo de dois diferentes octâmeros de septinas em <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 22 - Diferentes octâmeros originam estruturas diversas.....	53
Figura 23 - Estrutura cristalográfica da septina de levedura Cdc11	55
Figura 24 - Comparação entre duas estruturas cristalográficas de septinas.....	56
Figura 25 - Comparação entre parâmetros de validação das estruturas cristalográficas das septinas Cdc11 e Sept10.....	58
Figura 26 - Diferentes métodos usados na separação de proteínas.....	67
Figura 27 - Esquema simplificado de uma espectroscopia de massas em tandem.	69
Figura 28 - Esquema de um aparelho <i>SEC-MALS</i> e seus anexos.	73
Figura 29 - A técnica de Dicroísmo Circular aplicada a proteínas.	75
Figura 30 - Diagrama de fase de cristalização..	78
Figura 31 - Gel SDS-PAGE inicial das septinas Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G).....	82
Figura 32 - Géis de SDS-PAGE das septinas Cdc12(G), Cdc11(G), Cdc3(G) e Cdc10(G) purificada com a adição de ureia 8 M.	83
Figura 33 - Cromatografia <i>SEC</i> das septinas Cdc3(G) e Cdc11(G)	85
Figura 34 - Identificação das septinas por <i>MS/MS</i>	86
Figura 35 - Espectro de CD para a proteína Cdc11(G) em diferentes temperaturas..	88
Figura 36 - Cromatograma dos nucleotídeos liberados das septinas Cdc3(G) e Cdc11(G)	91
Figura 37 - Cromatograma dos nucleotídeos liberados da proteína Cdc12(G).....	93
Figura 38 - Perfil de SEC de Cdc3(G) e Cdc11(G) com curva de calibração (coluna)	94

Figura 39 - Cromatograma da septina Cdc11(G) e Cdc3(G) obtido por SEC-MALS	95
Figura 40 - Fotografias dos cristais das proteínas Cdc11(G),Cdc3(G) e Cdc12(G).....	97
Figura 41 - Geis SDS-PAGE do domínio GTPase das septinas co-expressas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G).	100
Figura 42 - Cromatograma de SEC das septinas co-expressas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)	101
Figura 43 - Gel SDS-PAGE e SEC da septina Cdc11(G)*.	103
Figura 44 - Curva de desnaturação térmica do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G).....	104
Figura 45 - Comparação das curvas desnaturação térmica do monômero Cdc11(G) e do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G).....	105
Figura 46 - Perfil de nucleotídeos extraídos dos complexos de septinas diméricas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)	106
Figura 47 - Cromatograma de SEC-MALS dos dímero Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G).	109
Figura 48 - Cristais proteicos de Cdc3(G)/Cdc10(G), Cdc11(G)* e Cdc11(G).....	111
Figura 49 - Representação do tipo <i>cartoon</i> dos modelos gerados por homologia das septinas Cdc11(G) monomérica, dimérica (interface NC) e heterodimérica (interface G) com a parceira Cdc12(G).	112
Figura 50 - Sobreposição dos Ca da estrutura cristalográfica de Cdc11 com os modelos gerados pelo <i>Modeller</i> e <i>AlphaFold2</i>	115
Figura 51 - Sobreposição da estrutura cristalográfica de Cdc11(G) com os modelos produzidos por <i>Modeller</i> e <i>AlphaFold2</i>	115
Figura 52 - A hélice $\alpha 5'$ de Cdc11(G).....	116
Figura 53 - A estrutura cristalográfica das septinas Sept2 e Sept8 sobreposta com dois modelos heterodiméricos de Cdc11(G)/Cdc12(G).	117
Figura 54 - As orientações das cadeias laterais de Cdc11(G) e Cdc12(G) obtidas a partir do <i>Modeller</i> , <i>AlphaFold2</i> e da estrutura cristalográfica de Sept2/Sept8.....	119

Figura 55 - Caracterização eletrostática da interface G entre as septinas Cdc11 e Cdc12. ...	120
Figura 56 - Perfil eletrostático dos aminoácidos enterrados na interface G entre Sept2/Sept8 e Cdc11/Cdc12.....	121
Figura 57 - A interação da hélice $\alpha 4$ de Cdc11 com o <i>Switch I</i> de Cdc12.....	123
Figura 58 - A interface NC de septinas 6 e 7 e do modelo Cdc11(G)/Cdc11(G) produzido por homologia.	126
Figura 59 - Representação das superfícies dos dímeros Sept6/Sept7 e do modelo Cdc11/Cdc11.....	127
Figura 60 - Perfil eletrostático dos resíduos encontrados na interface NC entre as septinas humanas Sept6 e Sept7 e do modelo Cdc11/Cdc11	128
Figura 61 - Cavidade básica do modelo de dímero entre duas septinas de levedura (Cdc11) via interface NC.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Novos motivos do domínio GTPase de septinas.....	35
Tabela 2 - Classificação das septinas de levedura.....	48
Tabela 3 - Construções de septinas utilizadas neste trabalho.....	62
Tabela 4 - As soluções utilizadas no processo de competência celular.....	64
Tabela 5 - Tampão para lise celular.....	66
Tabela 6 - Tampão utilizado no experimento de dicroísmo circular.....	76
Tabela 7 - Condições de cristalização das septinas Cdc11(G), Cdc3(G) e Cdc12(G).	96
Tabela 8 - Condições de cristalização das septinas Cdc11(G)* e Cdc3(G)/Cdc12(G).	110
Tabela 9 - Parâmetros de validação dos modelos gerados por <i>Modeller</i> de acordo com os programas <i>Errat</i> , <i>Verify3D</i> , <i>Prove</i> , <i>Whatcheck</i> e <i>Procheck</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF - AlphaFold2

CD - Circular Dichroism

CDC - Cell Division Cycle

CDK - Cyclin Dependent Kinase

DLS - Dynamic Light Scattering

DLS - Diamond Light Source

dRI – Differential Refractive Index

GDP - Guanosina Difosfato

GTP - Guanosina Trifosfato

HPLC - High performance liquid chromatography

IMAC - Immobilized Metal Affinity Chromatography

LB - Liquid Broth

LCP - Left Circularly Polarized Light

LS - Light Scattering

MALS - Multiangle Light Scattering

MOD - Modeller

MS - Mass Spectrometry

NBP - Nucleotide Binding Pocket

PAE - Predicted Aligned Error

PDB - Protein Data Bank

RCP - Right Circularly Polarized Light

SEC - Size Exclusion Chromatography

SUE - Septin Unique Element

T_m - Temperatura de Melting

SUMÁRIO

1	Introdução	23
1.1	<u>A descoberta das septinas</u>	23
1.2	<u>Estrutura das septinas</u>	24
1.2.1	<u>Diferentes domínios e interfaces</u>	24
1.2.2	<u>Motivos estruturais</u>	28
1.2.3	<u>Estruturas secundárias e terciárias</u>	39
1.2.4	<u>Funções das septinas</u>	42
1.3	<u>Septinas: relações evolutivas</u>	44
1.4	<u>As septinas de levedura e a formação do filamento</u>	47
1.5	<u>A estrutura cristalográfica de Cdc11</u>	54
2	Objetivos	59
2.1	<u>Objetivos gerais</u>	59
2.2	<u>Objetivos específicos</u>	59
3	Metodologia	61
3.1	<u>Escolha dos alvos</u>	61
3.2	<u>Produção de células competentes</u>	63
3.3	<u>Transformação</u>	64
3.4	<u>Expressão e purificação</u>	65
3.5	<u>Espectrometria de Massas</u>	67
3.6	<u>Estado oligomérico</u>	71
3.7	<u>Dicroísmo Circular (CD)</u>	74
3.8	<u>Ensaio de nucleotídeo</u>	76
3.9	<u>Ensaio de cristalização</u>	77
3.10	<u>Modelagens por homologia</u>	80
4	Resultados e Discussão	81
4.1	<u>A expressão heteróloga de Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G)</u>	81
4.1.1	<u>Identificação por meio de espectrometria de massas em tandem (MS/MS)</u>	85
4.1.2	<u>Dicroísmo Circular (CD)</u>	87
4.1.3	<u>Ensaio de nucleotídeo</u>	90
4.1.4	<u>Estado oligomérico</u>	93
4.1.5	<u>Ensaio de cristalização</u>	95

4.2	<u>As co-expressões de Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)</u>	98
4.2.1	<u>Dicroísmo circular (CD)</u>	103
4.2.2	<u>Ensaio de nucleotídeo</u>	105
4.2.3	<u>Estado oligomérico</u>	107
4.2.4	<u>Ensaio de cristalização e difração de raios-x</u>	109
4.2.5	<u>Os modelos de Cdc11(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)</u>	112
4.2.5.1	<u>Cdc11(G) e sua interação via interface G com Cdc12(G)</u>	112
4.2.5.2	<u>Cdc11 e sua interação via interface NC</u>	124
5	<u>Conclusão</u>	131
	<u>Referências</u>	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 A descoberta das septinas

Septinas são proteínas estruturais globulares capazes de interagir entre si para formar longos filamentos intracelulares não polares,² Por conta desta propriedade, elas são muitas vezes referenciadas como o quarto componente do citoesqueleto.

A descoberta deste grupo de proteínas data de 1971, quando Leland Hartwell descreveu pela primeira vez células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) cuja divisão celular era incompleta. As células em questão, sensíveis a temperaturas mais altas, apresentavam um fenótipo aberrante decorrente de genes mutantes, cuja morfologia convencional esférica era substituída por outra alongada, onde as células não se separavam ao término da mitose (Figura 1)³. As proteínas oriundas desses mutantes receberam inicialmente os nomes de Cdc(s), em associação a um número.



Figura 1 - Células de levedura mutantes crescidas em temperaturas restritivas.

Fonte: HARTWELL.³

Embora o nome septina (do inglês, *septin*) esteja atualmente bem definido entre os pesquisadores desta área, este foi cunhado muito depois da descoberta feita por Hartwell, mais precisamente em 1994.⁴ Pode se dizer que as septinas datam de estudos moleculares mais incisivos sobre a maquinaria da divisão celular, que começaram a responder algumas perguntas a partir de 1970.⁵ Quando muito pouco era sabido acerca dos mecanismos que

envolviam o controle da divisão celular, uma grande quantidade de genes foi chamada de *CDCs* (*Cell Division Cycle*) por participarem de alguma maneira ainda não conhecida do processo mitótico. Assim sendo, proteínas de funções muito distintas codificadas por esses genes foram agrupadas sob a mesma categoria. Muitas quinases dependentes de ciclina (*CDKs*), proteínas envolvidas na sinalização celular responsáveis pela passagem de etapas da mitose e que mais tarde culminariam no prêmio Nobel dado à Hartwell (junto à Nurse e Hunt), também integraram o grupo das proteínas Cdc(s).⁶

Enquanto as proteína quinases dependentes de ciclina posteriormente passaram a integrar o grupo das *Cdk(s)*, o mesmo não ocorreu com as septinas de levedura. Essas septinas são conhecidas, desde 1971, como Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12. Sucessivos trabalhos elucidaram muitas propriedades estruturais e biofísicas das septinas presentes em leveduras, além da descoberta de mais outras três septinas neste organismo (Shs1, Spr3 e Spr28), que serão relatadas de maneira breve posteriormente.

1.2 Estrutura das septinas

1.2.1 Diferentes domínios e interfaces

Estruturalmente, as septinas podem ser divididas em três domínios: Um domínio N-terminal, capaz de interagir com membranas biológicas,⁷ um domínio GTPase, responsável pela hidrólise lenta de nucleotídeos de guanina trifosfatados,⁸ e um domínio C-terminal geralmente capaz de formar *coiled coils* em associação com a septina parceira.⁹⁻¹⁰ Além do mais, pode-se destacar dentro das septinas uma região muito conservada conhecida como *SUE* (*Septin Unique Element*), de aproximadamente 50 resíduos, capaz de diferenciar as septinas de todas as outras pequenas GTPases e de função desconhecida. O esquema a seguir mostra esquematicamente a estrutura primária das septinas (Figura 2.a) e como ela se arranja para formar uma estrutura tridimensional (Figura 2.b).

2.a



2.b

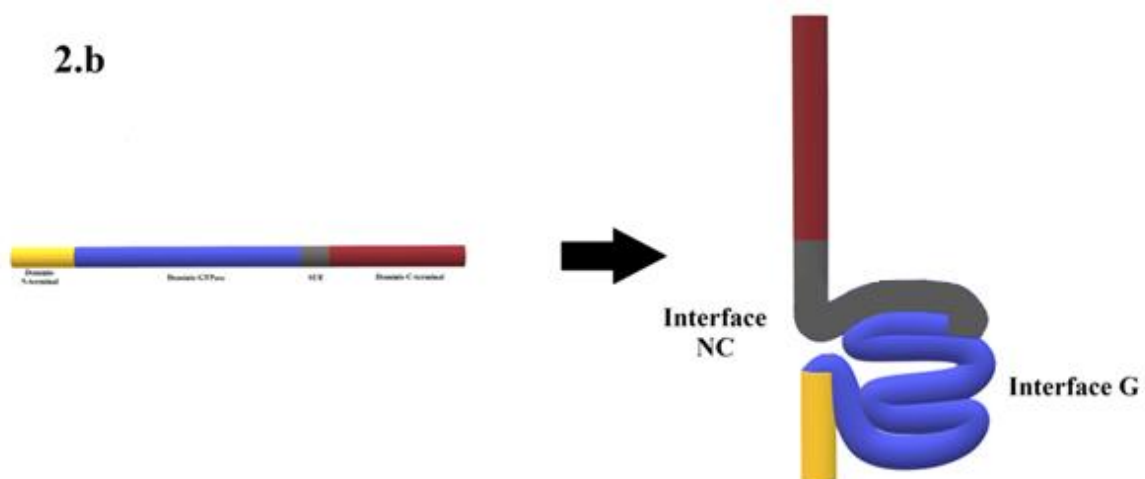


Figura 2 - A) O esquema mostra o arranjo linear de uma septina, contendo os domínios N-terminal, GTPase e C-terminal. Esses três domínios se arranjam de maneira que os domínios N e C terminal se aproximam, formando uma interface conhecida como NC (B). Do lado oposto, o domínio G se enovela dando origem a interface G.

Fonte: Elaborada pelo autor

Estudos pioneiros que culminaram na estrutura cristalográfica de septinas humanas⁹ mostraram que, ao enovelarem-se, os domínios N-terminal e C-terminal aproximam-se, formando o que é conhecido como interface NC. Oposta a esta última, está a interface G, que contém o domínio GTPase. (Figura 3). O nucleotídeo de guanina, que pode ser GTP ou GDP, encontra-se enterrado no interior do domínio GTPase numa região conhecida como *Nucleotide Binding Pocket* (NBP). Cada interface interage com a sua igual, ou seja, uma interface NC interage com outra interface NC tal como uma interface G interage com outra interface G, dando origem a um filamento de maior ordem, conforme o modelo a seguir (Figura 4).



Figura 3 - Modelo espacial representando um monômero de septina, onde se observam as interfaces NC e G, além do bolsão (NBP) que pode conter GTP ou GDP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

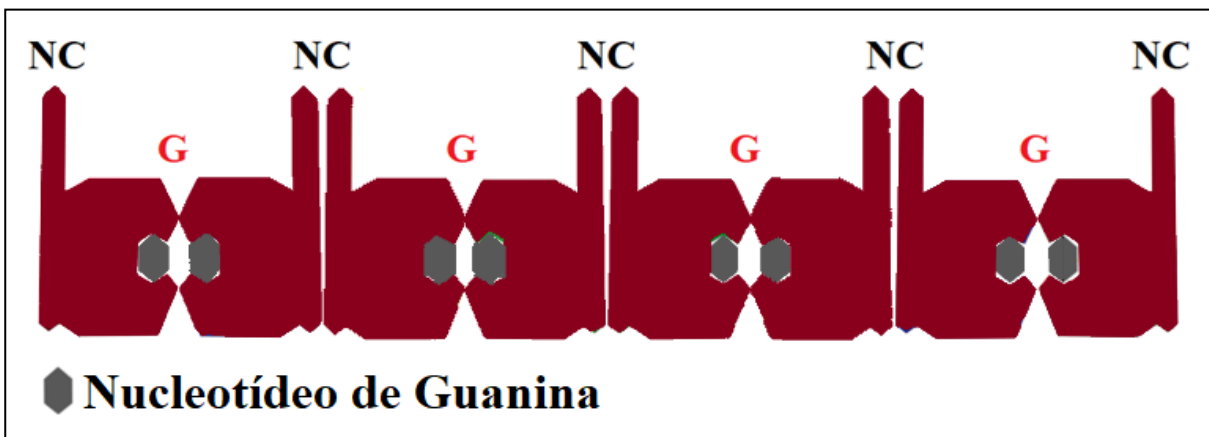


Figura 4 - Modelo representando a disposição de um filamento de septinas a partir da polimerização de monômeros em ambas as extremidades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além da capacidade de formar longos filamentos não polares, ou seja, cujas repetições de monômeros produzem filamentos cujas extremidades são idênticas, as septinas possuem características intrínsecas de cada domínio, responsáveis por delimitar o que de fato define uma proteína como sendo uma septina e separando-as de outras proteínas GTPases.

A região N-terminal caracteriza-se por uma região polibásica capaz de se ligar a membranas biológicas, podendo auxiliar na fixação das septinas a membrana plasmática.¹¹⁻¹² Essa adesão a uma membrana fluida permite com que as septinas sejam maleáveis e se

adequem aos processos de remodelagem intensos que ocorrem na membrana celular ao longo da mitose.

No domínio GTPase encontram-se os motivos responsáveis pela interação das septinas com o nucleotídeo de guanina (GTP ou GDP) e também pela coordenação da reação química que envolve a hidrólise de GTP.¹³ Entretanto, uma característica marcante das septinas em relação a outras GTPases é a sua baixa atividade catalítica, onde estudos indicam que a polimerização do filamento pode ocorrer independentemente da hidrólise do nucleotídeo.¹⁴ Isso se deve principalmente a dois fatores: 1) Nem todas as septinas apresentam atividade catalítica ⁸ e 2) a drástica remodelagem do citoesqueleto na qual as septinas estão sujeitas durante a divisão celular ocorre de maneira muito mais rápida do que o que seria esperado caso este processo fosse guiado pela hidrólise lenta de GTP, uma característica de septinas.^{13, 15}

Por fim, o domínio C- terminal possui geralmente uma α -hélice capaz de interagir com a septina parceira através de *coiled coils*, onde estes são responsáveis não apenas pela extensão do filamento devido à interação de duas interfaces NC,¹⁶ mas também talvez possam interagir com membranas, embora ainda seja incerto como se dê essa interação.¹⁰ Num artigo de 2008, BERTIN *et al.*¹⁷ apresenta imagens de microscopia eletrônica destes filamentos (Figura 5 a), onde também se observa em intervalos regulares o que parecem ser *coiled coils* interagindo entre dois filamentos, formando o que os autores chamam de *railroad tracks* (trilhos de trem, Figura 5 b).

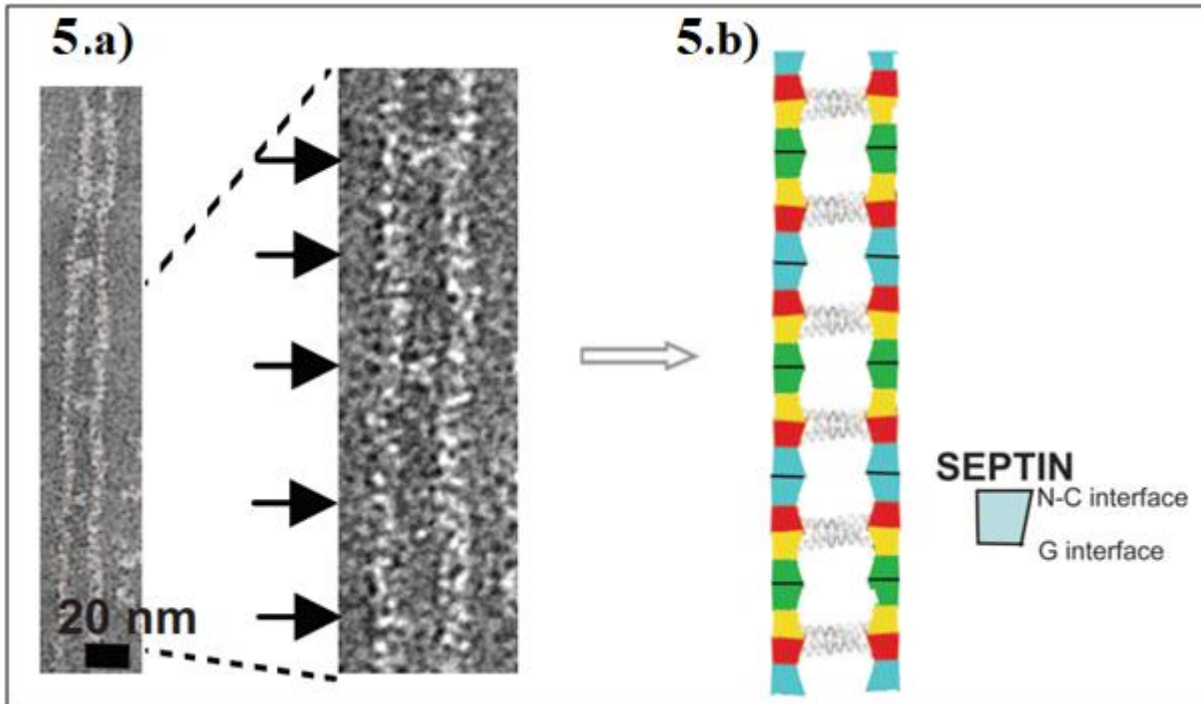


Figura 5 - a) Eletromicrografia de dois filamentos de septinas de levedura interagindo através do que parecem ser *coiled coils*. Um esquema desses filamentos apresentando *railroad tracks* é mostrado em 5.b.

Fonte: Adaptada de BETIN *et al.* ¹⁷

1.2.2 Motivos estruturais

Os três domínios presentes em septinas apresentam resíduos característicos, que conferem a estes a capacidade de realizar cada qual a sua função. Entretanto, observa-se uma identidade muito maior nos resíduos encontrados no domínio GTPase, sendo este considerado a região mais conservada dentro das septinas. ¹⁸

O domínio N-terminal da maioria das septinas, como dito anteriormente, possui uma pequena região rica em aminoácidos carregados positivamente, sendo por esta razão conhecida como motivo polibásico. ^{7,19} Esta região é capaz de interagir com fosfatidilinositol 4,5-bifosfato e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, dois fosfolipídios presentes em membranas biológicas, ^{7,11} podendo auxiliar na montagem dos filamentos no interior das células. ²⁰ Porém, é necessário salientar que alinhamentos desse domínio são inconclusivos quanto à identidade dos aminoácidos desta região, de maneira que resíduos básicos como lisina, arginina e histidina, embora presentes, não se encontram na mesma posição. PAN *et al.* (2007) ¹⁸ num estudo sobre evolução de septinas encontraram apenas um resíduo de glicina conservado dentro desta região, indicando a grande variabilidade presente no domínio N-terminal das septinas. Pode se aventar a possibilidade de que o processo de seleção natural que agiu sobre

estas proteínas atuou de maneira mais incidente na conservação de uma região capaz de interagir com a membrana plasmática do que propriamente na ordem destes resíduos.

Acredita-se também que o domínio N-terminal seja parcialmente estruturado,⁹ também observado empiricamente dada à dificuldade em se obter cristais proteicos de septinas inteiras. A grande maioria das estruturas cristalográficas de septinas depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) foi obtida apenas a partir de construções que continham unicamente o domínio GTPase destas proteínas. Mesmo cristais de septinas que continham os seus três domínios, quando realizados os experimentos de difração de raios-X, apresentaram densidade eletrônica fraca, indicativo de desordem dos domínios N e C-terminal⁹(Figura 6).

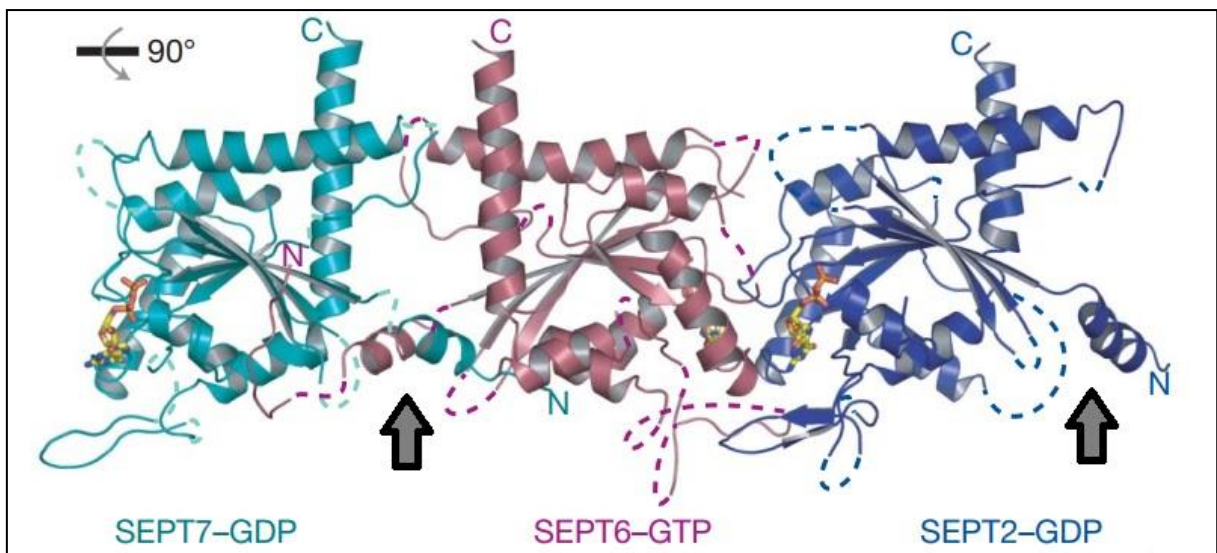


Figura 6 - Estrutura cristalográfica do complexo trimérico formado entre as septinas humanas Sept7-Sept6-Sept2. As setas indicam as interfaces NC. O modelo apresenta informação estrutural limitada dada à baixa resolução da estrutura. PDB 2QAG.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN *et al*⁹

O domínio GTPase, por vezes também chamado de domínio G, representa o *core* das septinas, onde geralmente se encontra a maioria dos aminoácidos desta (assim como sua porção mais conservada). Como pode ser visto na Figura 6, o domínio G tem um papel fundamental na formação dos contatos entre monômeros feitos pelas interfaces NC e G. Este domínio também é responsável pela hidrólise lenta de GTP em GDP, quando esta ocorre^{13,21}. Continua a ser um grande mistério no campo das septinas qual a verdadeira função da atividade catalítica e se esta impacta na formação do filamento.

Quanto ao mecanismo de reação envolvendo a hidrólise, destacam-se três motivos responsáveis pelo arcabouço que culmina na formação de GDP a partir de GTP. Um dos motivos apresenta um *loop* flexível, capaz de interagir com γ -fosfato do nucleotídeo¹³. Esse tipo de interação tem o nome de *P-loop* e também está presente em outras proteínas não septinas. Outro motivo se liga ao íon Mg^{+2} , que coordena os resíduos envolvidos na catálise¹³. O último motivo do domínio garante especificidade ao nucleotídeo que se liga à proteína¹³. Tais motivos foram descritos originalmente com relação às pequenas GTPases.²²

O motivo que possui o P-loop é conhecido como G1 e apresenta a sequência GXXXXGK, sendo muito comum encontrar também após essa sequência um resíduo de serina e outro de treonina. Esta serina se aproxima do íon magnésio e auxilia na sua coordenação. Em relação ao γ -fosfato, este se mantém na posição adequada para a sua hidrólise com a ajuda da lisina (K) no final da sequência consenso do motivo G1 (Figura 8.a e Figura 8.c). Esta lisina auxilia estabilizando a carga negativa dos grupos fosfato no interior das septinas. O motivo G1 destaca-se por manter o GTP na posição adequada para a sua hidrólise.¹³

Acredita-se que a função definida para o segundo motivo, chamado G3 (DXXG), seja a coordenação de um íon magnésio, necessário à atividade catalítica das septinas e também em orientar o γ -fosfato do GTP numa posição adequada para a catálise.¹³ O Mg^{2+} auxilia em neutralizar e estabilizar a presença do GTP no *core* do domínio GTPase, também auxiliando na manutenção do fosfato β e γ nas posições apropriadas para a sua catálise. Pode-se pensar neste magnésio, de maneira metafórica, como um pilar de sustentação, uma ponte, o elo que comunica os fosfatos do nucleotídeo ao motivo DxxG das septinas (o motivo G3).¹³ Esse resíduo aspártico presente no motivo interage com uma molécula de água, que por sua vez auxilia no posicionamento do magnésio (Figura 8.a e Figura 8.b). Desta maneira, graças a este cátion, os grupos fosfatos do GTP ficam “esticados”, expondo a ligação fosfodiéster para que essa possa ser atacada por uma molécula de água que por sua vez é segurada por treonina catalítica, resultando na liberação do complexo septina-GDP e um fosfato inorgânico.

Por fim, o terceiro motivo (G4) garante a especificidade ao nucleotídeo de guanina.¹³ Em pequenas GTPases, ele compreende os resíduos NKxD, sendo muito comum a sequência composta pelos resíduos alanina, lisina, alanina e aspartato (AKAD) em septinas. É interessante relembrar a diferença entre as bases nitrogenadas púricas de modo a entender porque as septinas interagem com GTP, mas não com ATP (Figura 7).

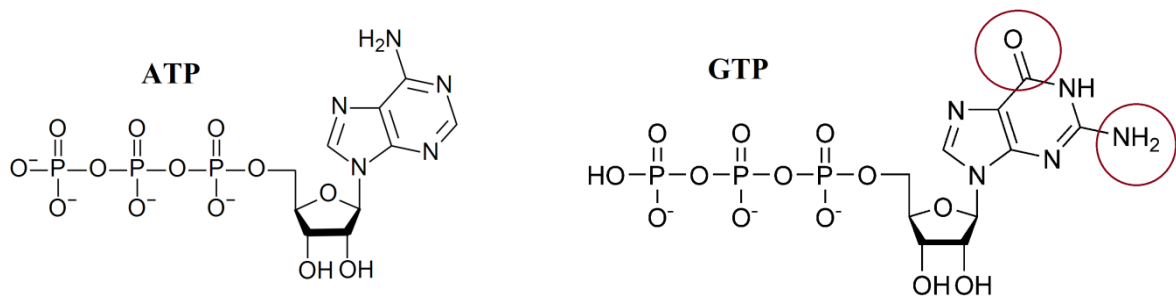


Figura 7 - Comparação entre os nucleotídeos ATP e GTP. Embora muito similares, O GTP (à direita) possui um radical amina e outro éster, que majoritariamente os diferenciam, garantindo especificidade ao nucleotídeo que se liga à septina.

Fonte: Adaptada de Wikipédia.

Tanto o trifosfato de adenosina (ATP) quanto o trifosfato de guanosina (GTP) advém de uma rota metabólica comum a ambos, sendo o monofosfato de inosina o precursor das duas moléculas. Entretanto, a presença de diferentes grupos químicos dá tanto ao GTP quanto ao ATP propriedades distintas. O primeiro possui um grupo amina no lugar do hidrogênio que se observa no anel aromático na posição 2 da molécula de ATP. Além disso, o GTP possui um oxigênio na posição 6, onde no ATP existe um grupo amina. Essas particularidades resultam em diferentes momentos dipolo, assim como a capacidade de realizar diferentes ligações de hidrogênio. Emerge dessa diferença a capacidade do resíduo aspártico presente no motivo NKxD de interagir simultaneamente com o $-NH_2$ exocíclico e o NH existente no anel aromático do GTP (Figura 8.a e Figura 8.d). Uma vez que o ATP não possui estes grupos, as septinas são capazes de selecionar entre os diferentes nucleotídeos.

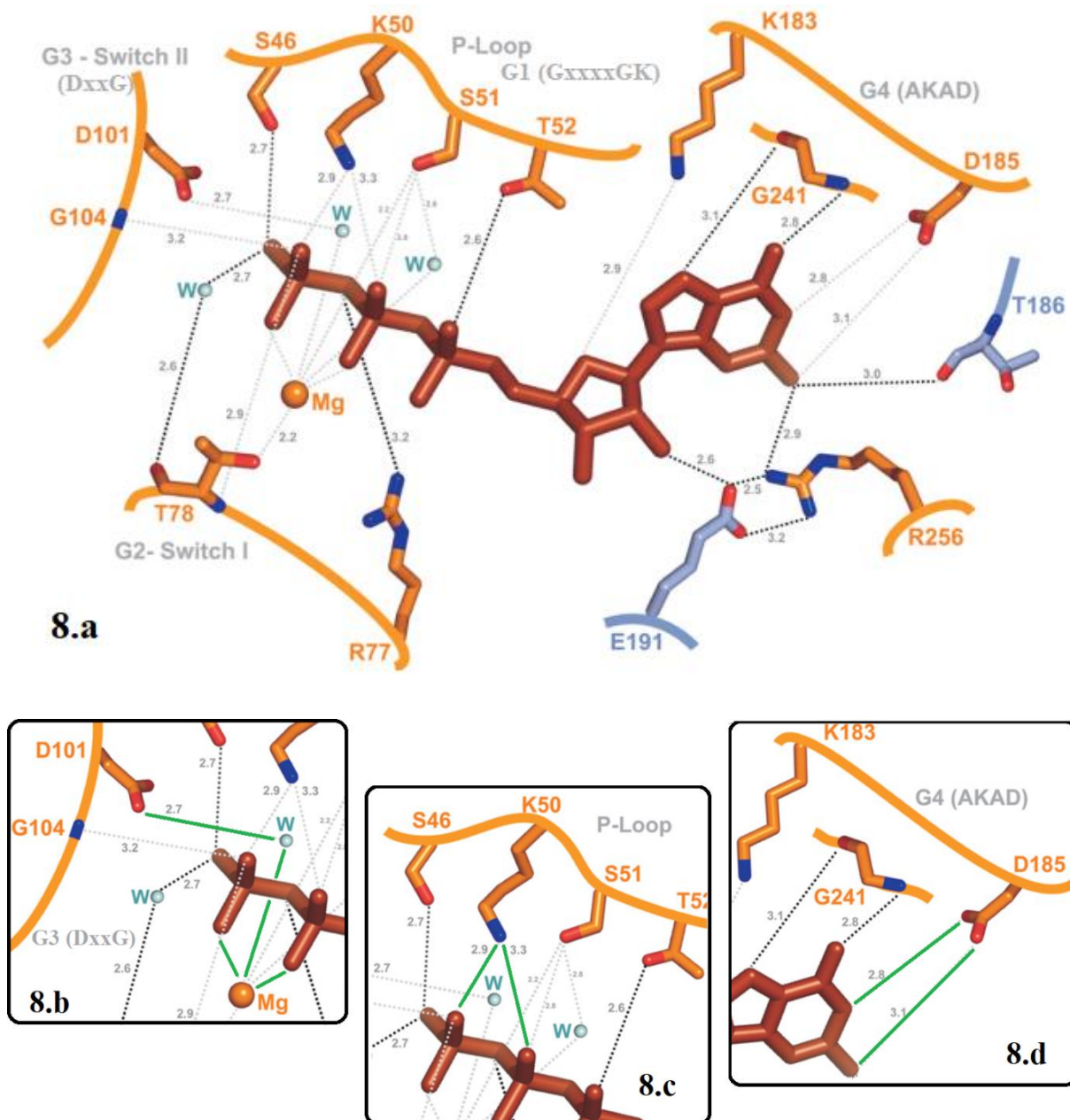


Figura 8 - a) Estrutura do NBP de uma septina na presença de 5'-Guanylyl imidodiphosphate (GDPNP), um análogo não hidrolisável do GTP. Em destaque os motivos G1 (8.c), G3(8.b) e G4 (8.d) onde as linhas verdes indicam as interações que ocorrem nos três motivos.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN *et al.* ¹³

De primordial importância na atividade catalítica das septinas está um resíduo de treonina, localizado entre os motivos G1 e G3, numa região conhecida como *switch I* (também chamado de G2). Estudos envolvendo septinas humanas mutantes que não possuíam esse aminoácido na posição devida resultaram na perda da capacidade de hidrolisar GTP. ¹³ Além do mais, uma breve comparação entre septinas humanas e de leveduras mostra a importância deste resíduo na catálise (Figura 9), uma vez que septinas que não possuem essa

treonina também não apresentam atividade GTPasica, demonstrando como, mesmo em organismos diferentes, esse resíduo (ou sua ausência) desenvolve um importante papel.

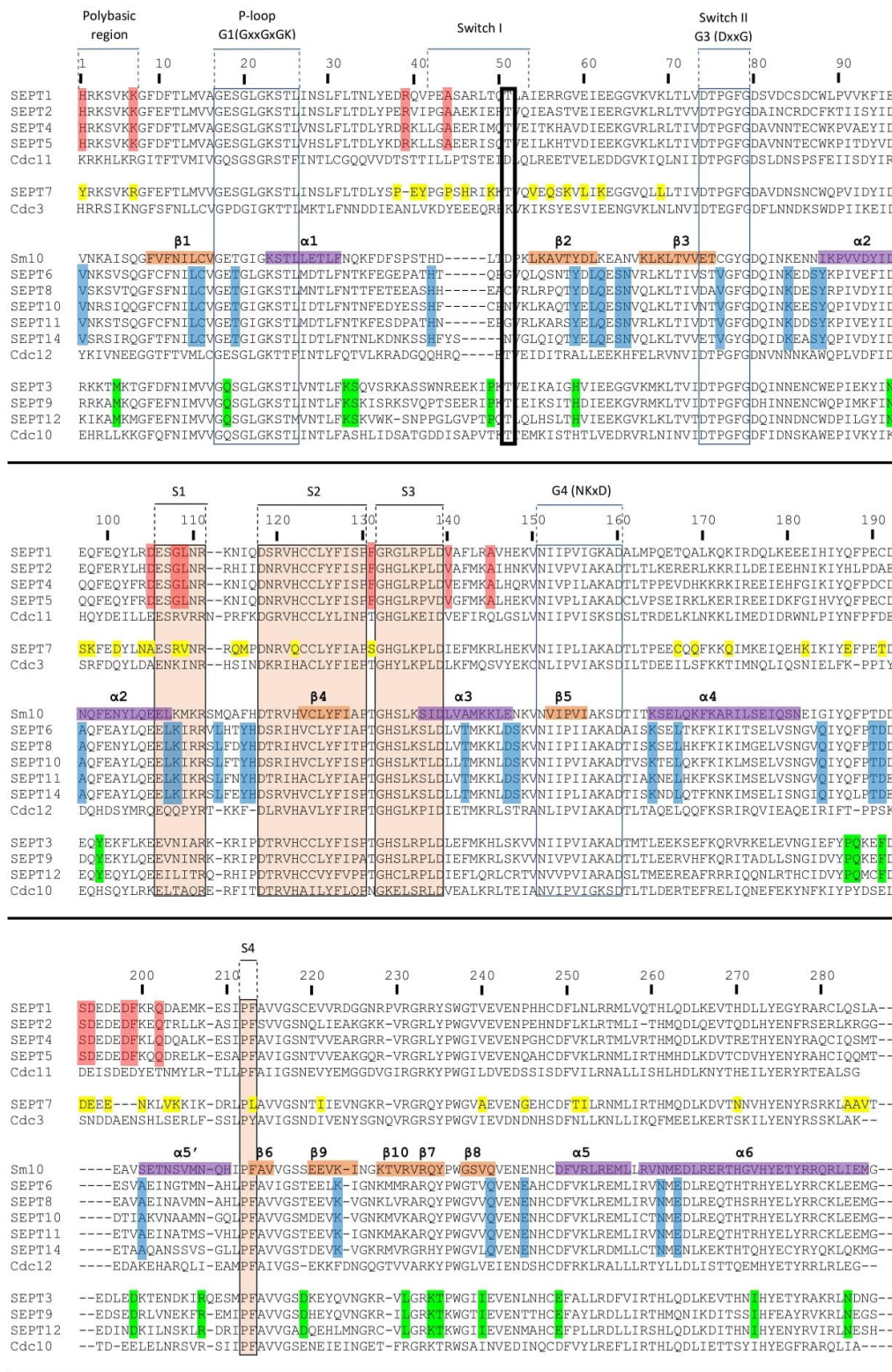


Figura 9 - Alinhamento englobando os motivos GTPase de septinas humanas (SEPTs) e de leveduras (Cdc). Dentro da região conhecida como *Switch I* está localizada a treonina catalítica, destacada em todos os grupos por um retângulo em realce (posição 51). Nota-se que todas as septinas que não possuem este resíduo são cataliticamente inativas (Cdc11, Cdc3, Sept6, Sept8, Sept10, Sept11 e Sept14). Na imagem também se observa a região polibásica, os motivos G1, G3 e G4, além dos aminoácidos característicos de cada grupo em septinas humanas (realçados em vermelho, amarelo, azul e verde).

Fonte: Adaptada de ROSA *et al.* ²³

Sobre qual é a importância desta hidrólise e se esta possui alguma função específica, ainda existem algumas lacunas a serem respondidas. Alguns estudos indicam que a quebra do GTP pode auxiliar na montagem do filamento ²⁴ e controlar a interação com membranas ¹⁰. Outros apontam para uma maior especificidade da interação com a septina parceira. ^{21, 23} Alguns também discutem sobre a possibilidade de que o nucleotídeo, enterrado na interface G, possa reverberar na interface NC ao ser ligado à proteína ou ao ser hidrolisado, funcionando como um tipo de sinalização na polimerização do filamento ²¹. Embora o campo estrutural das septinas tenha evoluído muito como um todo nos últimos anos, ainda existe muito a ser elucidado.

Num trabalho de PAN *et al.* ¹⁸ que comparou uma grande quantidade de septinas em diferentes organismos, outros quatro motivos foram identificados como Sep1, Sep2, Sep3 e Sep4 (Tabela 1) que, diferentemente de G1, G3 e G4, também presentes em outras GTPases, são característicos de septinas. Ao mesmo passo que inexiste até o momento funções determinadas para esses novos motivos, é muito comum que eles não sejam mencionados em artigos da área, embora CASTRO *et al.* ²⁵ especulam que o motivo Sep2 tenha um papel na comunicação entre interfaces mencionada acima.

Tabela 1 - Novos motivos de septinas encontrados no interior do domínio GTPase.

Os Motivos Sep1, Sep2, Sep3 e Sep4

Sep1 motif (SceCdc3 237-242)	Sep2 motif (SceCdc3 247-259)
E	D
x	x
x	R
x	[VI]
x	H
R	x
	x
	x
	[YF]
	F
	[IL]
	x
	P
	Sep4 motif (SceCdc3 364-365)
	W
	G

Na região C-terminal de algumas septinas encontram-se resíduos capazes de formar *coiled coils*, superhélices formadas por α -hélices que interagem formando um polímero espiral.

Os *coiled coils*, localizados na interface NC das septinas, são formados a partir da interação entre duas α -hélices presentes nos domínios C-terminal destas proteínas, sendo cada hélice proveniente de um monômero diferente. Acredita-se que algumas destas interações sejam fundamentais para a formação de um filamento.^{9, 16, 26} Embora não exista uma região conservada para o domínio C-terminal nas septinas, em muitas destas existe uma região predita para formar essas superhélices, o que foi confirmado por alguns estudos recentes.¹⁰

Como já observado em imagens de microscopia eletrônica (Figura 5.a), os *coiled coils* de um filamento parecem interagir com *coiled coils* de outro filamento, neste caso formando uma estrutura que se assemelha a um trilho de trem.¹⁷ Entretanto, se as imagens mostram a interação entre dois filamentos, também é passível de questionamento se mais filamentos podem ser adicionados e formar algo parecido com uma malha. Embora já se tenham bons modelos cristalográficos e imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das septinas, ainda é incerto qual é a maneira como elas interagem e como elas se posicionam no entorno da membrana celular.

Por muito tempo se acreditou que os *coiled coils* presentes no domínio C terminal das septinas interagissem apenas de maneira paralela, o que sugeriria que filamentos inteiros poderiam não ser responsivos à presença de outros filamentos por meio destas estruturas. No entanto, algumas estruturas cristalográficas apenas do domínio C-terminal de septinas nos mostram que os *coiled coils* podem interagir seguindo uma orientação antiparalela¹⁰. Pressupondo-se que estas mesmas interações também possam ocorrer em septinas *in natura* e também tomando por referência imagens de microscopia eletrônica onde se observa os chamados trilhos de trem,^{10, 17} se torna plausível a ideia de que monômeros e filamentos de septinas possam ocorrer de acordo com o modelo a seguir (Figura 10).

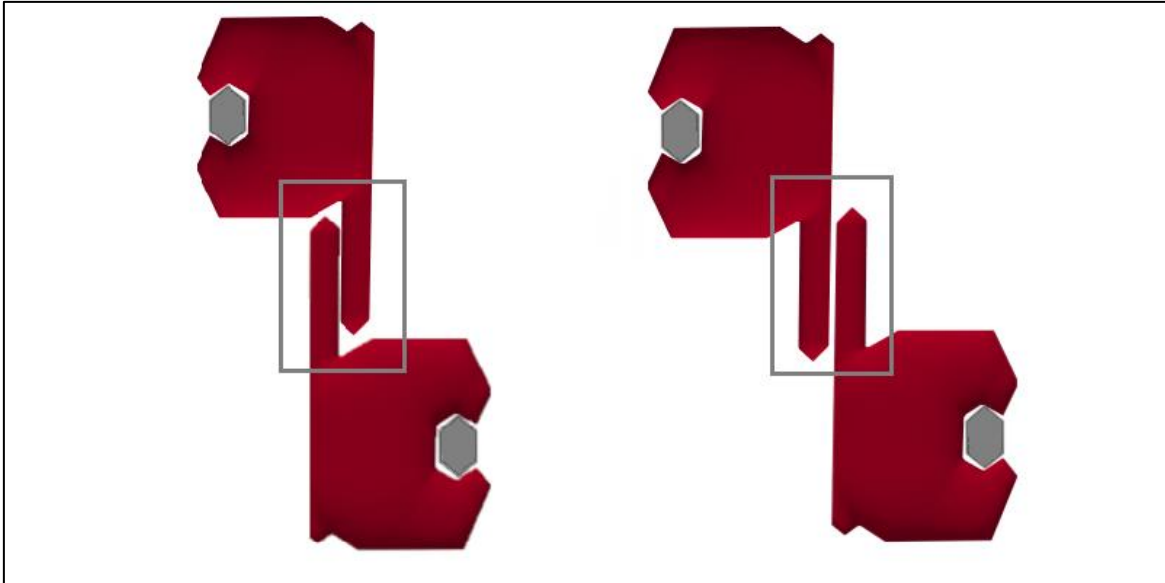


Figura 10 - Representação de como poderia ocorrer a interação antiparalela entre dois monômeros de septinas, via *coiled coil* presente no domínio C-terminal da interface NC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que os *coiled coils* em septinas podem assumir uma orientação tanto paralela quanto antiparalela, é possível imaginar que elas sejam capazes de originar filamentos de maior ordem e contribuir para formação de algo parecido à uma malha (Figura 11a).¹⁰ Portanto, ao passo que as interações via *coiled coils* paralelos dão origem a um filamento que cresce de maneira unidimensional, os *coiled coils* antiparalelos seriam responsáveis por fazer a conexão entre diversos filamentos, originando um crescimento da estrutura em duas dimensões. Alguns estudos envolvendo MET (Figura 11.b) parecem corroborar com esta ideia, onde se pode observar a interação entre diversos filamentos e também um espaçamento periódico entre o que parece ser o conector destas estruturas.

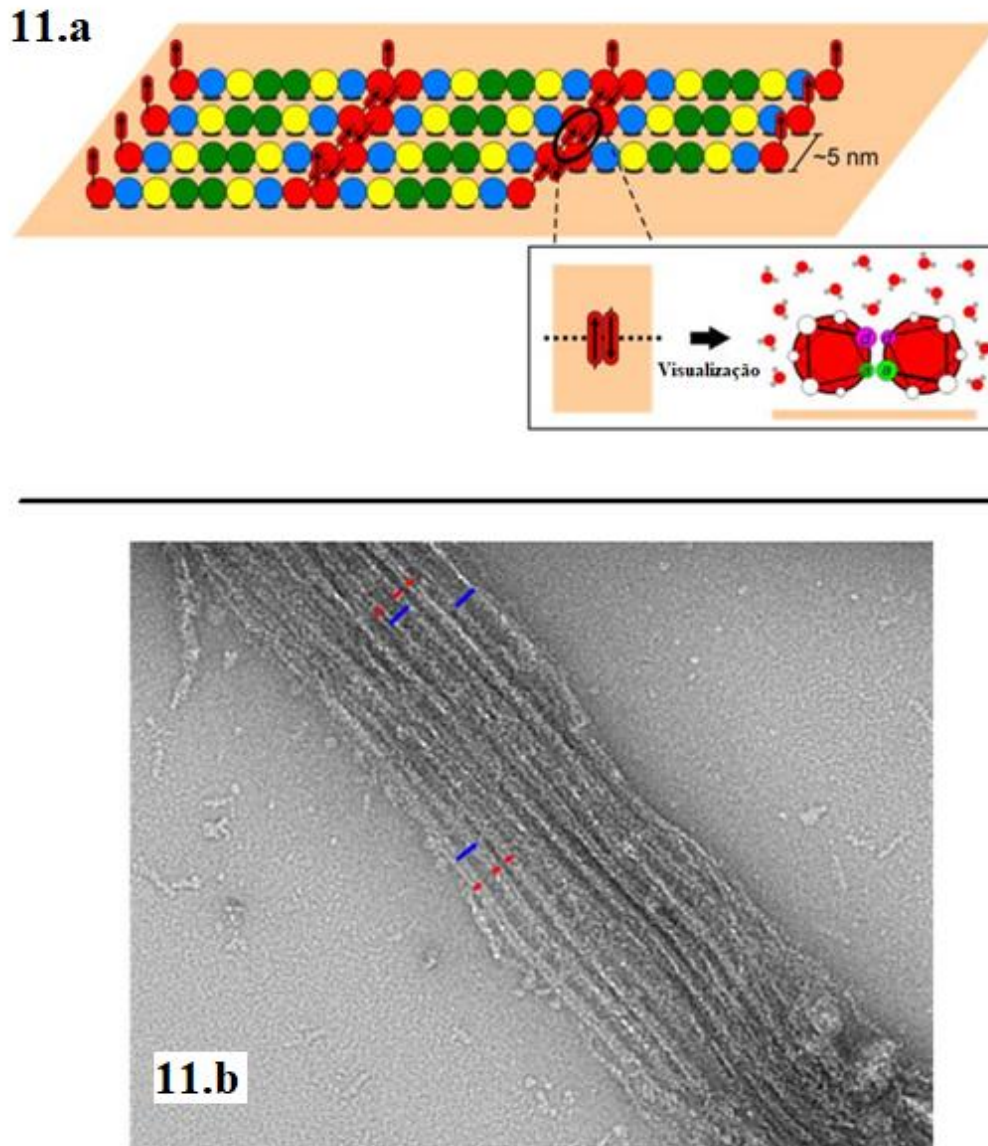


Figura 11.- a) Esquema proposto para a formação de uma malha bidimensional de septinas, onde os *coiled coils* paralelos (omitidos na imagem) garantem a extensão de um único filamento e os *coiled coils* antiparalelos permitem a junção de vários filamentos numa estrutura maior. Observa-se que estes filamentos parecem estar unidos por estruturas conectoras (11.b) espaçadas de maneira regular (em azul e vermelho).

Adaptada de LEONARDO *et al.*¹⁰

Embora algumas evidências pareçam indicar que talvez seja possível a interação lateral de filamentos de septinas, ainda são necessários outros estudos mais robustos que possam clarificar não apenas como acontece a interação entre os *coiled coils* em septinas inteiras, mas também que possam elucidar de que maneira estas proteínas interagem com membranas biológicas.

1.2.3 Estruturas Secundárias e Terciárias

A grande maioria das estruturas tridimensionais de todas as septinas, até o momento, foi elucidada através do método de cristalografia de macromoléculas por difração de raios-x (Figura 12). Essa técnica vale do pressuposto teórico que proteínas (ou outras moléculas), ao darem origem a um monocristal, apresentam certa ordem interna, onde cada molécula dentro do cristal está relacionada com qualquer outra por operações de simetria. Quando esse cristal é atingido por um feixe de raios-x, as moléculas presentes dentro deste cristal contribuem como um amplificador de sinal, gerando um padrão de difração que pode ser capturado por um detector de fótons. A ordem interna do cristal (especificamente a sua rede) faz com que a intensidade da luz espalhada seja não-zero apenas em direções muito bem definidas, determinadas pela lei de Bragg, dando origem a “reflexões” que aparecem como pontos no detector. Assim, de posse dos padrões de difração gerados a partir da difração deste cristal em vários ângulos diferentes, se pode obter o conjunto de reflexões completo. De posse destes dados e uma vez resolvido o “problema de fases,” a densidade eletrônica correspondente a uma região chamada de unidade assimétrica do cristal pode ser determinada. Sua interpretação, em termos de posições atômicas, dá origem ao modelo da estrutura.

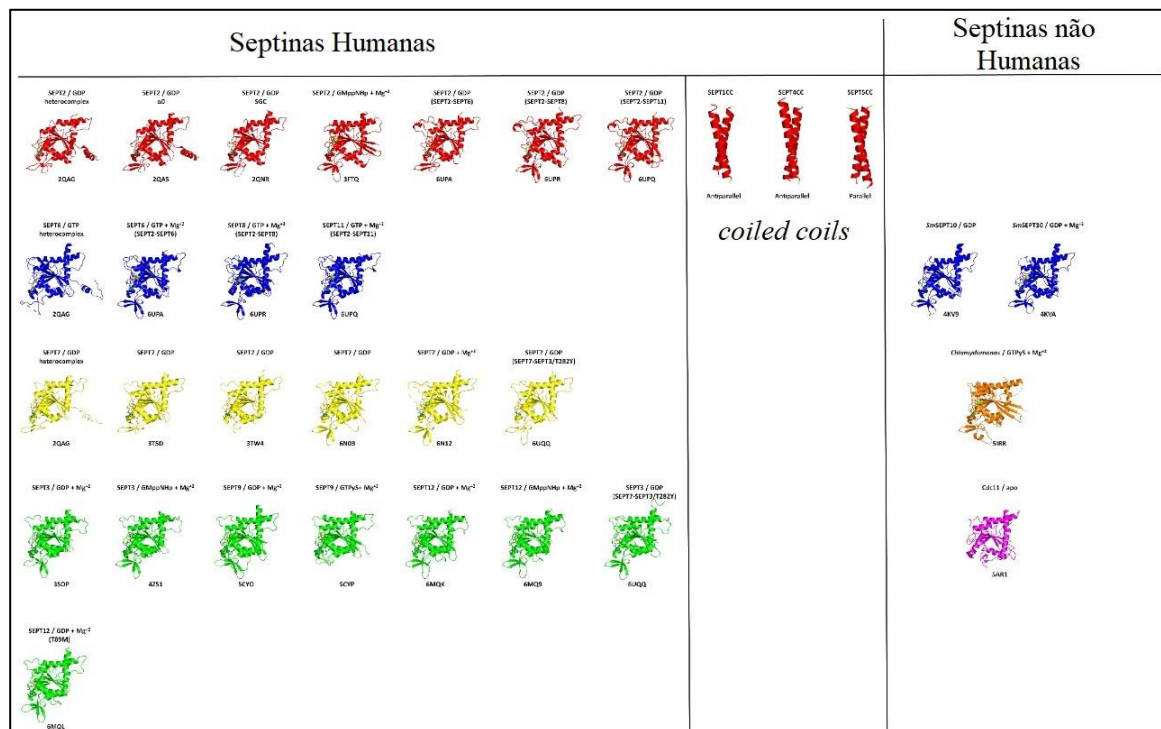


Figura 12 - Painel de todas as estruturas de septinas existentes até o momento, que foram elucidadas pelo método cristalografia de difração de raios x.

Embora as septinas sejam compostas de três domínios e duas interfaces, o domínio GTPase é muito melhor caracterizado por possuir estruturas cristalográficas confiáveis e de mais alta resolução. Acredita-se que tanto o domínio N e C-terminal, quando presentes, sejam muito flexíveis em relação ao domínio GTPase e muitas vezes não estão ordenados dentro do cristal. Assim sendo, esses domínios não contribuem para o padrão de difração e, portanto, a densidade correspondente não aparece no mapa final, por consequência fazendo com que as informações estruturais dessas regiões sejam escassas.⁹

O domínio GTPase das septinas apresenta a topologia do tipo α/β , contendo um *core* de cinco fitas- β (que formam uma folha) e sete α -hélices (Figura 13),⁹ embora seja comum que as pequenas GTPases possuam seis fitas- β . Este domínio também possui um meandro que contém três pequenas fitas- β , compreendido dentro da região *SUE*.

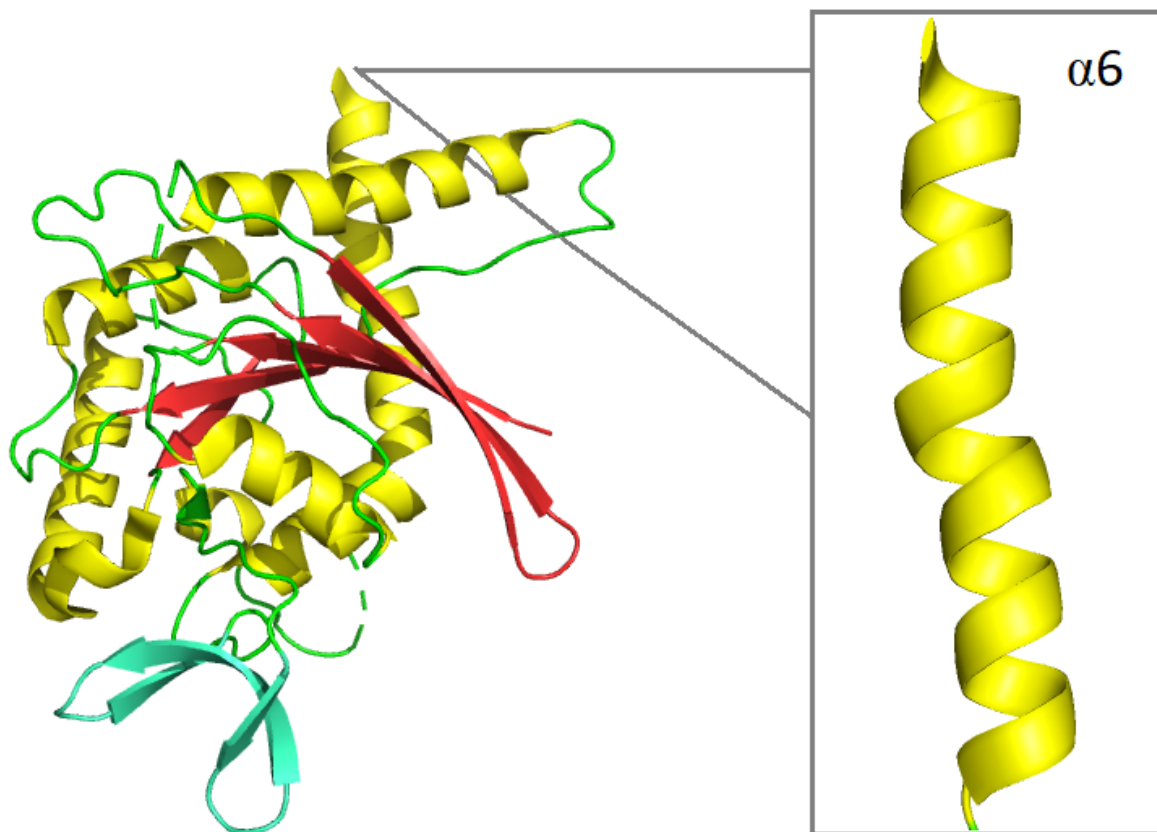


Figura 13 - Estrutura cristalográfica do domínio GTPase da septina humana Sept7. As α -hélices estão destacadas em amarelo e as fitas- β no interior do domínio em vermelho. Também se destaca, em ciano, o β -meandro, uma região de três fitas antiparalelas que faz parte do *Septin Unique Element*. Em destaque $\alpha 6$, que faz contato com outra $\alpha 6$ da septina parceira.

Fonte: Adaptada de BROGNARA *et al.*²⁷ PDB: 6N0B.

As fitas- β , no interior proteico, formam uma estrutura que se assemelha a uma cela de cavalo devido às interações que ocorrem entre as fitas. Das cinco fitas presentes, quatro apresentam orientação paralela e, uma delas, antiparalela (Figura 14.a). Esse *core* de fitas

apresenta muitos resíduos hidrofóbicos, responsáveis por enterrar essa porção no interior do domínio.

As conexões entre as fitas paralelas envolvem α -hélices, e a única fita antiparalela da estrutura se liga à fita seguinte por apenas quatro aminoácidos, entre a fita $\beta 2$ e $\beta 3$.

Já as α -hélices do domínio GTPase, no total de sete, envolvem as fitas- β centrais e, como um arcabouço, oferecem estabilidade ao core hidrofóbico. A estas hélices se dão os nomes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5'$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ (Figura 14.b). Pode-se dizer que estas hélices apresentam dois lados: um hidrofóbico e outro hidrofílico. O lado hidrofóbico aponta para as fitas- β centrais e também para outros resíduos apolares, presentes nestas mesmas hélices. Já o lado hidrofílico apresenta tantos resíduos polares como também carregados. Este lado aponta para a porção externa do domínio, onde se encontra o solvente polar e se imagina que corresponda ao citosol *in vivo*.

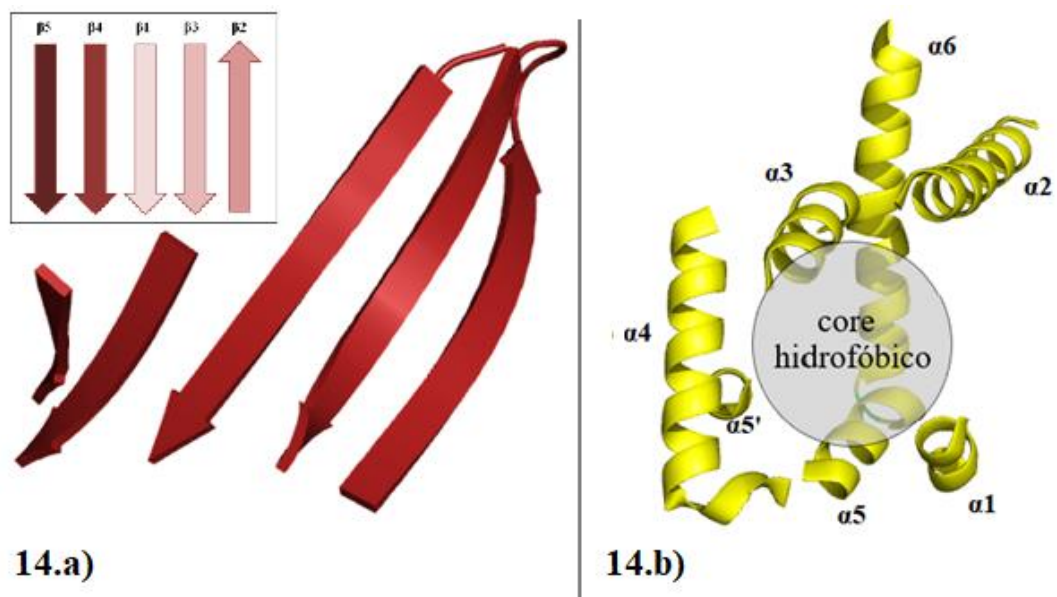


Figura 14 - a) Representação do tipo *cartoon* das fitas- β em arranjo de cela e das b) α -hélices do domínio GTPase septina humana Sept7. Na parte superior esquerda (a) um esquema mostra a ordem das fitas, onde a porção mais clara representa a região N-terminal e a mais escura a região C-terminal.

Fonte: Elaborada pelo autor. PDB 6N0B.

De importante destaque também é a hélice $\alpha 6$, de onde parte o domínio C-terminal responsável pelos *coiled coils* que auxiliam na interação entre diferentes subunidades de septinas no filamento (Figura 13). Essa hélice, que determina a região final do domínio GTPase, representa uma estrutura muito conservada em septinas, o que mostra a sua

relevância estrutural e funcional ^{10, 16}. Também desperta a curiosidade o fato de que a hélice $\alpha 5'$ apresenta diferentes inclinações em relação ao eixo do filamento em alguns grupos de septinas. Especula-se que talvez isso possa estar relacionado com a formação de interações específicas entre subunidades na interface NC que garantem a correta montagem do filamento. ^{16, 25}

1.2.4 Funções das septinas

Como já mencionado anteriormente, septinas são proteínas estruturais cuja função celular envolve geralmente a formação de filamentos. ^{17, 28} Estes filamentos, por sua vez, podem atuar nos mais diversos organismos, participando de diferentes processos como a manutenção da integridade celular, criar uma barreira de difusão ou servir como um ponto de ancoragem para a interação com proteínas parceiras. ^{20, 29}

Em leveduras as septinas formam um anel associado à divisão celular (Figura 15), onde uma mutação que silencie qualquer um dos genes que codifica para uma das quatro proteínas envolvidas na formação do filamento provoca um fenótipo letal. ³

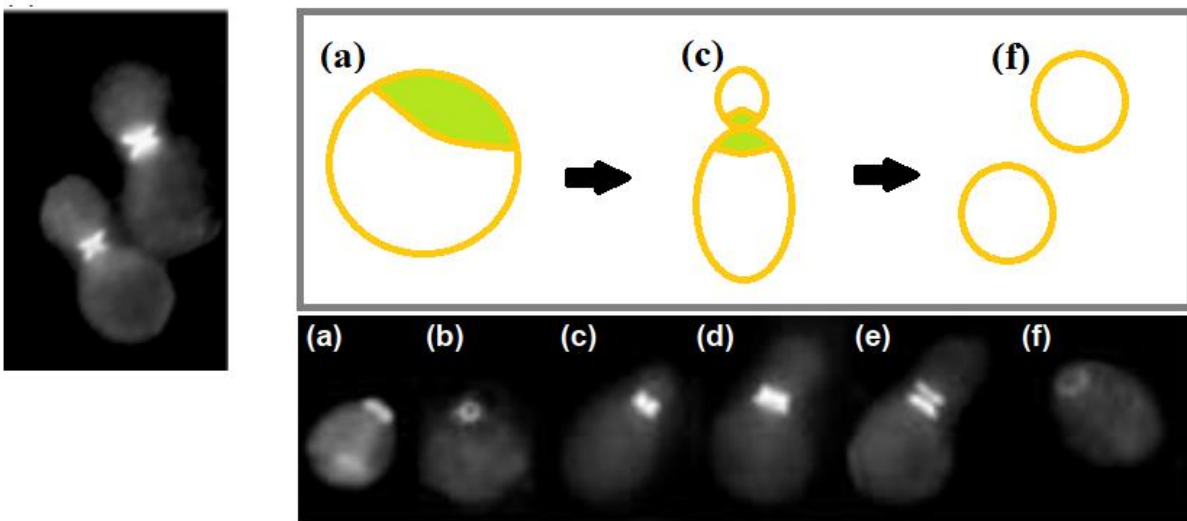


Figura 15 - Localização de filamentos de septinas ao longo da divisão celular por brotamento. A imagem à esquerda mostra dois anéis pareados de filamentos de septinas marcados por imunofluorescência no ponto máximo da divisão. Já na imagem a direita é possível ver a localização deste anel numa extremidade da célula (a), local onde se inicia a formação do novo broto (c) que culmina ao final em duas células-filhas (f).

Fonte: Adaptada de GLADFELTER *et al.* ³⁰

Ao polimerizarem, os filamentos de septinas se organizam em estruturas de maior ordem que tem a capacidade de criar uma barreira de difusão e limitar as moléculas presentes em diferentes compartimentos ³¹. Essa particularidade pode explicar porque uma vez formado o broto em leveduras, este não retrocede em direção à célula-mãe.

Septinas também podem ter outras funções não diretamente relacionadas a um papel como mera constituinte do filamento. Em leveduras, a presença da septina Cdc10 é associada à inibição da apoptose celular quando esta é agredida por agentes químicos ³². A septina Cdc3 é essencial na desmontagem mais rápida do filamento por possuir uma sequência capaz de ser fosforilada ³³. Já no caso da septina Cdc12 especula-se que a presença de uma hélice anfipática seja capaz de perceber pequenas curvaturas na membrana celular. ³⁴ Desta maneira torna-se evidente a importância dessas proteínas em *S. cerevisiae*.

Em humanos, um organismo de maior complexidade, septinas também estão envolvidas em processos fisiológicos importantes. Elas podem ser encontradas em neurônios (espinhos dendríticos), no ânulo dos espermatozoides e também na base dos cílios de células ciliadas (Figura 16) ^{35, 36, 37}. Defeitos que envolvem a expressão das proteínas e a montagem dos filamentos nestas células levam a diferentes patologias. Estudos já apontaram a relação entre septinas humanas e neoplasias, Alzheimer, Parkinson e infertilidade. ^{36, 38}

As septinas também estão envolvidas no processo de defesa celular. Alguns patógenos podem ser englobados em fagossomos, onde se aderem filamentos de actina e septina para diminuir a mobilidade do microrganismo ³⁹. Interessantemente, alguns patógenos se utilizam desta mesma maquinaria para invadir outras células. ⁴⁰

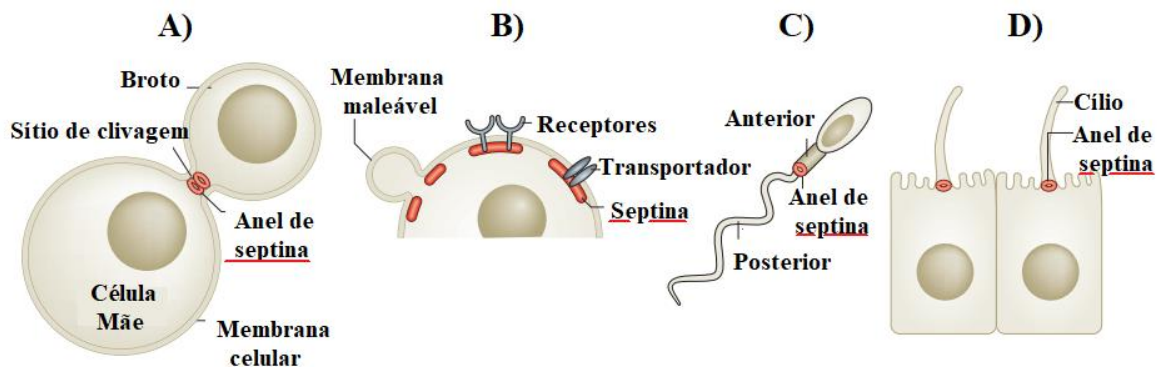


Figura 16 - Septinas podem ser encontradas em diferentes células e processos celulares. Estão envolvidas na divisão celular (A), manutenção da integridade da membrana e como ponto de ancoragem (B) e também formando barreiras de difusão em células ciliadas (C e D).

Fonte: Adaptada de MOSTOWY; COSSART. ⁴¹

A grande miríade de funções em que as septinas estão envolvidas reforça a curiosidade e justifica o estudo dessas interessantes proteínas, fundamentais à vida nos mais diferentes organismos. Desvendar suas propriedades pode ser uma poderosa ferramenta para entender tanto processos evolutivos como doenças que acometem humanos.

1.3 Septinas: relações evolutivas

As septinas podem ser encontradas em organismos muito diversos e distantes filogeneticamente ¹⁸, como algas, fungos, vermes, insetos e cordados, com a notável exceção das plantas. Embora seja escasso na literatura o porquê de um grupo tão grande como os vegetais superiores não possuírem tais estruturas, é interessante observar que plantas possuem uma divisão celular em que não ocorre a formação de um anel contrátil que divide as duas células ao final da mitose. Nestas, a deposição de parede celular entre célula-mãe e a célula-filha encerra o processo mitótico. Porém, se as septinas foram descartadas pelo processo evolutivo que se sucedeu nas plantas em função da presença de outros mecanismos análogos de suporte celular ou se a linhagem que deu origem a esse grupo já não possuía esta classe de proteínas, é uma pergunta que ainda está por ser respondida.

De fato é possível dizer que é incomum que uma classe de proteínas seja completamente conservada ao longo de diferentes filos durante o processo evolutivo. Isto se deve basicamente à grande quantidade de mutações que ocorrem no material genético de seres vivos ao longo de milhões de anos, onde os genes presentes na atualidade foram cooptados para outras funções e perderam suas características ancestrais. Entretanto os genes relacionados às funções basais, como aqueles envolvidos no metabolismo intermediário (respiração celular) ou divisão celular, apresentam uma alta conservação devido ao caráter deletério que decorre de mutações nestes. Assim, a alta conservação dos motivos G1, G3 e G4 dentro do domínio GTPase de diversas espécies evidencia a importância destes em processos celulares muito antigos. ¹⁸

Característica intrínseca das septinas é a capacidade de formar filamentos, embora estes possam ser formados por diferentes quantidades de monômeros dependendo do ser vivo em questão. Em *Chlamydomonas reinhardtii* só existe um gene que codifica para septinas, o que sugere que ou a formação de filamentos neste organismo se dá usando apenas esta proteína na montagem dessa estrutura ou então que, neste organismo, não existe a formação de filamentos de septinas. De maneira interessante essa proteína forma homodímeros e

filamentos *in vitro* e, ao se formar, faz com que um monômero auxilie na hidrólise de GTP pela septina parceira ⁴². Em *Caenorhabditis elegans*, duas proteínas conhecidas como Unc-59 e Unc-61 são as responsáveis pela formação do filamento. Em *Drosophila melanogaster*, existem cinco genes que codificam para septinas, que estão incluídas em três subgrupos ⁴³ capazes de formar um hexâmero como protofilamento. Em *S. cerevisiae*, quatro septinas (Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12) formam octâmeros que se polimerizam em filamentos de maior ordem ¹⁷, enquanto em humanos existem treze genes codificantes para septinas, divididas em quatro subgrupos, capazes de formar hexâmeros e octâmeros como os protofilamentos responsáveis por originarem um filamento maior. ⁴³ Dessa maneira se observa interessante como mesmo possuindo diferentes tipos e quantidades desses “blocos” na construção de um filamento, diversos seres vivos não aparentados são capazes de fazê-lo.

Um trabalho chave sobre evolução de septinas ¹⁸ as dividiu em cinco grupos, donde divergiram todas as septinas modernas. Neste, quatro grupos recebem os nomes de CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12, as septinas pioneiras descobertas por Hartwell. O último grupo, presente apenas em alguns fungos, recebeu o nome de ASPE (Figura 17).

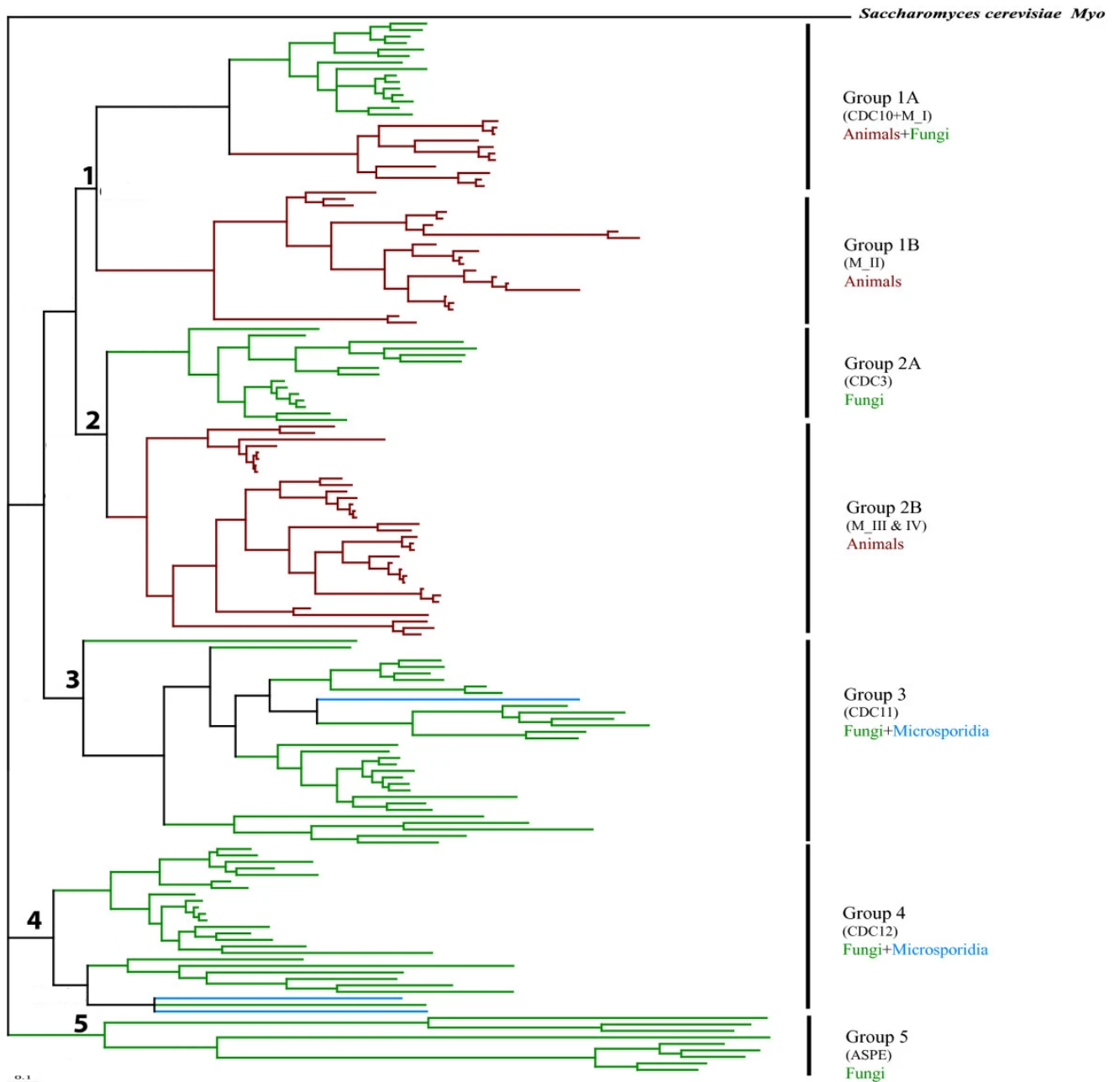


Figura 17 - A evolução de septinas e a divergência em cinco grandes grupos. Em vermelho estão as septinas animais e em verde aquelas encontradas em fungos. Em azul as septinas que são encontradas em microsporídia, também fungos.

Fonte: PAN *et al.* ¹⁸

Nota-se que, segundo o trabalho, cada septina presente no filamento encontrado em levedura provém de um grupo diferente. Assim nota-se que em consideração a Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12, embora cada uma delas tenha trilhado um caminho evolutivo diferente, é possível que justamente essa divergência seja a responsável pela especificidade da ordem do filamento e das interações que ocorrem entre os diferentes monômeros.

Também merece certa atenção que o trabalho traga que todas as septinas existentes nos animais sejam oriundas apenas de dois ancestrais: os clados onde se encontra Cdc10 e Cdc3 (1 e 2 na Figura 17). Como já mencionado, as septinas adquirem graus extras de complexidades em seres vivos mais derivados, como a espécie humana. A título de exemplo, humanos possuem treze septinas diferentes e que muitas vezes são tecido-específicas.⁴⁴ Além do mais, o *splicing* alternativo aumenta ainda mais as possibilidades de combinações.⁴⁵

Ainda sobre as septinas animais, observa-se que proteínas inseridas no grupo 1B não apresentam atividade catalítica. Em septinas de levedura, cujos nomes batizaram alguns desses grupos, tanto Cdc11 quanto Cdc3 não apresentam atividade catalítica⁸ e a expressão heteróloga destas em *Escherichia coli* resulta em proteínas na forma apo, não ligada a nucleotídeo¹. Com base na hidrólise de GTP seria sensato esperar que as septinas animais não catalíticas estivessem agrupadas dentro do clado que inclui Cdc3, a septina fúngica mais relacionada ao grupo animal. Porém, o grupo 1B está associado por essa análise ao clado onde Cdc10 está presente, uma septina capaz de catalisar a reação de GTP a GDP. Assim, pode ser inferido que as septinas animais sem atividade catalítica derivaram de um grupo cuja catalise já existia e se perdeu, ao invés de serem aparentadas a um grupo marcado pela ausência de atividade GTPase. Além do mais, os filamentos de septinas humanas e de leveduras, organismos muito distantes filogeneticamente, possuem em sua composição tanto monômeros com atividade GTPase quanto monômeros sem essa atividade. Porém não é sabido se isto é apenas um processo estocástico ou se houve evolução convergente ao longo do processo evolutivo, onde os protofilamentos seriam ou mais estáveis ou teriam melhor afinidade com a septina parceira adequada.

1.4 As septinas de levedura e a formação do filamento

Em *S. cerevisiae* existem sete diferentes genes que codificam para septinas: CDC3, CDC10, CDC11, CDC12, SHS1, SPR3 e SPR28.⁴³ Destas, apenas as duas últimas não estão envolvidas com a formação de filamentos em células vegetativas.⁴³ Estas proteínas podem ser classificadas em quatro grupos, cujos nomes se referem às septinas presentes no filamento canônico (Tabela 2).

Tabela 2 - As sete septinas encontradas em leveduras podem ser classificadas dentro de quatro grupos a partir de uma análise da sequência de aminoácidos.

As septinas de *Saccharomyces cerevisiae* e seus grupos

Cdc3	Cdc10	Cdc11	Cdc12
Cdc3	Cdc10	Cdc11	Cdc12
		Shs1	Spr3
		Spr28	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em células vegetativas, quatro dessas septinas se arranjam em octâmeros lineares, que se polimerizam para formar filamentos não polares de maior complexidade.¹⁷ Essas proteínas formam o *core* onde Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 se arranjam como a unidade basal para a formação de filamentos maiores^{46,47} (Figura 18).

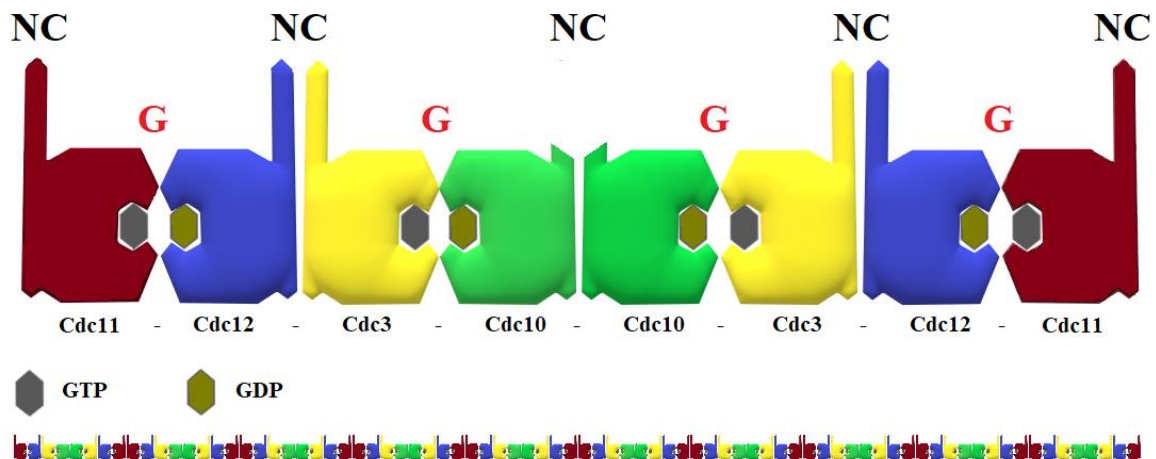


Figura 18 - O octâmero de septinas presentes em leveduras capaz de formar filamentos maiores (rodapé) é composto pelas proteínas Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 nesta exata sequência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O octâmero canônico encontrado em células vegetativas de *S. cerevisiae* é composto por quatro proteínas que se repetem, com uma simetria de ordem dois no centro do

octâmero.¹⁷ Esse protofilamento possui cerca de 4nm de largura e 32nm de comprimento, além de que, diferentemente do que os modelos ilustrativos levam a crer, possui certa maleabilidade (Figura 19.A), o que lhe confere a capacidade de se curvar para interagir com a membrana.⁴⁸⁻⁴⁹ Os diferentes monômeros intercalam contatos entre interfaces G e NC, com a peculiaridade a respeito ao estado do nucleotídeo de guanina encontrado no NBP devido à presença ou ausência de atividade GTPase (Figura 18). Assim, espera-se que se encontre GDP ligado às proteínas Cdc10 e Cdc12, e GTP ligado à Cdc3 e Cdc11, incapazes de atividade catalítica.

Num trabalho muito elegante, BERTIN *et al.*¹⁷ demonstrou por meio de microscopia eletrônica e se valendo de deleções e marcadores (Anticorpos, GFP e MBP) a ordem do filamento leveduriano. Ao eliminar as proteínas Cdc11 (Figura 19.B) e Cdc10 (Figura 19.C) em diferentes experimentos, os autores observaram a formação de hexâmeros e trímeros respectivamente. Já outros marcadores foram os responsáveis por revelar as posições de Cdc3 (Figura 19.D) e Cdc12 (Figura 19.E).

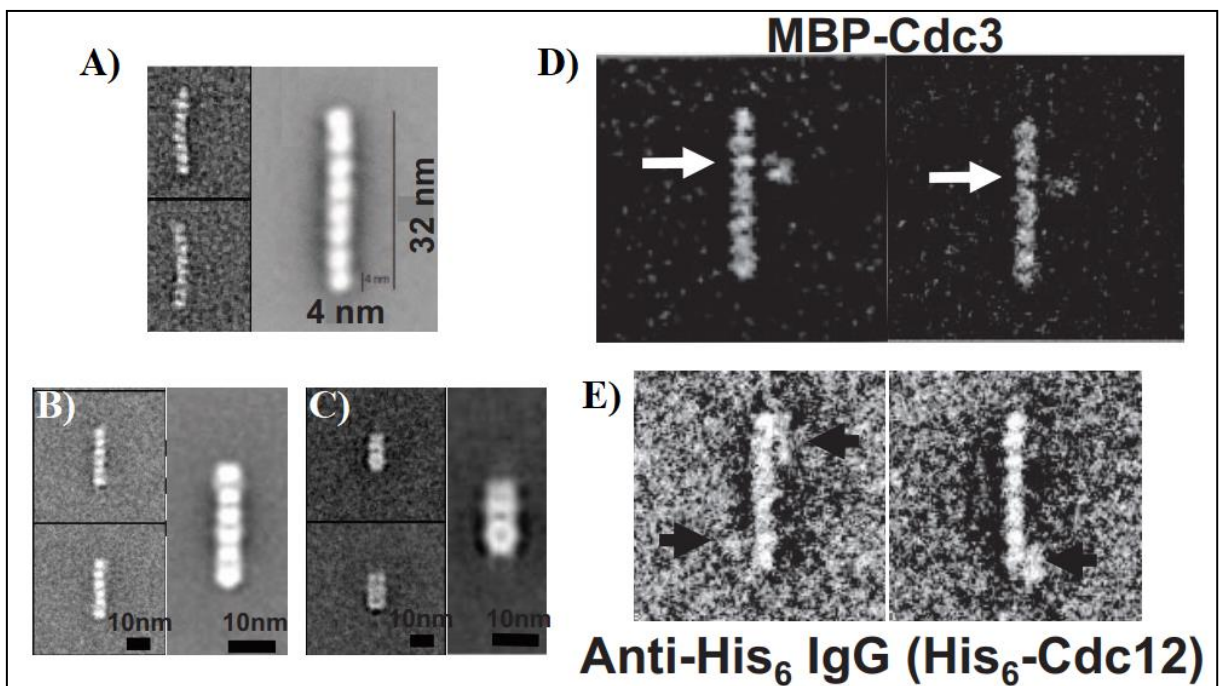


Figura 19 - O protofilamento existente em *S. cerevisiae* mostrando a presença de oito monômeros, além de certa curvatura desta estrutura (A). Deleções de Cdc11 (B) e Cdc10 (C) indicam as proteínas que ocupam as extremidades e o centro deste octâmero. Cdc3 marcada com MBP (D) e anticorpos contra a cauda de histidina presente em Cdc12 (E) revelaram as posições das duas última septinas restantes.

Fonte: Adaptado de BERTIN *et al.*¹⁷

Desvendadas as posições destas quatro proteínas é possível estabelecer quais são os contatos existentes entre as septinas dentro do octâmero. Cdc11 se localiza nas extremidades

deste protofilamento, exibindo para o contato uma interface NC (Figura 18). Esta extremidade então é capaz de interagir com outro octâmero, culminando no alongamento do filamento.

De fundamental importância é o C-terminal das septinas Cdc12 e Cdc3. Estas interagem por meio de uma interface NC, provavelmente formando um *coiled coil* entre ambas as proteínas. Essa superhélice torna possível a interação dessas duas septinas que são imprescindíveis na viabilidade das leveduras.⁸

Ainda sobre esse mesmo tipo de interação, na porção central do octâmero se encontra Cdc10 (Figura 18), que diferentemente das outras proteínas septinas presentes, possuem um C-terminal curto, incapaz de formar *coiled coils*. Entretanto, isso não impede a polimerização entre dois monômeros também através de uma interface NC.

Todos os outros contatos dentro do octâmero canônico (Cdc11-Cdc12 e Cdc3-Cdc10) são feitos por meios de interfaces G, onde são encontrado GTP ou GDP, dependendo da presença de atividade GTPase. A relevância desta catálise ainda é alvo de estudos, uma vez que septinas que apresentam mutações que inviabilizam a hidrólise de GTP não comprometem a sua devida função celular na formação de filamentos.⁸

Numa outra versão do octâmero canônico, Cdc11 pode ser substituída pela septina Shs1 (*Seventh Homolog of Septin*) nas extremidades do complexo (Figura 20), de maneira que ainda é incerto qual o nucleotídeo que poderia ser encontrado no NBP desta proteína. Esse octâmero, diferentemente da versão onde Cdc11 ocupa as extremidades do protofilamento, não polimeriza com outros protofilamentos de septinas de maneira lateral⁵⁰.

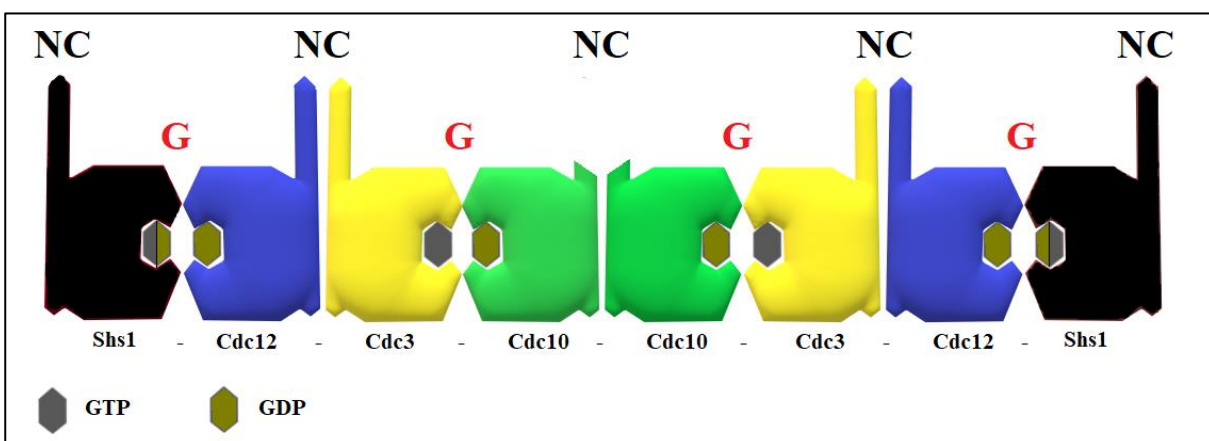


Figura 20 - O octâmero canônico de septinas de leveduras pode apresentar uma substituição do monômero presente nas extremidades, onde Shs1 ocupa o lugar de Cdc11.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apresentados ambos os protofilamentos, a dúvida sobre qual destes assume um papel preponderante se torna imediata. Além do mais, pode-se perguntar quais as condições que favorecem Cdc11 ou Shs1 nas extremidades.

Tendo em vista essas questões, se torna fundamental tentar entender como se dá o acoplamento de cada monômero dentro do protofilamento. O que o modelo mais atual sugere é que o estado do nucleotídeo ligado à Cdc12 (GTP ou GDP) é a característica chave que seleciona entre os dois tipos de octâmeros. ²¹

Começando pela via que leva a Cdc11 nas extremidades, temos dois eventos independentes que culminam mais adiante na formação deste octâmero. Um é a hidrólise de GTP por Cdc10, que leva a sua dimerização. O outro é a permanência de GTP no NBP de Cdc12 por um longo período. Neste caso, o complexo Cdc12-GTP é capaz de ligar-se a Cdc11, que pode apresentar GDP no seu interior devido a um impedimento estérico devido a um resíduo que é incompatível com a presença do fosfato gama do GTP ¹. Formado o dímero Cdc11-GDP/Cdc12-GTP, o último pode em determinado instante hidrolisar o seu nucleotídeo, o que parece aumentar a sua afinidade pela interface NC de Cdc3.

A septina Cdc3 apresenta um N-terminal mais longo que talvez possa obstruir a sua interface G para a livre interação com Cdc10. A liberação de GTP presente em Cdc12, que agora interage de maneira mais eficiente com a interface NC de Cdc3, pode levar ao deslocamento deste N-terminal de Cdc3, que bloqueava previamente o seu NBP. Deste modo, ao fim do processo se forma um trímero em que Cdc3 finalmente está com sua interface G exposta, tornando possível a interação com o dímero de Cdc10 inicial, culminando no arranjo octamérico cujas extremidades são ocupadas por Cdc11 (Figura 21).

Num outro cenário, Cdc12 poderia hidrolisar o seu GTP antes de formar um dímero com Cdc11. Neste caso, Cdc12-GDP fica apto a interagir com Cdc3 sem se associar a Cdc11, formando um complexo Cdc12-GDP/Cdc3-GTP. Dessa maneira, esse dímero se apresentaria com duas interfaces G expostas, podendo o dímero de Cdc10 interagir com a interface G de Cdc3, e Shs1 interagir com a interface G de Cdc12. Desta maneira é possível se formar um octâmero cujas extremidades possuem a septina Shs1.

De posse desse modelo, torna-se preponderante o papel de Cdc12 na seleção do octâmero tanto como a variedade do nucleotídeo de guanina encontrado dentro de seu NBP. Entretanto, um modo de controle superior a este pode ser adereçado quando se questionam quais os processos celulares que influenciam a hidrólise do nucleotídeo. Num contexto onde GTP intracelular é abundante, a permanência desta forma trifosfatada no interior de Cdc12 é favorecida, levando ao caminho que conta com a predileção de Cdc11. Já diminuindo a razão

GTP/GDP, a forma difosfatada do nucleotídeo em Cdc12 é favorecida, culminando na preferência de um octâmero com a participação de Shs1.²¹ Portanto, processos celulares que alteram a razão entre as formas trifosfatadas e difosfatadas do nucleotídeo acabam por determinar a preferência entre os dois tipos de octâmero.

Também existem diferenças estruturais marcantes entre estes dois octâmeros, embora ambos apresentem mesmo comprimento e largura.⁵⁰ Enquanto o que conta com a presença de Cdc11 é capaz de formar filamentos mais longos pela adição de outros octâmeros à sua extremidade, a versão com Shs1 não o faz, de forma que apenas as interações laterais que culminam em anéis concêntricos são possíveis quando este tipo de octâmero está presente nas extremidades (Figura 22).⁵⁰ Além do mais, Shs1 pode interagir no recrutamento de outras proteínas parceiras, como Myo1, Iqg1 e Cyk3, presentes tanto no anel contrátil de actina (envolvido na citocinese) e na formação do septo que ocorre durante o brotamento.⁵¹

Desta forma, é possível que a seleção entre os diferentes octâmeros seja guiada pelo processo celular do momento e conduzido pelo fino equilíbrio entre GTP/GDP, em que haja necessidades que só possam ser supridas quando Cdc11 ou Shs1 ocupam a extremidade do protofilamento.

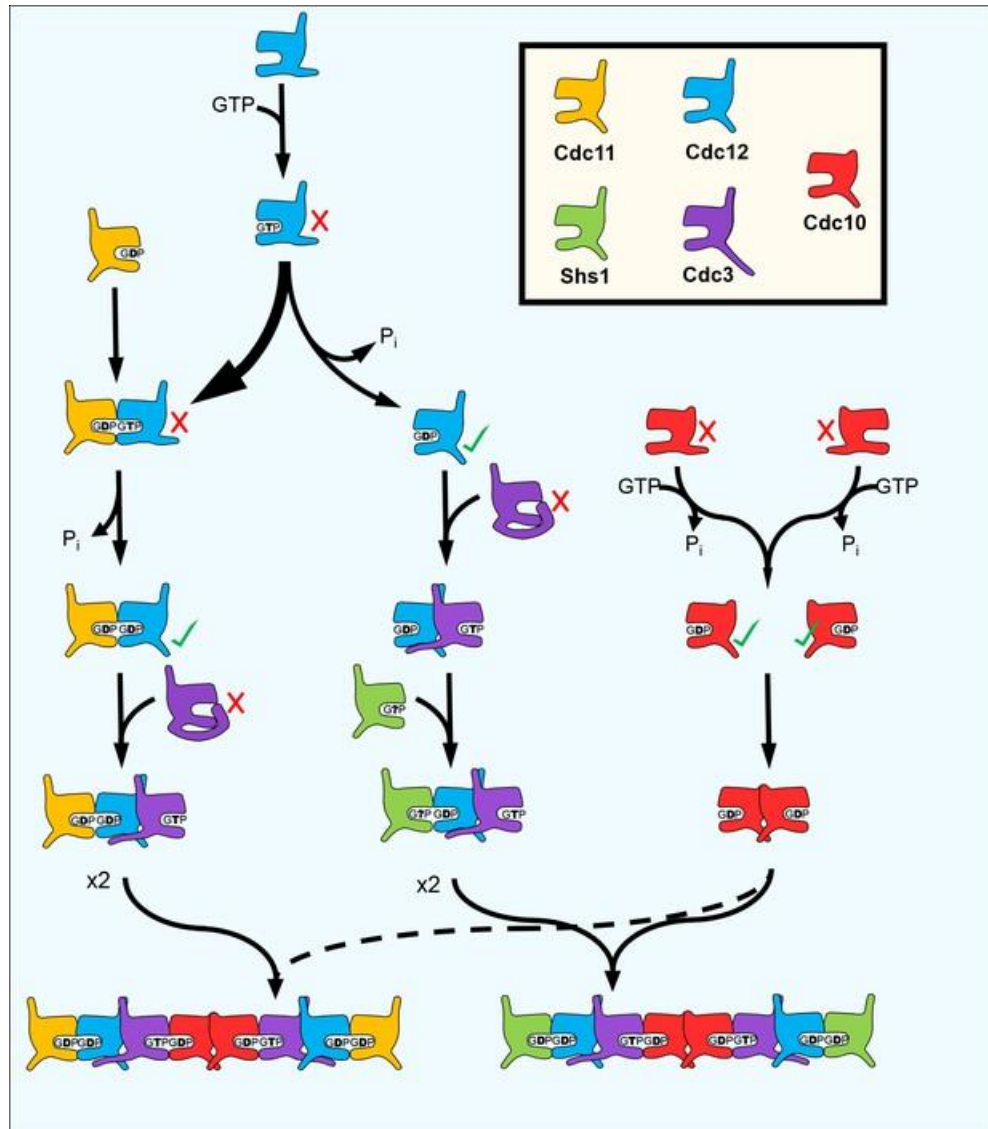


Figura 21 - Modelo sobre a montagem passo a passo de dois diferentes octômeros de septinas em *S. cerevisiae*.
Fonte WEEMS & MCMURRAY ²¹.

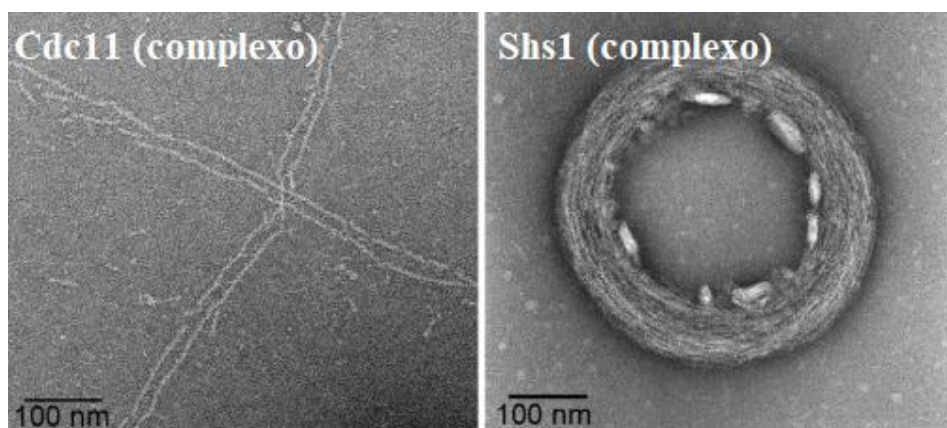


Figura 22 - Diferentes octômeros originam estruturas diversas. Sob baixas condições salinas, o octômero cuja extremidade possui Cdc11 forma longos filamentos, enquanto o que possui Shs1 apresenta anéis concêntricos e empacotados.

Embora existam poucos estudos sobre a importância de Shs1, estes são muito pontuais. Mutantes que não expressam Shs1 apresentem uma série de anomalias, mas que aparentemente só podem ser observadas sob condições restritivas.⁵¹ Ainda está para serem elucidadas todas as funções relacionadas a esta septina.

Outro octâmero também não canônico observado em leveduras ocorre durante o processo de esporulação. Estudos sugerem que em células reprodutivas, Spr28 e Spr3 assumem as posições relativas à Cdc11 e Cdc12 respectivamente.¹² Entretanto ainda pairam muitos questionamentos sobre o papel das septinas no processo de esporulação devido à escassez de trabalhos na área.

1.5 A estrutura cristalográfica de Cdc11

Pioneiras nos estudos que deram origem ao campo das septinas há cerca de cinquenta anos, as leveduras foram extensivamente fruto de pesquisa sobre suas funções dentro do aparato celular. Trabalhos que recorrentemente incluíram deleções e marcadores moleculares desvendaram muitos mecanismos da genética molecular em organismos basais, que puderam ser extrapolados para seres vivos de maior complexidade. Porém, informações estruturais sempre foram muito restritas em relação às septinas de *S. cerevisiae*, cuja primeira (e única) estrutura cristalográfica foi reportada apenas recentemente (Figura 23).¹ Ainda assim, muito pouca informação pode ser extraída devido à baixa resolução (2.85 Å) da estrutura depositada no banco de dados (PDB).

Munidos de outras estruturas cristalográficas de septinas humanas, o modelo de BRAUSMANN *et al.*¹ foi muito condizente em relação ao enovelamento observado em outras estruturas quanto à presença das estruturas secundárias e suas respectivas interações. No entanto, um olhar mais detalhado sobre esse modelo revela uma série de problemas técnicos que levantam suspeitas sobre a qualidade e confiabilidade desta estrutura. Dentre os quais podem ser destacados problemas de ordem cristalográfica, química, estatística, física e estrutural, que põem em cheque os dados obtidos e, por consequência, as conclusões resultantes.

De súbito chama à atenção a baixa qualidade dos parâmetros de validação desta estrutura cristalográfica (Figura 23, à direita). Em suma, esta representação gráfica que auxilia a entender quão confiável é um modelo derivado de um experimento de difração de raios-x, mostra uma comparação com outros modelos (diferentes proteínas com diferentes resoluções) presentes em todo um banco de dados. Sucintamente, quanto mais a esquerda pior é o modelo,

enquanto que quanto mais a direita, melhor este se torna. Situar-se ao centro indica que o modelo corresponde à média das estruturas depositadas (sendo as barras cheias uma comparação com todas as estruturas depositadas no banco de dados e as barras vazias uma comparação referente a modelos de resolução semelhante).

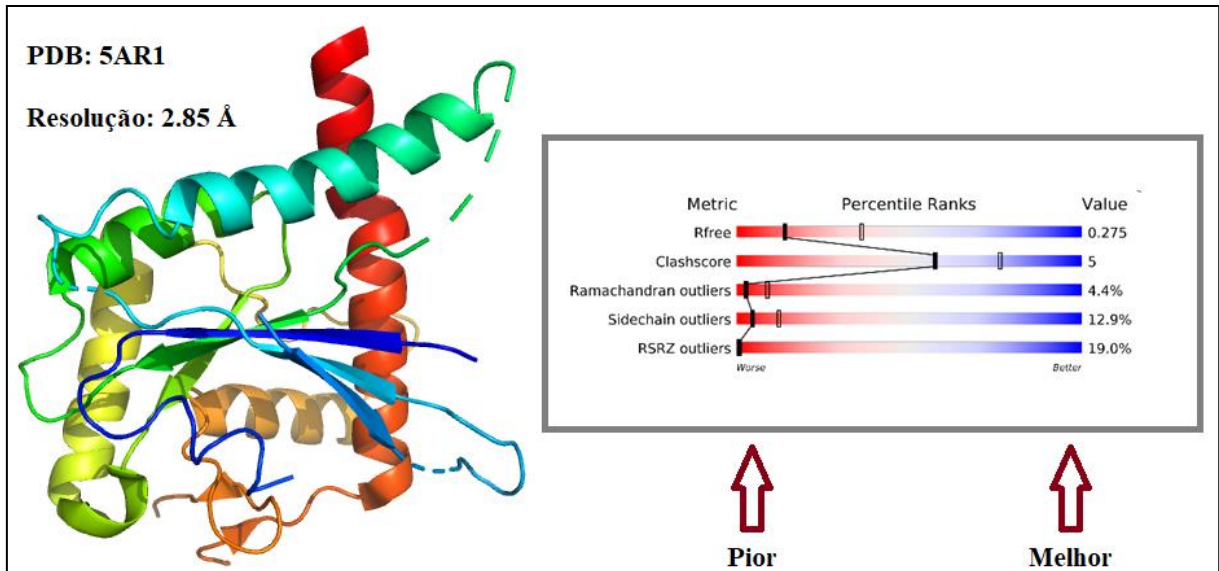


Figura 23 - Estrutura cristalográfica da septina de levedura Cdc11 (PDB 5AR1) acompanhada dos critérios de validação da mesma (à direita). A coloração do modelo (rainbow) indica o sentido entre o N-terminal (Azul) e o C-terminal (vermelho) da proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com exceção ao parâmetro conhecido como *clashscore*, que representa os choques estéricos resultantes de quando dois átomos ocupam a mesma posição no modelo produzido, todos os outros parâmetros situam-se próximos à extremidade esquerda (vermelho), que indica um modelo pior que a média.

Também se torna claro nesta estrutura que porções substanciais e conservadas desta septina não estão presentes, com especial destaque para os meandros encontrados na região SUE (Figura 24). A estrutura de Cdc11 não possui esta região, talvez em função da falta de ordem cristalina interna do cristal ou interpretação errônea da densidade eletrônica e/ou refinamento deficiente. A Figura 24 também apresenta uma região destacada (lado direito inferior) onde se observa uma densidade eletrônica em vermelho. Esta cor indica valores negativos para a diferença entre a densidade calculada a partir dos dados experimentais e a densidade predita pelo modelo. Ou seja, a forte densidade destacada em vermelho na figura a seguir indica que o modelo possui átomos em posições não condizentes com os dados experimentais.

De maneira a tornar mais evidente as incongruências mostradas no trabalho de BRAUSMANN *et al.*¹ a estrutura reportada neste estudo será repetidamente comparada a uma outra estrutura, a septina 10 de *Schistosoma mansoni* (PDB 4KVA),⁵² cujos parâmetros de validação estão dentro do esperado.

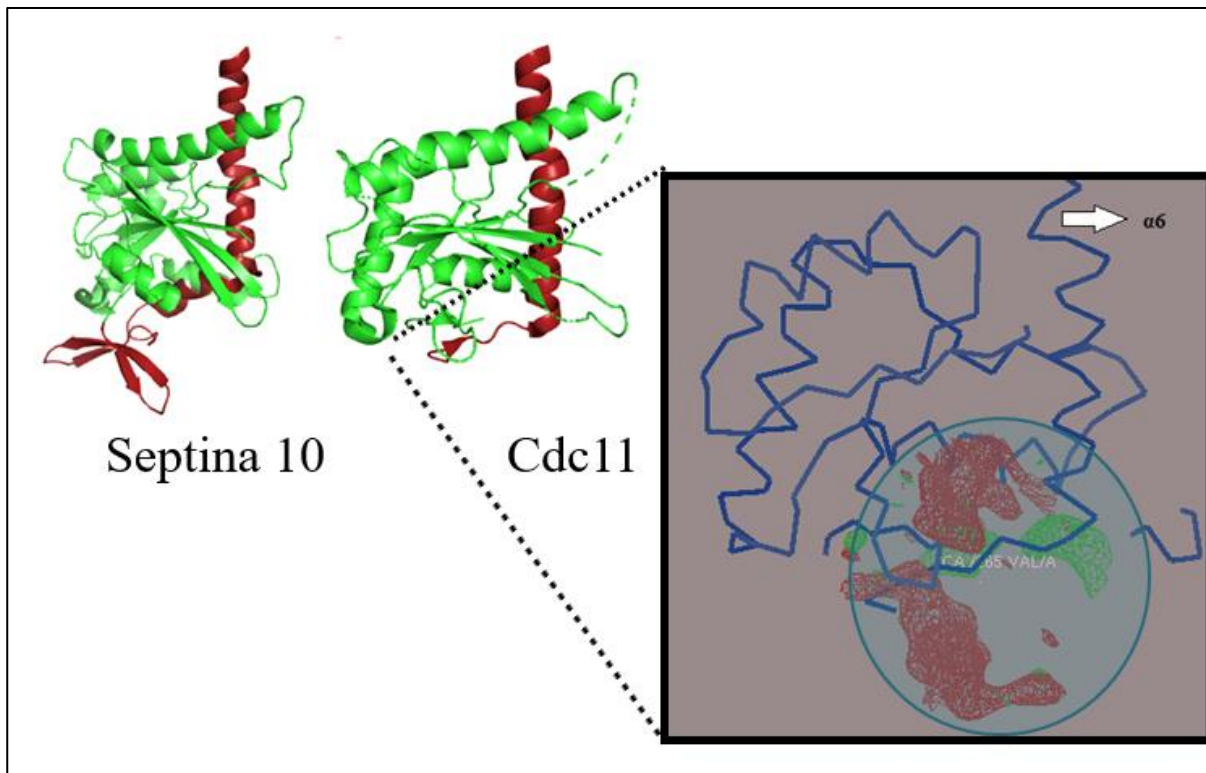


Figura 24 - Comparação entre duas estruturas cristalográficas de septinas. À esquerda está uma septina de *S. mansoni*, enquanto a direita se encontra Cdc11, de *S. cerevisiae*, onde tanto o meandro dentro do SUE e a hélice $\alpha 6$ foram coloridas em vermelho para auxiliar na identificação. Nota-se que na última, uma porção muito conservada não está presente no modelo final. Essa região possui um mapa negativo muito acentuado, o que sugere imprecisão do modelo para esta região.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outros parâmetros importantes de validação estereoquímica do modelo são as distribuições dos ângulos ϕ , ψ no diagrama de Ramachandran e rotâmeros inesperados para cadeias laterais (*sidechain outliers*). As combinações de ângulos ϕ e ψ permitidos são muito bem definidos, de maneira que grandes desvios destes valores culminam em impedimentos estéricos ou condições energéticas desfavoráveis. Embora seja comum às estruturas apresentarem alguns pontos fora das regiões permitidas, o modelo Cdc11 excede o razoável (Figura 25.A).

Outro aspecto incoerente do modelo proposto é a distribuição de fatores de temperatura (fator B) dos átomos, que indica o grau de desordem atômica. A estrutura de

Sept10 de *S. mansoni* apresenta uma distribuição normal dos fatores B, com regiões mais desordenadas (ou móveis) na superfície (vermelho) e regiões mais rígidas no interior da estrutura (azul). No caso do modelo reportado para Cdc11, a molécula tem uma distribuição muito estranha, onde parece possuir dois lados: um mais “quente” (vermelho) e outro mais “frio” (azul) (Figura 25.B). Além disso, o valor médio para os fatores de temperatura do modelo de Cdc11 foge muito do convencional. Geralmente uma estrutura proteica apresenta um b-factor médio em torno de 60 \AA^2 , com alguns pontos apresentando ligeira variação destes valores. O modelo apresentado por BRAUSMANN *et al*¹ possui um b-factor médio de $167,4 \text{ \AA}^2$, além de uma clara distinção entre as duas faces da molécula, com enormes diferenças em relação aos fatores de temperatura, algo que não faz sentido físico.

Por fim, existem valores estatísticos esperados em função da resolução da estrutura cristalográfica. Dois valores que se destacam entre estes são chamados *R-free* e *R-value work*. Pode-se dizer que existe uma correlação entre ambos, sendo o *R-free* geralmente um pouco maior que o *R-work*. Entretanto, modelo de Cdc11 apresenta valores muito similares para ambos, o que provoca estranheza (Figura 25.C) e sugere algo de errado durante o processo de refinamento da estrutura.

Embora a estrutura cristalográfica de Cdc11, a única septina de levedura a possuir uma estrutura até o momento, seja algo que tenha gerado grande visibilidade²¹ neste campo de estudo, é possível dizer que os parâmetros estruturais oriundos desta estão muito aquém do desejado e adicionam pouco às discussões pré-existentes.

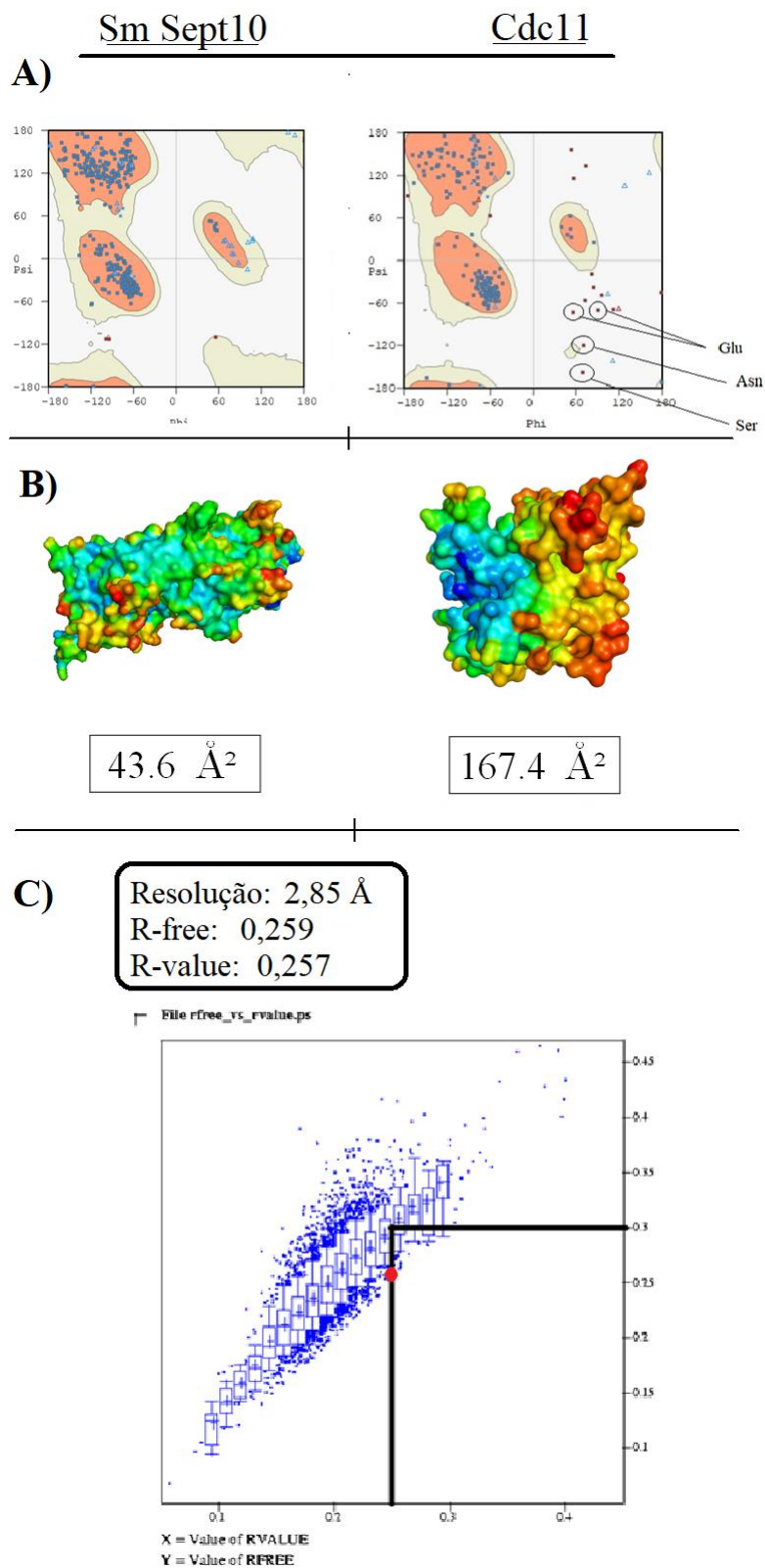


Figura 25 - Comparação entre parâmetros de validação das estruturas cristalográficas das septinas Cdc11 e Sept10. Os gráficos de Ramachandran mostram a quantidade de resíduos dentro de ângulos permitidos (A), onde Cdc11, à direita, possui muitos resíduos conflitantes. Os fatores de temperatura (B) também revelam um comportamento anômalo de Cdc11, que possui valores muito altos de b-factor. Em (C) o gráfico de R-Value x R-Free mostra que a estrutura depositada possui um valor díspar para R-Free (ponto vermelho), cujo valor esperado era o de aproximadamente 0,30.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Determinar as propriedades físicas, químicas e estruturais das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 de *S. cerevisiae* no intuito de melhor compreender o comportamento dessas proteínas quando isoladas ou em complexos (dímeros), possibilitando compará-las com as septinas humanas.

2.2 Objetivos específicos

_ Expressão heteróloga do domínio GTPase das septinas de levedura Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 em *Escherichia coli* com uso do plasmídeo pET-15b.

_ Co-expressão heteróloga do domínio GTPase das septinas de levedura Cdc11/Cdc12 e Cdc3/Cdc10 em *Escherichia coli* com o uso do plasmídeo pETDuet.

_ Purificação do domínio GTPase das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 e também dos dímeros Cdc3/Cdc10 e Cdc11/Cdc12 por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular.

_ Confirmação das etapas de purificação das quatro septinas citadas por meio de espectrometria de massas.

_ Determinação da presença de nucleotídeos de guanina e também da natureza destes (GTP ou GDP) nas septinas purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

_ Determinação do estado oligomérico das septinas expressas isoladamente ou em co-expressão por calibração da coluna de SEC ou por meio de *Multi Angle Light Scattering* associado à *Size Exclusion Chromatography (SEC-MALS)*

_ Estimativa da temperatura de *melting* (T_m) das septinas expressas com o uso da tecnologia de dicroísmo circular associada à desnaturação térmica

_ Tentativa de cristalização dos monômeros do domínio GTPase das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 e dos dímeros Cdc3/Cdc10 e Cdc11/Cdc12.

_ Difração dos cristais proteicos por feixes de raios-X de alta intensidade em síncrotrons brasileiros ou estrangeiros.

_ Resolução das estruturas difratadas pelo método de substituição molecular ou por faseamento experimental.

3 METODOLOGIA

3.1 Escolha dos alvos

Visando a cristalização das septinas selecionadas e também buscando maior similaridade com o trabalho de BRAUSSMAN *et al*¹, uma busca na base de dados UniprotKB indicou as sequências de nucleotídeos necessárias para a expressão dos domínios GTPase das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 e também para a co-expressão dos domínios GTPase de Cdc3/Cdc10 e Cdc11/Cdc12. Para diferenciar as proteínas utilizadas neste trabalho das septinas inteiras, que possuem os domínios N-terminal e C-terminal, as septinas deste estudo incluirão o sufixo “(G)” logo após serem mencionadas, para indicar que correspondem apenas ao domínio GTPase.

Em casos em que não ocorreu a co-expressão, as sequências possuíam em seu N-terminal a sequência de aminoácidos AMASTAENLYFQG, logo após a cauda de histidina (*His-tag*), de acordo com trabalhos anteriores.¹ Esta sequência inicial possui um sítio de clivagem para a proteína TEV-protease (ENLYFQ(X) para os casos em que poderia ser necessária a separação da *His-tag* do restante da proteína.

Para os casos que envolviam a co-expressão das septinas, optou-se por inserir a *His-tag* apenas nas sequências que codificavam Cdc11(G) e Cdc3(G), neste caso não sendo inserido nenhum sítio de clivagem entre as proteínas e seus iniciadores.

Foram usados os plasmídeos vetores pET-15b (quando ocorreu a expressão de apenas uma proteína alvo) e pETDuet (nos casos de co-expressão) para os processos posteriores. Estes plasmídeos foram sintetizados pela empresa Genscript, dispensando o uso de etapas de clonagem e subclonagem.

As sequências de aminoácidos utilizadas no trabalho podem ser conferidas na tabela a seguir:

Tabela 3 - As proteínas utilizadas neste trabalho, que correspondem apenas ao domínio GTPase das septinas de levedura, e suas sequências proteicas. Para as septinas expressas sem a parceira foi utilizado plasmídeo pET15-b como vetor, enquanto que as co-expressões foram feitas a partir do pETDuet.

Nome	Vetor	Sequência (aminoácidos)
Cdc3(G)	pET-15b	MGSSHHHHHHSSAMASTAENLYFQGGFSFNLLCVGPDGIGKTTLMKTLFNND DIEANLVKDYEEELANDQEEEEEGQGEGHENQSQEQRHKVKIKSYESVIEENGV KLNLNVIDTEGFGDFLNNDQKSWDPIIKEIDSRFDQYLDAENKINRHSINDKRIH ACLYFIEPTGHYLLKPLDLKFMQSVYEKCNLIPVIAKSDILTDEEILSFKKTIMNQL IQSNIELFKPPIYSNDDAENSHLSERLFSSLPYAVIGSNDIVENYSGNQVRGRSYP WGVIEVDNDNHSDFNLLKNLLIKQFMEELKERTSKILYEMYRSSKLAK
Cdc10(G)	pET-15b	MGSSHHHHHHSSAMASTAENLYFQGGFQFNIMVVQSGGLGKSTLINTLFASHL IDSATGDDISALPVTKTTEMKISTHTLVEDRVRLNINVIDTPGFGDFIDNSKAW PIVKYIKEQHSQYLKELTAQRERFITDTRVHAILYFLQPNGKELSRDLVEALKR LTEIANVIPVIGKSDTLTDERTEFRELIQNEFEKYNFKIYPYDSEELTDEEELN RSVRSIIPFAVVGSENEIEINGETFRGRKTRWSAINVEDINQCDFVYLREFLIRTH LQDLIETTSYIHYEGFRARQLIA
Cdc11(G)	pET-15b	MGSSHHHHHHSSAMASTAENLYFQGGITFTVMIVGQSGSGRSTFINTLCGQQV VDTSTTILLPTDTSTEIDLQREETVELEDDEGVKIQLNIIDTPGFGDSLNSPSFE IISDYIRHQYDEILLEESRVRNPRFKDGRVHCCLYLINPTGHGLKEIDVEFIRQL GSLVNIIPVISKSDSLTRDELKLNKKLIMEDIDRWNLPIYNFPFDEDEISDEDYET NMYLRITLLPFAIIGSNEVYEMGGDVGITIRGRKYPWGILDVEDSSISDFVILRNAL LISHLHDLKNYTHEILYERYRTEALSG
Cdc12(G)	pET-15b	MGSSHHHHHHSSAMASTAENLYFQGGTFTVMMLCGESGLGKTTFINTLFQTVL KRADGQQHRQEPPIRKTVEIDITRALLEEKHFELRVNVIDTPGFGDNVNNNKAW QPLVDFIDDQHDSYMRQEQQPYRTKKFDLRVHAVLYFIRPTGHGLKPIDIETMK RLSTRANLIPVIAKADTLTAQELQQFKSRIRQVIEAQEIRIFTPPLDADSKEDAKS GSNPDSAAVEHARQLIEAMPFAIVGSEKKFDNGQGTQVVARKYPWGLVEIEND SHCDFRKLRLALLLRTYLLDLISTTQEMHYETYRRLRLEG
Cdc3(G)	pETDuet	MGSSHHHHHHSSQDPSFNLLCVGPDGIGKTTLMKTLFNNDIEANLVKDYEEEL ANDQEEEEEGQGEGHENQSQEQRHKVKIKSYESVIEENGV KLNLNVIDTEGFGDFLNNDQKSWDPIIKEIDSRFDQYLDAENKINRHSINDKRIH ACLYFIEPTGHYLLKPLDLKFMQSVYEKCNLIPVIAKSDILTDEEILSFKKTIMNQL IQSNIELFKPPIYSNDDAENSHLSERLFSSLPYAVIGSNDIVENYSGNQVRGRSYP WGVIEVDNDNHSDFNLLKNLLIKQFMEELKERTSKILYENYRSSKLAK

Cdc10(G)	MADLNCGFQFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFASHLIDSATGDDISALPVTKTTEM KISTHTLVEDRVRLNINVIDTPGFGDFIDNSKAWEPVIVKYIKEQHSQYLRKELTA QRERFITDTRVHAILYFLQPNGKELSRLDVEALKRLTEIANVIPVIGKSDTLTLDE RTEFRELIQNEFEKYNFKIYPYDSEELTDEEELNRSVRSIIPFAVVGSENEIEING ETFRGRKTRWSAINVEDINQCDFVYLREFLIRTHLQDLIETTSYIHYEGFRARQLI A
Cdc11(G)* pETDuet	MGSSHHHHHSQDPNSSGITFTVMIVGQSGSGRSTFINTLCGQQVVDSTSTILL PTDTSTEIDLQLREETVELEDDEGVKIQLNIIDTPGFGDSDLNNSPFEIISDYIRHQ YDEILLEESRVRNRPRFKDGRVHCCLYLINPTGHGLKEIDVEFIRQLGSLVNIIPV ISKSDSLTRDELKLNKKLIMEDIDRWNLPIYNFPFDEDEISDEDYETNMYLRLL PFAIGSNEVYEMGGDVGITIRGRKYPWGILDVEDSSISDFVILRNALLISHLHDL KNYTHEILYERYRTEALSG
Cdc12(G)	MADLGGTFTVMLCGESGLGKTTFINTLFQTVLKRADGQQRQPIRKTVEIDIT RALLEEKHFELRVNVIDTPGFGDNVNNKAWQPLVDFIDDQHDSYMRQEQQP YRTKKFDLRVHAVLYFIRPTGHGLKPIDIETMKRLSTRANLIPVIAKADTLTAQE LQQFKSRIRQVIEAQEIRIFTPPLDADSKEDAKSGSNPDSAAVEHARQLIEAMPF AIVGSEKKFDNGQGTQVVARKEYPWGLVEIENDSHCDFRKLRLALLRITYLLDLI STTQEMHYETYRRLRLEG

A septina Cdc11(G) expressa a partir do pETDuet, quando não eluída com a septina parceira Cdc12(G), foi denominada Cdc11(G) por ser pouco diferente da septina Cdc11(G) presente no plasmídeo pET-15b, que possui um sítio TEV protease e alguns resíduos a mais entre a His-tag e o início do domínio GTPase (SAMASTAENLYFQG).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Produção de células competentes

Uma amostra de *E.coli* não competente foi incubada em 5 mL de meio LB (*liquid broth*) líquido *overnight*, sob 37 °C e agitação constante. Crescidas as células, 500 µL desta solução foi transferida para 50 mL de meio LB num tubo *Falcon*, que também foi mantido a temperatura de 37 °C e agitação constante até que essa solução atingisse a densidade óptica (D.O.) entre 0,3 e 0,4.

Logo após, o tubo foi colocado no gelo entre 5 a 10 minutos para que em seguida a cultura celular fosse centrifugada por 7 minutos, a 4 °C e 3000 rpm, para que as células fossem decantadas, sendo o sobrenadante descartado.

As células foram ressuspensas levemente em 10 mL da solução A gelada. Esta cultura foi então centrifugada novamente por 5 minutos, a 4 °C e 2500 rpm, para que novamente as células decantassem, sendo o *pellet* mantido no gelo por mais 30 minutos e descartando-se o sobrenadante. Em seguida, repetiu-se esse passo de ressuspender as células em 10 mL e centrifugar em sequencia, sendo por fim a cultura celular ressuspensa em apenas 2 mL da solução A, antes de ser reservada em alíquotas menores e estocadas no freezer -80°C, prontas para serem utilizadas. As soluções empregadas durante o processo de quimio-competência estão descritas a seguir (Tabela 4).

Tabela - 4 As soluções utilizadas no processo de competência celular.

Meio LB (<i>liquid broth</i>) pH 7,0	Solução A pH 7,0
10 g/ L de triptona	60 mM CaCl ₂
5 g/L de extrato de levedura	10 mM MOPS
10 g/L de cloreto de sódio	Glicerol 15%

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Transformação

A transformação se deu em duas cepas de *Escherichia coli*: Rosetta (DE3), quando o intuito era expressão das proteínas, ou em DH5- α , quando o objetivo era a replicação do plasmídeo.

O método utilizado foi o choque térmico, onde células quimiocompetentes (aproximadamente 50 μ L) foram incubadas com 2 μ L de plasmídeo em concentração superior a 50 ng/ μ L por 30 minutos dentro do gelo. A seguir, as células permaneceram num banho-maria ajustado a 42 °C por 90 segundos, sendo levadas novamente ao banho de gelo por mais 5 minutos. Logo após, 250 mL de meio LB foi adicionado ao microtubo com as células, que permaneceram num agitador (*shaker*) por 1 hora e 30 minutos, à temperatura de 37 °C e com velocidade de rotação moderada (90 rpm).

As células transformadas com os plasmídeo pET-15b ou pETDuet foram cultivadas em placa de Petri contendo 15 mL de meio ágar LB e os antibióticos Ampicilina 50 μ g/mL e Cloranfenicol 34 μ g/mL, quando a transformação se deu em Rosetta (DE3). O primeiro

antibiótico é usado como controle na transformação, uma vez que esses plasmídeos conferem resistência à Ampicilina. Já o segundo é característico da própria cepa, assegurando maior controle no crescimento das bactérias desejadas sobre a placa. Quando a transformação ocorreu na cepa DH5- α , apenas Ampicilina foi adicionada a placa de Petri.

As diferentes placas, cada uma contendo as células transformadas com os genes CDC3(G), CDC10(G), CDC11(G) ou CDC12(G) (quando expressas separadamente), ou com CDC3(G)/CDC10(G) e CDC11(G)/CDC12(G) (quando co-expressas), foram então deixadas na estufa *overnight*, sob a temperatura de 37 °C para o crescimento das diferentes colônias.

3.4 Expressão e purificação

Crescidas as colônias (Rosetta (DE3)), elas então foram pinçadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB, Ampicilina 50 $\mu\text{g/mL}$ e Cloranfenicol 34 $\mu\text{g/mL}$, onde permaneceram *overnight* a 37 °C, sob agitação constante.

Após este período, os pré-inóculos foram transferidos para Erlenmeyers contendo cada um 1 L de meio LB, nas mesmas concentrações já descritas anteriormente para os dois antibióticos. Os frascos permanecerem sob agitação constante de 150 rpm a 37 °C, até que as culturas atingissem a D.O. de $\cong 0,6$. Logo depois, uma alíquota de 1 mL de cada frasco foi reservada e congelada (amostra não induzida) e adicionou-se 300 μL ou 600 μL (no caso da co-expressão) do indutor IPTG 1 M (concentrações finais de 0.3 mM e 0.6 mM). A expressão se deu a temperatura de 18 °C, pelo mínimo de 16 horas e sob agitação contínua (150 rpm).

Terminada a etapa de expressão, as células foram então centrifugadas por 40 minutos, a 4 °C e 4658 g e o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (tabela 5) e esta mistura foi levada ao sonicador (Fisher Scientific®, modelo FB505) para a lise celular, que se deu com 12 pulsos de 30 segundos (30% de amplitude) intervalados por um minuto cada.

Feita a lise, as amostras foram centrifugadas uma vez mais por 45 minutos, a 20000 g e a 4 °C, para a separação da fração solúvel do *pellet* restante, este último composto majoritariamente de membranas, lipídios e proteínas insolúveis.

Tabela 5 - Reagentes da solução tampão para lise celular. * 150 mM de NaCl foi utilizado neste tampão de lise quando ocorreu co-expressão de septinas.

Tampão de lise (pH 8,0)
25 mM HEPES
500 mM Cloreto de Sódio*
5 mM Cloreto de Magnésio
50 mM Arginina
50 mM Glutamato
5 mM de β -mercaptoetanol
Glicerol 10%

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os diferentes sobrenadantes foram então primeiramente purificados por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (*IMAC*), onde cada amostra passa por uma resina contendo um metal (níquel ou cobalto) que interage com os grupos imidazólicos da His-tag presente nas proteínas de interesse (Figura 26 A). Utilizou-se uma coluna de 10 mL contendo 1 mL de resina Ni-NTA Agarose (Quiagen®), cujo metal presente é o níquel, ou uma coluna TALON®, onde se usa cobalto como cátion bivalente (esta usada apenas na purificação do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G)). Após a passagem da amostra, a resina foi lavada com 15 mL de tampão de lise e proteína purificada através de quatro passos de eluição seriada, onde o tampão de lise continha concentrações crescentes de Imidazol (50 mM – 10 mL, 100 mM – 5 mL e 200 mM – 5 mL x 2). A etapa de purificação por *IMAC* foi modificada para as proteínas Cdc12(G) e para os dímeros co-expressos. Para Cdc12(G) usou-se 20 mL de tampão na etapa de lavagem e a eluição se deu coletando frações de 1 mL, cujo processo se deu utilizando-se tampão com 200 mM de imidazol. Já para os dímeros optou-se também por uma etapa de lavagem com 20 mL de tampão, mas a eluição se deu em três etapas aplicando na coluna 10 mL de tampão com 200 mM de imidazol.

Eletroforese de gel *SDS-PAGE* 12% (um procedimento revelador que separa proteínas da amostra com base no seu tamanho) contendo as amostras retiradas após cada etapa de purificação, a amostra não induzida e também o *pellet* celular insolúvel, foram procedimentos

recorrentes para analisar a eficiência desta etapa, assim como a solubilidade das septinas expressas.

Uma etapa de purificação seguinte por *Size Exclusion Chromatography* (*SEC*), ou cromatografia de exclusão molecular, onde as proteínas atravessam uma fase estacionária composta por *beads* feitos de uma resina porosa e são separadas de acordo com o seu tamanho (Figura 26.B), foi feita para as amostras solúveis utilizando um sistema ÄKTA purifier GE® e uma coluna Superdex 200 10/300 GL (para separar monômeros) ou uma Superdex 200 16/70 (para separar dímeros de monômeros). Para confirmação dos picos obtidos e a qualidade desta purificação, as amostras separadas por *SEC* foram analisadas por gel de *SDS-PAGE*.

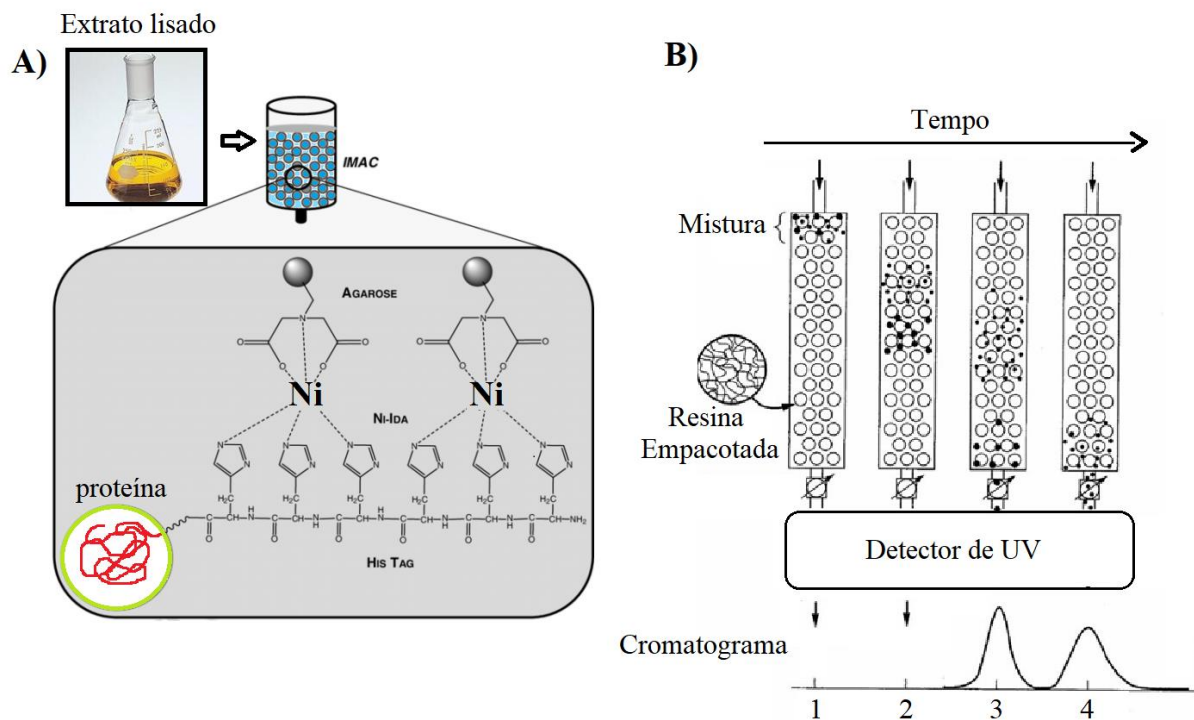


Figura 26 - Diferentes métodos de separação de proteínas. Na cromatografia de afinidade (A) os resíduos de histidina presentes na His-tag interagem com o metal imobilizado na resina. Já na *SEC*, as diferentes proteínas são separadas com base em seus tamanhos (B). A solução proteica passa por uma resina porosa, de modo que as proteínas maiores, incapazes de penetrar nos pequenos poros, são eluídas antes que as proteínas menores, que percorrem um caminho mais longo dentro da coluna.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Espectrometria de Massas

Como método suplementar a constatação das proteínas expressas, um espectrômetro de massas modelo micrOTOF-QII – Bruker Daltonics® foi utilizado para a identificação das

septinas. Embora tanto o peso molecular revelado nos géis *SDS-PAGE* quanto os perfis cromatográficos de *SEC* fossem compatíveis com as septinas desejadas, o procedimento de espectrometria de massas em tandem (*MS/MS*) confirmou a presença das septinas expressas isoladamente Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G). Para as proteínas co-expressas não se realizou o procedimento uma vez que se observou que o gel *SDS-PAGE* destes preparados continham duas bandas na fração eluída, fato possível apenas quando ambas as septinas capazes de interagir estivessem presentes, o que tornou o *MS/MS* desnecessário.

Basicamente, esta técnica consiste na identificação de pequenos fragmentos da proteína de interesse. Antes de ser injetada no espectrômetro, a proteína passa por um processo de digestão enzimática, que a fragmenta em pequenos oligopeptídeos. Esses peptídeos são então ionizados dentro do aparelho e, após serem quebrados em peptídeos ainda menores por ionização de eletrospray, são separados em função da sua razão massa/carga (m/z). Famílias de picos que diferem entre si por conta do ponto da fragmentação são geradas. As diferenças permitem a identificação da perda de aminoácidos específicos e daí o sequenciamento de pequenos fragmentos. A comparação destas sequências com bancos de dados permite a identificação de proteínas (Figura 27).

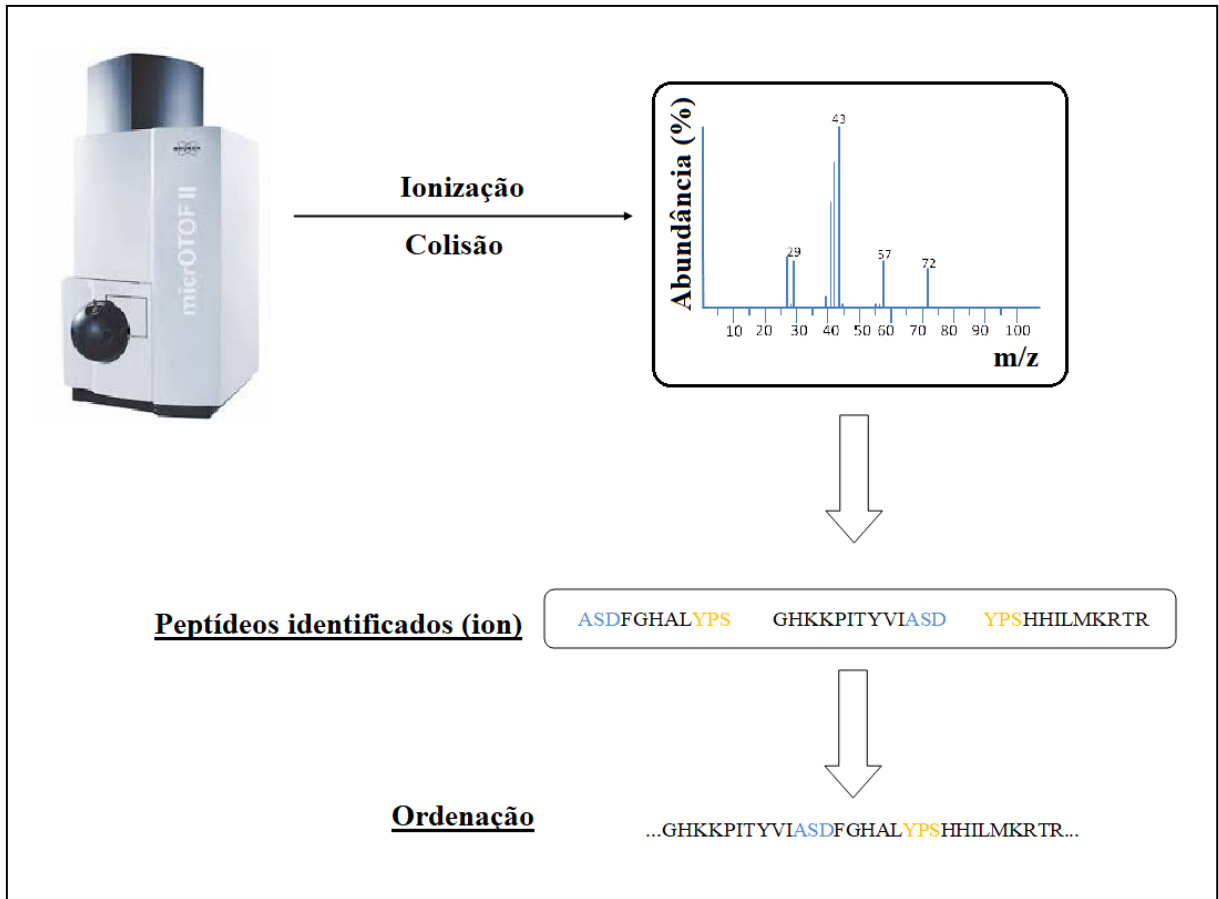


Figura 27- Esquema simplificado de uma espectroscopia de massas em tandem. A amostra tripsinizada é inserida no equipamento, que ioniza e quebra os peptídeos em fragmentos ainda menores, identificando-os com base na razão m/z. Estes são então ordenados para identificar a biomolécula.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante o procedimento, foram identificadas amostras tanto presentes em solução (tampão de lise) como também extraídas de gel *SDS-PAGE*.

Para identificação de amostra solúvel, esta foi incubada com diversas soluções, onde todos os reagentes foram diluídos em bicarbonato de amônio 100 mM (com exceção da tripsina, diluída em 50 mM de bicarbonato de amônio). Primeiramente 5 μ L de ditionitrotol (DTT) 10 mM foram adicionados à solução proteica, que permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 5 μ L de iodoacetamida (IAA) 50 mM à mistura, que permaneceu em ambiente escuro e temperatura ambiente por mais 30 minutos. Por fim, a tripsina na concentração 20 ng/ μ L foi incubada com a solução por 16 horas, a 37°C. Passado este tempo, foi adicionado ácido fórmico na concentração final de 1%, para parar a reação. As amostras então puderam ser analisadas no espectrômetro de massas.

No caso da extração de proteína de gel *SDS-PAGE*, um procedimento mais complexo, o protocolo necessitou de mais etapas.

Primeiramente, cortaram-se as bandas do gel a serem analisadas. Este fragmento com a amostra foi inserido num tubo com 0,5 mL de uma solução descorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5%, onde permaneceu por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, este passo foi repetido trocando-se a solução do tubo, onde desta vez foi preciso somente mais uma hora de incubação.

Passado este tempo, retirou-se essa solução descorante para que 0,2 mL de acetonitrila 100% fossem adicionados, numa etapa de desidratação que durou 5 minutos. Este passo foi repetido, descartando o sobrenadante e secando a amostra num evaporador ao final.

Na sequência adicionou-se a solução de DTT 10 mM suficiente para que ela cobrisse o gel, incubando-os por 30 minutos em temperatura ambiente. O DTT foi removido e em seguida adicionou-se IAA 50 mM no tubo até que este cobrisse o gel contendo a amostra, permanecendo incubado por mais 30 minutos em temperatura ambiente.

Na próxima etapa o IAA foi removido e amostra foi incubada com 0,1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos, para lavagem. Removeu-se esta solução e adicionou-se 0,2 mL de acetonitrila 100% por 5 minutos, no intuito de desidratar o gel, que logo em seguida foi reidratado com 0,2 mL de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos e em temperatura ambiente. Mais um ciclo de desidratação foi realizado (0,2 mL de acetonitrila 100% por 5 minutos, duas vezes), para que a amostra fosse liberada do gel. Por fim, 50 μ L de tripsina foram adicionados ao tubo contendo o gel para clivagem da amostra, que foi sendo paulatinamente reidratada. Retirou-se o excesso da solução enzimática e finalmente o gel foi coberto com bicarbonato de amônio 50 mM, onde a reação de clivagem durou 16 horas, sendo os tubos com as amostras mantidos no interior de uma estufa, a 37 °C.

No dia seguinte, foram adicionados 10 μ L de ácido fórmico 5% no tubo com o gel em temperatura ambiente, num passo que termina a reação enzimática de clivagem. Depois de 10 minutos, separou-se o sobrenadante do gel com uma breve centrifugação, onde o primeiro foi transferido para um outro tubo que permaneceu reservado. Aplicaram-se 12 μ L de ácido fórmico 5% (desta vez diluído em acetonitrila 50%) no tubo contendo o gel, incubando-os por 10 minutos. Nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi transferido para o tubo que já estava reservado, contendo amostra do passo anterior.

Finalmente extraída a amostra do gel, esta foi evaporada com o uso de um *speed vac* até que restasse cerca de 50 µL dela, pronta para ser utilizada na espectrometria.

Aplicadas as amostras no espectrômetro de massas (*MS/MS*), o resultado foi analisado utilizando o software *Mascot*, que buscou no banco de dados os peptídeos referentes às razões *m/z* encontradas, possibilitando a identificação das septinas utilizadas neste trabalho.

3.6 Estado oligomérico

Para determinar o estado oligomérico das proteínas purificadas neste trabalho, se utilizou tanto de calibração da coluna de exclusão molecular assim como da técnica de *SEC-MALS*. A primeira consiste em aplicar várias proteínas de peso molecular conhecido na coluna cromatográfica de exclusão molecular e encontrar uma variável conhecida por *Kav* (Equação 1). Tal variável pode ser calculada a partir da equação a seguir:

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vc - Vo} \quad (1)$$

onde *Ve* é o volume de eluição da amostra, *Vo* o volume de eluição do polímero *Blue Dextran* (volume morto) e *Vc* é o volume da coluna. Depois de calculado o *Kav* para cada proteína, se pode aplicar a função logarítmica sobre os dados e traçar um gráfico de *Kav* x Log. do Peso molecular (MW) destas proteínas, assim gerando uma equação da reta (Equação 2):

$$\text{Log MW} = a.Kav + b \quad (2)$$

onde a extrapolação da rota nos dá o coeficiente linear (*b*) e a inclinação da reta é dado pelo coeficiente angular (*a*) gerado pelo *fitting* dos pontos de *Kav*. Assim, sabendo o volume de eluição da proteína desejada e encontrando seu *Kav*, é possível estimar o peso molecular da amostra e associar este peso a um estado oligomérico.

O método de calibração da coluna de *SEC* é muito eficiente para a determinação do estado oligomérico de proteínas globulares. Entretanto, neste método não apenas o peso molecular, mas principalmente a forma das proteínas contribui no padrão de cromatografia.

Ou seja, proteínas de mesmo peso molecular, mas que possuam formas diferentes, podem ter tempos de eluição diversos. Uma vez que as septinas podem formar filamentos (portanto, amostras não globulares), em relação ao seu estado oligomérico elas também foram analisadas por Espalhamento de Luz a Multi Ângulos acoplado a Cromatografia de Exclusão Molecular (*SEC-MALS*).

De maneira simplificada, esta técnica estima o volume das partículas em solução à medida que elas espalham luz (Figura 28). Diferentemente do espalhamento de luz dinâmico (*DLS*), onde a amostra é inserida numa cubeta e se estima o peso molecular das partículas com base em como os movimentos brownianos das moléculas desviam um feixe de luz, o *SEC-MALS* funciona com moléculas que percorrem uma direção. Primeiramente, a *SEC* separa as partículas com base em seus tamanhos. A seguir, essas partículas seguem um caminho onde elas interceptam um laser polarizado, espalhando a luz em todas as direções. Pelo menos três detectores posicionados em ângulos diferentes conseguem captar a diferença da intensidade no sinal refratado e também o ângulo de desvio, precisando qual o tamanho necessário da amostra para que este sinal seja obtido. De posse destes dados, da concentração proteica da amostra (dada pela absorvância ou índice de refração diferencial - dRI) e do conhecimento de algumas constantes do sistema é possível estimar o tamanho das moléculas (Equação 3)⁵³ e associá-las a um estado oligomérico.

$$M = \frac{R(0)}{Kc \left(\frac{dn}{dc}\right)^2} \quad (3)$$

Onde M = Massa molecular, $R(0)$ = a quantidade de luz espalhada pela amostra comparada à intensidade do laser extrapolado ao ângulo zero, c = concentração proteica, dn/dc = diferença entre o índice de refração da amostra e do tampão e K uma constante ótica dependente do comprimento de onda e índice de refração do solvente. Conhecendo todas as outras variáveis se torna possível o cálculo da massa molecular da amostra (M).

A grande vantagem desta técnica é que enquanto o *DLS* e a *SEC* partem do pressuposto que as partículas em solução são globulares, o *SEC-MALS* consegue atribuir o peso molecular mesmo quando a amostra possui um formato irregular. Além disso, o *DLS*

pode ser impreciso por não ser acoplado à *SEC*, possibilitando que a amostra não seja monodispersa e possua impurezas, como proteínas agregadas.

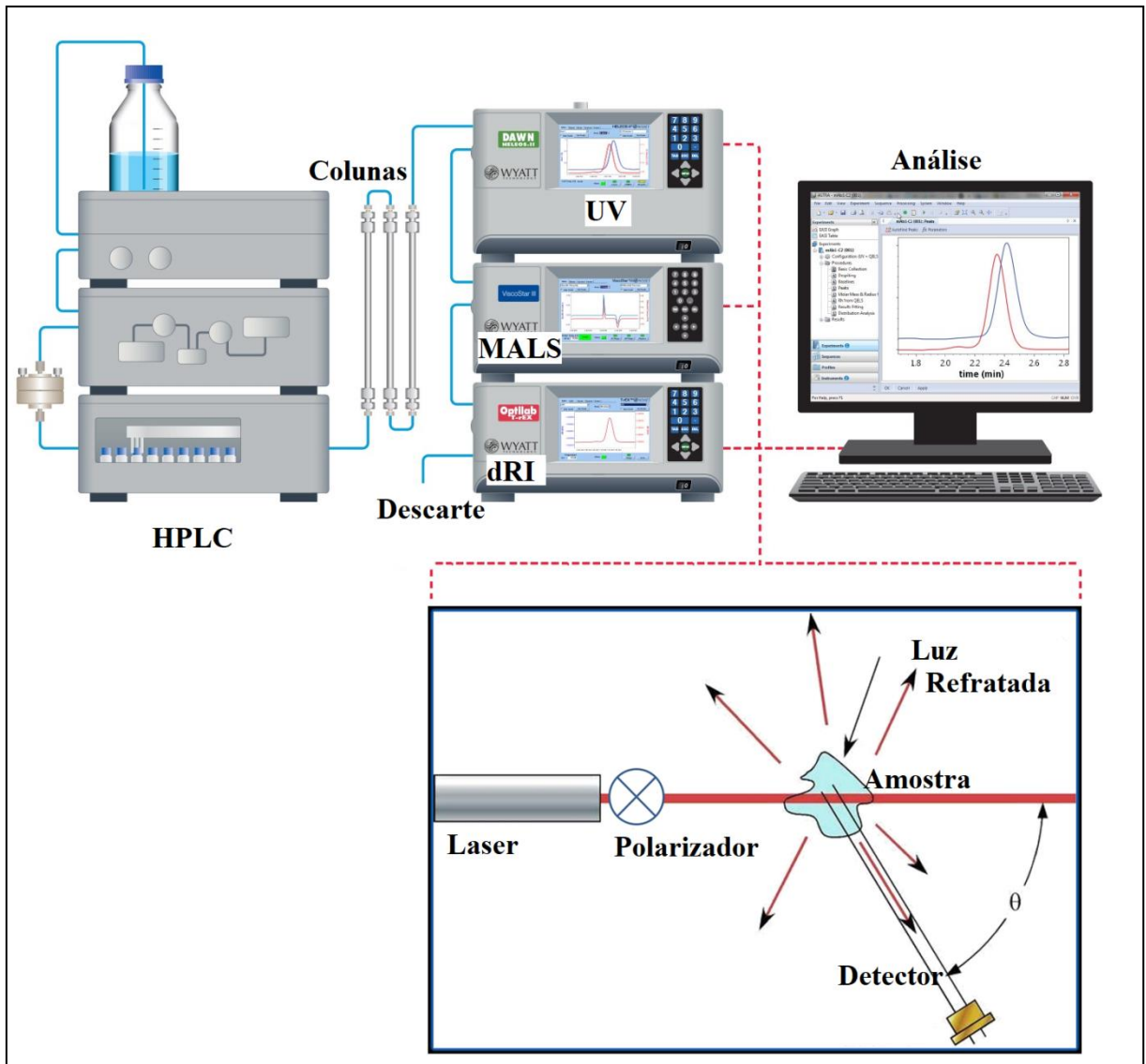


Figura 28 - Esquema de um aparelho *SEC-MALS* e seus anexos. Em azul é traçado o caminho seguido pela amostra até o descarte, passando pela coluna de exclusão molecular e pelos detectores. Na parte inferior direita está esquematizado como uma amostra de formato amorfo desvia um laser em direção ao detector, o que torna possível estimar o tamanho da amostra e inferir seu estado oligomérico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante o procedimento, utilizou-se uma vez mais a coluna de SEC Superdex 200 10/300 GL conectada a um sistema *Waters 600 Controller*, este associado a um sistema

miniDAWN TREOS - MALS (Wyatt Technologies)®. Antes de ser aplicada, a proteína na concentração 2mg/mL foi centrifugada a 14500 g por 10 minutos, na temperatura de 4 °C. O resultado foi analisado pelo software *ASTRA 7.0.1 (Wyatt Technology)*,

3.7 Dicroísmo Circular (CD)

A técnica de dicroísmo circular pode ser utilizada na caracterização biofísica e estrutural de proteínas, geralmente verificando-se a influência de agentes desnaturantes (físicos ou químicos) sobre elas e/ou como ligantes afetam a estabilidade do complexo formado. Ela vale-se do princípio de que algumas estruturas secundárias, como α -hélices, folhas- β e voltas, interagem com a luz circularmente polarizada tanto no sentido horário (RCP) quanto no sentido anti-horário (LCP) de maneira desigual, geralmente num espectro da região UV entre 190 nm e 260 nm.⁵⁴ A diferença de absorção pela amostra entre LCP e RCP é conhecida como Dicroísmo Circular, sendo de grande utilidade na caracterização de substâncias opticamente ativas, como as proteínas (Figura 29).

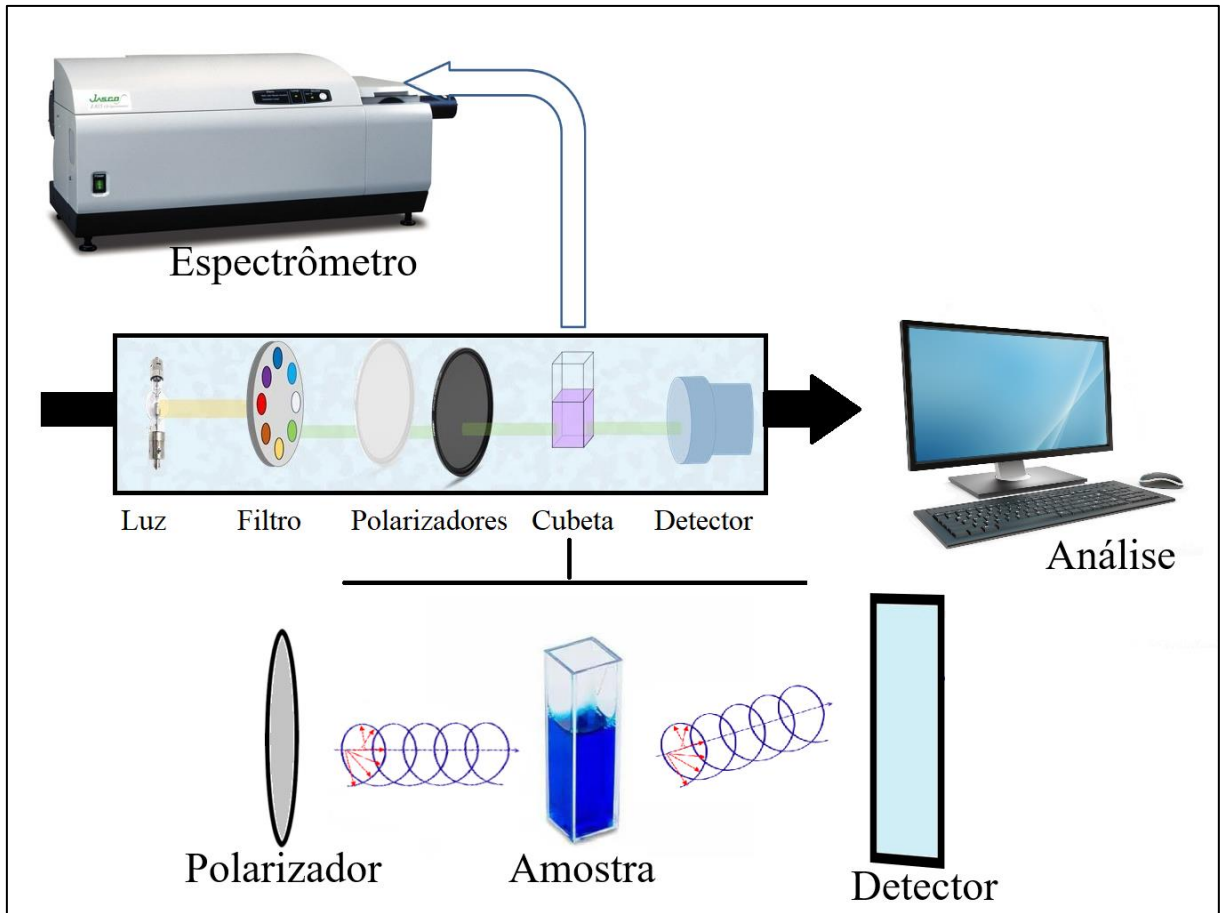


Figura 29 - A técnica de Dicroísmo Circular aplicada a proteínas. A cubeta é inserida dentro do espectrômetro, sendo a amostra atingida por ondas eletromagnéticas polarizadas. Estas geram um sinal captado por um software para a determinação da presença de estruturas secundárias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No presente trabalho, um espectrômetro *Jasco J-815 CD Spectrometer*® foi utilizado para determinar a temperatura de *melting* (T_m) de algumas septinas. A proteína foi purificada em tampão fosfato NaCl 150 mM (Tabela 6), para diminuir o ruído experimental gerado pelos componentes do tampão. Aproximadamente 300 μ L da proteína purificada na concentração 5 μ M foi submetida a um gradiente de temperatura. A leitura do espectro de *CD* era feita em cada condição para que a análise de como esse espectro variava em função temperatura fosse realizada. As temperaturas variaram em alguns casos de 4 $^{\circ}$ C a 90 $^{\circ}$ C e uma curva de *melting* foi estipulada a partir dos dados referentes ao espectro de *CD* no comprimento de onda de 222 nm, para cada temperatura. Neste valor de comprimento de onda (λ), as α -hélices possuem um sinal forte de dicroísmo circular, tal como também possui um sinal no λ de 208 nm. Já as fitas- β interagem com o espectro de *CD* no λ de 218 nm. Basicamente, a análise associa o T_m da proteína com a perda de sinal escolhido (222, 208 e 218 nm) ao longo da desnaturação

proteica. Ou seja, estima-se o T_m levando-se em conta a diminuição dos sinais de α -hélices e/ou fitas- β com o aumento da temperatura (ou outro agente desnaturante).

Tabela 6 - Tampão utilizado no experimento de dicroísmo circular.

Tampão fosfato (pH 8.0)
Fosfato de Sódio dibásico heptahidratado 15 mM
Fosfato de Sódio monobásico monohidratado 5 mM
Cloreto de Sódio 150 mM
Cloreto de Magnésio 5 mM

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.8 Ensaios de conteúdo de nucleotídeo

Septinas podem apresentar atividade GTPase, embora a eficácia da catálise entre elas possa variar ⁸. A interação entre o nucleotídeo e o NBP das septinas dá-se através de interações intermoleculares, conforme indicam as estruturas cristalográficas (Figura 8.a) . Como a interação não é covalente, tratamentos desnaturantes culminam na liberação do nucleotídeo em sua forma livre. De modo a constatar a presença de nucleotídeos e a natureza destes, as diferentes septinas foram expostas a um tratamento químico para que, caso houvesse, os nucleotídeos fossem liberados à medida que as proteínas desnaturassem.

Inicialmente, 500 μ L de cada amostra purificada em tampão fosfato e em diferentes concentrações foram incubadas com 250 μ L de HClO_4 1,5 M por 10 minutos num recipiente com gelo. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14500 g. Precipitada a proteína, 600 μ L do sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se 100 μ L de K_2HPO_4 1 M, 100 μ L de KOH 3 M e 80 μ L de ácido acético 5 M. As amostras então foram incubadas a -20 °C por pelo menos uma hora. Depois de descongeladas, elas foram mais uma vez centrifugadas a 14500 g por 10 minutos e 110 μ L de sobrenadante de cada amostra foi transferido para diferentes *vials*, onde o teste para a presença de nucleotídeos foi realizado. Um complexo de septina humana (Sept2/Sept6) em concentração desconhecida foi utilizada como controle para a presença de nucleotídeos. Este complexo sabidamente liga-se a

GTP e possui atividade catalítica, ²³ de modo que dois picos podem ser observados nos cromatogramas (GTP e GDP).

As amostras (sobrenadantes) foram injetadas num sistema HPLC Waters Alliance® 2625 utilizando uma coluna de troca iônica Protein-Pak DEAE 5PW. A coluna foi equilibrada com um tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e a eluição da amostra foi feita utilizando-se um tampão similar, porém com NaCl 1 M. A detecção dos nucleotídeos foi feita medindo a absorbância destes no λ de 253 nm.

O experimento baseia-se na comparação do padrão exibido pela amostra com outros padrões de GTP/GDP em concentrações conhecidas. Sabendo-se o tempo de eluição tanto do GDP quanto do GTP, comparam-se os picos presentes na amostra (se houverem) para constatar-se qual a natureza do nucleotídeo presente.

3.9 Ensaio de cristalização

Cristais são estruturas compostas por íons ou moléculas cuja maior característica é a presença de uma grande ordem interna. Eles podem ser feitos tanto de íons ou moléculas inorgânicas (como o sal de cozinha e o gelo) como de moléculas orgânicas (açúcar, proteínas e material genético). Dentro de um cristal hipotético, este possui um tamanho que pode ser considerado infinito, com partículas orientadas na mesma direção (ou relacionadas por simetria) e também regularmente espaçadas, o que garante propriedades químicas e físicas diferenciadas para este tipo de estrutura. Estas propriedades podem ser utilizadas para determinar a estrutura de um determinado composto com o uso de raios-x de alta intensidade num experimento de difração, onde os padrões de difração resultantes deste experimento são utilizados para calcular a densidade eletrônica da amostra (no caso proteína) e permitir a construção de um modelo que explique tal densidade.

Os cristais podem ser produzidos em condições adequadas, onde cada ente presente na estrutura cristalina é adicionado nas extremidades do cristal, culminando no seu crescimento. O crescimento cessa quando suas extremidades apresentam tantas irregularidades que a ordem é perdida. Assim, condições que permitam a deposição lenta e ordenada de partículas em uma estrutura de maior ordem culminam em cristais mais organizados, resistentes e que geram dados de difração de raios-x de maior qualidade.

Em cristalografia de macromoléculas tenta-se exaustivamente a produção de cristais proteicos misturando-se a amostra purificada às soluções precipitantes. Esse passo é totalmente empírico, de modo que se varia tanto a concentração de precipitantes como a concentração de proteínas. Existe uma vasta quantidade de agentes precipitantes e todas essas variáveis, em condições adequadas, podem dar origem a um cristal de proteína. No modelo de diagrama de fases de cristalização (Figura 30), as proteínas podem dar origem a micro cristais (2) em determinada concentração proteica e solução precipitante, dentro de uma região conhecida por zona de nucleação. A partir do balanço fino que envolve concentrações e razões adequadas de proteínas e precipitantes, os microcristais proteicos podem se organizar de maneira ainda mais ordenada, formando um cristal (2, zona metaestável), ou colapsar e precipitar de maneira desordenada (4, zona de precipitação), formando um agregado proteico amorfo, como se vê na figura a seguir.

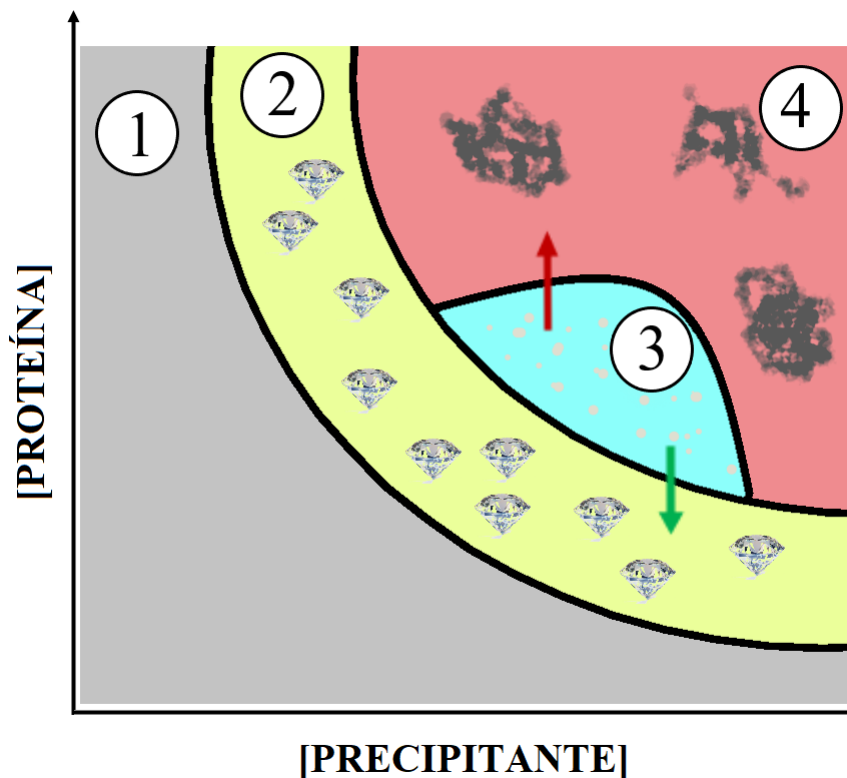


Figura 30 - Este modelo é conhecido como diagrama de fase de cristalização. Nas proporções adequadas, cristais de proteínas podem surgir da mistura entre amostra e solução precipitante. (1) Zona não saturada, onde nenhuma alteração do estado é observada devido à baixa concentração proteica ou do agente precipitante. (2) Zona metaestável, caracterizada pelo surgimento de cristais que ocorre apenas sob condições muito específicas. A zona de nucleação (3) é onde se formam as primeiras estruturas ordenadas, impossíveis de serem visualizadas. Estas estruturas podem dar origem a um cristal ordenado (2) ou a precipitados proteicos (4 – zona de precipitação) onde tanto a concentração de proteínas como de precipitantes é muito alta.

Diferentemente dos cristais salinos, cuja interação entre as partículas é forte e resulta em estruturas mais rígidas e robustas, cristais proteicos são frágeis dadas às fracas interações que ocorrem entre as moléculas. Uma explicação para essa fragilidade é que eles possuem uma quantidade de solvente muito elevada entre os seus constituintes, o que justamente interfere na interação entre as proteínas, enfraquecendo-os. Por esse motivo cristais proteicos são mais improváveis, possuem maior desordem interna e resultam em sinais menores quando difratados por raios-x do que cristais salinos (ou de pequenas moléculas).

Neste projeto, os domínios GTPase das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 foram submetidos a diferentes tentativas de cristalização utilizando-se de um robô de cristalização *Crystal Gryphon* (Art Robbins Instruments®), placas de 96 poços e diferentes kits de cristalização (*Morpheus MD*®, *BCS MD*®, *Index HR*®, *JCSG MD*® e *SG1 MD*®), contendo soluções precipitantes. Em geral, varreu-se um espectro de concentrações proteicas que variaram de 2 mg/mL até 25 mg/mL, de modo a explorar o diagrama de fase (Figura 30). Também foram testadas em cada placa razões diferentes entre amostra e solução precipitante (2:1, 1:1 e 1:2). Em tentativas posteriores também se utilizou gotas com diferentes quantidades de solução final (0,4 µL; 0,6 µL e 0,9 µL) assim como tentativas de incubação das placas a 4 °C, 10 °C e 20 °C. As condições cujas amostras resultaram em cristais proteicos foram esmiuçadas em tentativas manuais de cristalização, onde se variou o pH e a porcentagem de precipitante na solução. Ainda se tentou retirar a *His-tag* de algumas proteínas purificadas e/ou incubá-las com excesso de nucleotídeos GTP e/ou GDP, na busca por cristais de melhor qualidade. Sem sucesso, também foram realizadas tentativas de cristalização da proteína Cdc11(G) conforme descrito por BRAUSEMANN *et al*¹, no intuito de redeterminar a estrutura cristalográfica de Cdc11.

Os cristais obtidos foram congelados com diferentes crioprotetores, como PEG 200, PEG 400 e glicerol, e então difratados nos sincrotrons *Diamond Light Source* (DLS – Reino Unido) e *Sirius* (Brasil). Os conjuntos de dados foram tratados, quando possível, pelos softwares *STARANISO*, *AIMLESS* e *PHASER – MOLECULAR REPLACEMENT*, que buscou uma solução para a estrutura difratada por meio do método de substituição molecular.

3.10 Modelagens por homologia

Devido à impossibilidade da obtenção da estrutura cristalográfica das proteínas utilizadas neste trabalho por falta de cristais de qualidade suficiente para o experimento de difração de raios-x, tanto das septinas expressas sozinhas ou com a devida septina parceira, optou-se pela modelagem das septinas de levedura com base em estruturas de septinas humanas já depositadas no *PDB*.

A partir do que já existe na literatura sobre septinas de levedura, foram modeladas as septinas Cdc11(G) monomérica, o dímero Cdc11(G) via interface NC e o dímero Cdc11(G)-Cdc12(G) via interface G, usando o software *Modeller 9.25*. Para tal trabalho foram utilizadas as septinas humanas Sept2 e Sept8 (*PDB 6UPR*),²³ tomando como referência a posição das septinas em ambos os octâmeros formados.^{17,28}

Para cada ciclo de modelagem proposto foram gerados cinquenta diferentes modelos que foram então ranqueados com base em seus *DOPE scores*.⁵⁵ Os cinco melhores modelos baseados nesse parâmetro foram então testados com os seguintes softwares de validação de estrutura: *ERRAT*, *VERIFY3D*, *PROVE*, *PROCHECK* e *WHATCHECK*.⁵⁵⁻⁵⁹ Após esse processo, tomou-se a decisão de quais foram os melhores modelos gerados, sendo estes então utilizados durante as análises posteriores.

Durante o curso deste projeto uma ferramenta muito poderosa para a predição de estruturas proteicas foi lançada, de maneira que as mesmas sequências, quando já não possuíam um modelo pronto em sua base de dados, foram submetidas à predição pelo *AlphaFold2*,⁶⁰ comparando-se assim os diferentes modelos gerados por ambas as plataformas.

O estudo sobre cada modelo foi conduzido utilizando softwares de visualização gráfica (*Pymol 2.4.1* e *CCP4MG 2.10.11*, no intuito de analisar as cargas nas superfícies proteicas), e de interação entre os resíduos entre as interfaces, dentro da estrutura proteica (*LigPlot⁺2.2.4*), conforme descrito por ROSA *et al.*²³

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo a guiar a interpretação dos dados e também de acordo com a cronologia das atividades realizadas, a seção de resultados será dividida em duas partes. A primeira indicará os resultados obtidos para os domínios GTPase das septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 quando expressos isoladamente. Já a segunda seção versará sobre a co-expressão das septinas com a sua devida parceira de interação pela interface G. A única exceção a esta regra se dará em relação à apresentação dos modelos gerados a partir de proteínas homólogas, onde os resultados serão apresentados na mesma sessão. Findada a apresentação dos resultados, a comparação acerca do comportamento das septinas quando sozinhas ou com a sua parceira poderá ser melhor compreendida.

4.1 A expressão heteróloga de Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G)

Após a etapa de lise celular, seguida de purificação por *IMAC* e *SEC* (quando possível), as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% contendo as alíquotas retiradas após cada etapa de purificação. A amostra não induzida e também o *pellet* celular insolúvel confirmam tanto a produção da proteína recombinante assim como o seu caráter de solubilidade (Figura 31).

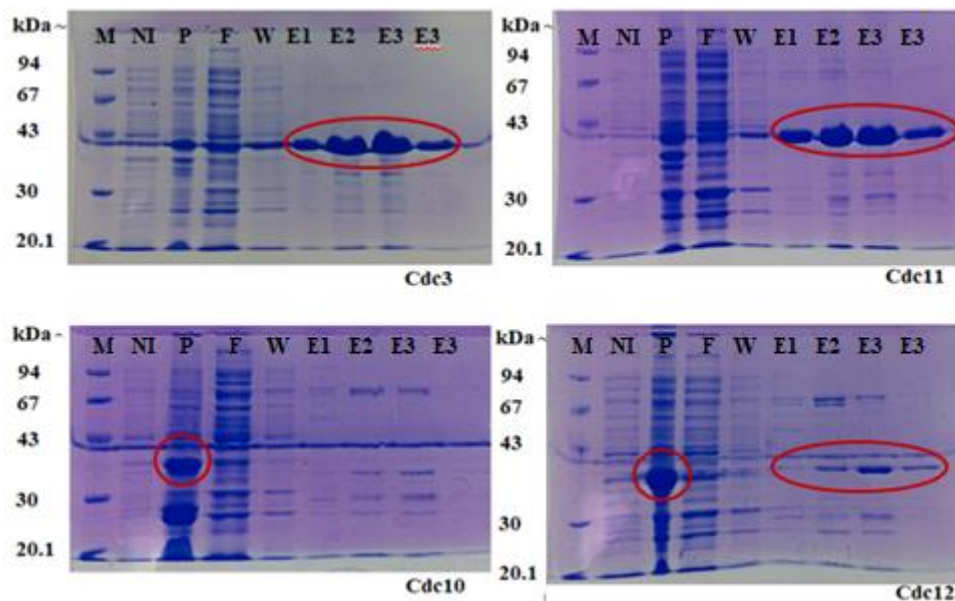


Figura 31 - Gel SDS-PAGE inicial das septinas Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G). **M** Marcador molecular **NI** Não induzido **P** Pellet **F** Não ligado **W** Lavagem **E1** Eluição 1 (10 mL/Imidazol 50 mM) **E2** Eluição 2 (5 mL/Imidazol 100 mM) **E3** Eluição 3 (5 mL/Imidazol 200 mM). Os círculos vermelhos indicam a banda correspondente à proteína expressa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os géis revelam que Cdc11(G) e Cdc3(G), quando expressas sem a septina parceira, se encontram majoritariamente na fração solúvel da amostra, enquanto Cdc10(G) e Cdc12(G) agregam-se e juntam-se à fração insolúvel, onde se observa o *pellet*. Os géis anteriores foram os primeiros a serem revelados durante o trabalho experimental, resultado da primeira purificação, e serviu de parâmetro para que inicialmente se optasse por trabalhar apenas com as septinas Cdc3(G) e, majoritariamente, Cdc11(G), cujo grande objetivo deste trabalho foi a determinação da estrutura cristalográfica. Entretanto ajustes posteriores aumentaram a qualidade da purificação por *IMAC* de todas as proteínas expressas, com exceção a proteína Cdc10(G). Os géis a seguir demonstram a qualidade final da purificação por afinidade (Figura 32).

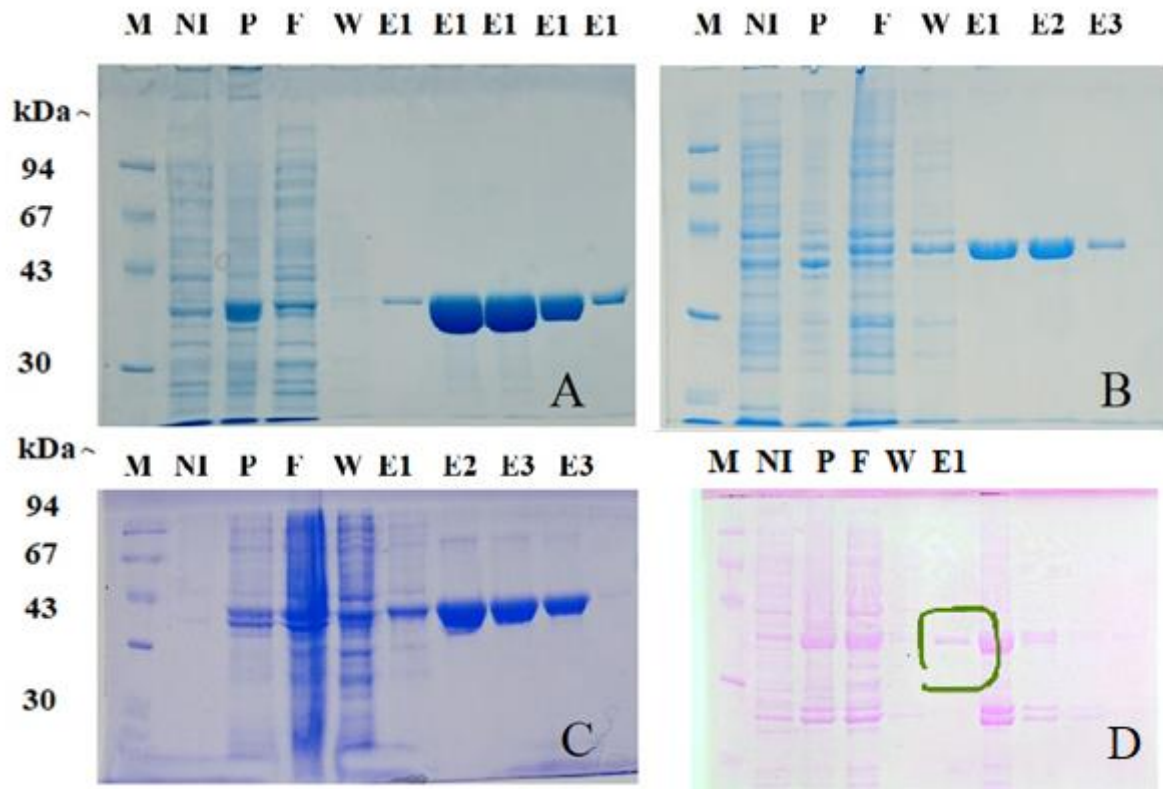


Figura 32 - Géis de SDS-PAGE das septinas **A)** Cdc12(G) **B)** Cdc11(G) e **C)** Cdc3(G). **D)** Gel SDS-PAGE da proteína Cdc10(G) purificada com a adição de ureia 8 M. O marcador verde indica a proteína de interesse. **M** Marcador molecular **NI** Não induzido **P** Pellet **F** Não ligado **W** Lavagem **E1** Eluição 1 (10 mL/ Imidazol 50 mM) **E2** Eluição 2 (5 mL/Imidazol 100 mM) **E3** Eluição 3 (5 mL/Imidazol 200 mM). Em **A)** a eluição se deu utilizando uma concentração única de Imidazol de 200 mM, em volumes menores (1mL) aplicados na coluna cromatográfica. Em **D)** houve apenas uma etapa de eluição, onde E1 continha Imidazol 200 mM e 8 M de ureia.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Numa tentativa adicional de purificar a proteína Cdc10(G), esta foi tratada adicionando-se ao tampão de lise com ureia 8 M, cujo efeito é desnaturante. O passo de eluição foi realizado em apenas uma etapa, utilizando-se tampão de lise ureia 8 M com 200 mM de Imidazol. Planejava-se que a proteína se ligasse à coluna de afinidade para que, posteriormente, ela fosse reenovelada através de diluição seriada em tampão sem ureia. Embora o tratamento tenha recuperado parte desta proteína da fração *pellet* (Figura 32.D), o rendimento da purificação foi baixo, sendo impossível qualquer purificação posterior. Além disso, dado que o foco do trabalho é estrutural, tratamentos desnaturantes não são desejáveis. Assim, dadas as dificuldades na obtenção de Cdc10(G) pura, optou-se por priorizar as outras septinas de levedura.

Uma etapa de purificação seguinte por *Size Exclusion Chromatography (SEC)* foi feita para as amostras de Cdc3(G) e Cdc11(G) utilizando um sistema ÄKTA purifier GE® e uma coluna Superdex 200 10/300 GL. O cromatograma a seguir (Figura 33 A e B) mostra o perfil de purificação por exclusão molecular das duas proteínas. Em relação à Cdc12(G), esta não pôde ser purificada através de *SEC* devido à sua grande instabilidade, uma vez que a proteína começa a depositar-se como um precipitado a partir de qualquer tentativa de concentrá-la para posterior aplicação na coluna e separação por exclusão molecular. Tampouco a aplicação do volume eluído diretamente da coluna de afinidade (*IMAC*) na coluna de *SEC* culminou na purificação de Cdc12(G), levantando suspeitas de que a proteína interage diretamente com a coluna ou então que precipita no interior desta durante o processo. Na imagem a seguir verifica-se a qualidade das purificações de Cdc3(G) e Cdc11(G) dada à homogeneidade dos picos e o rendimento destas. Dois géis SDS-PAGE referentes aos picos das cromatografias também são mostrados (Figura 33 C e D).

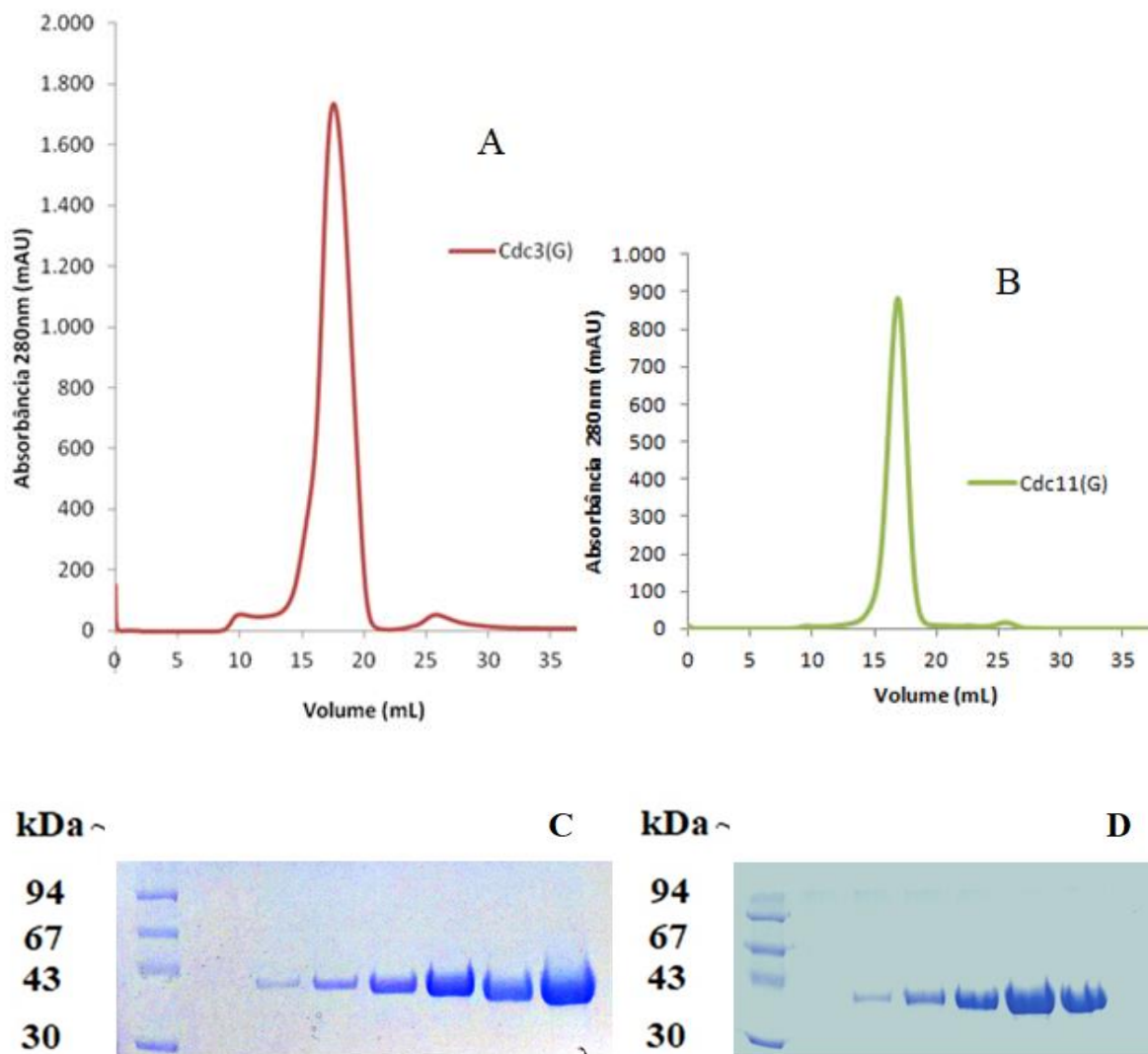


Figura 33 - Cromatografia *SEC* das septinas (A) Cdc3(G) e (B) Cdc11(G) indicando homogeneidade das amostras. Frações referentes ao pico dos cromatogramas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE, no qual se observam as bandas correspondentes à (C) Cdc3(G) e (D) Cdc11(G).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1 Identificação por meio de espectrometria de massas em tandem (*MS/MS*)

Como método suplementar a constatação das proteínas expressas sem a septina parceira, um espectrômetro de massas modelo micrOTOF-QII – Bruker Daltonics® foi utilizado para a identificação das septinas Cdc3(G), Cdc10(G), Cdc11(G) e Cdc12(G). Embora o peso molecular revelado nos géis *SDS-PAGE* quanto os perfis cromatográficos de *SEC* fossem compatíveis com o esperado, este passo adicional foi utilizado para confirmar a identidade de cada uma delas.

Durante o procedimento foram identificadas amostras extraídas de gel *SDS-PAGE* resultante da purificação por *IMAC* de Cdc10(G) e Cdc12(G). Cdc3(G) e Cdc11(G). Septinas solúveis que também foram purificadas por *SEC*, foram preparadas para identificação a partir de amostra líquida, sem necessidade do passo de extração do gel, seguindo o protocolo descrito na literatura.⁶¹

Aplicadas as amostras no espectrômetro de massas (*MS/MS*), o resultado foi analisado utilizando o software *Mascot*, que buscou no banco de dados os peptídeos referentes às razões m/z encontradas, possibilitando a identificação das septinas utilizadas neste trabalho: Cdc3 (Figura 34.a), Cdc10 (Figura 34.b), Cdc11 (Figura 34.c) e Cdc12 (Figura 34.d).

<p>Match to: CDC3 YEAST Score: 1224 34.a)</p> <p>Matched peptides shown in Bold Red Sequence Coverage: 45%</p> <pre> 1 MSLKEEQVSI KQDPEQEERQ HDQFNDVQIK QESQDHDGVD SQYNTGQND 51 DSERFEAES DVKVEPGLGM GITSSQSEKG QVLPDQPEIK FIRROINGVY 101 GFANLPRQWH RRSIKNGFSF NLLCVGPDGI GHTILMKTLP NNDDIEANLV 151 KDYEELAND QEEEEQEGEG HENQSQEQRH KVKIKSYESV IEENGVKLNL 201 NVIDTEFGFD FLNNDQKSWD PIKEIDSRF DQYLDANKI NRHSINDKRI 251 HACLYFIEPT GHYLPKLDLK FMQSVYEKCN LIPVIAKSDI LTDEEILSFK 301 KTIMNQLIQS NIELFKPPIY SNDDAENSHL SERLFSSLPY AVIGSNDIWE 351 NYSGNQVRGR SYPWGVIEDV NDNHSDFNLL KNLLIQFME ELKERTSKIL 401 YENYRSKLA KLGIKQDQNSV FKEFDPISKQ LEEKTLHEAK LAKLETEMKT 451 VFQQVSEKE KKLQKSETEL FARHKEMKEK LTKQLKALED KKKQLELSIN 501 SASPNVNHSP VPTKKKGFLLR </pre>	<p>Match to: CDC10_YEAST Score: 730 34.b)</p> <p>Matched peptides shown in Bold Red Sequence Coverage: 52%</p> <pre> 1 MDPLSSVQPA SYVGFDTITN QIEHRLKKG FQFNIMVVGQ SGLGKSTLIN 51 TLFASHLIDS ATGDDISALP VTKTTEMKIS THILVEDRVR LNINVIDTPG 101 FGDFIDNSKA WEPIVKYIKE QHSQYLRKEL TAQRERFITD TRVHAILYFL 151 QPNGKELSR L DVEALKRLTE IANVIPVIGK SDTLTLDERT EFRELIQNEF 201 EKYNFKIYPY DSEELTDEEL ELNRSVRSII PFAVVGSENE IEINGETFRG 251 RKTRWSAINV EDINQCDFVY LREFLIRTHL QDLIETTSYI HYGFRARQL 301 IALKENANSR SSAHMSSNAI QR </pre>
<p>Match to: CDC11 YEAST Score: 1086 34.c)</p> <p>Matched peptides shown in Bold Red Sequence Coverage: 46%</p> <pre> 1 MSGIIDASSA LRKRKHLKRG IIFTVMIVGQ SSGSRSTFIN TLGGQVVDI 51 STIILLPTDI STEIDLQRE ETVELEDDEG VKIQLNIIDT PGFGDSL DNS 101 PSFEIISDYI RHQYDEILLE ESRVRRNPRF KDGRVHCCLY LINPTGHGLK 151 EIDVEFIRQL GSLVNIIPVI SKSDSLTRDE LKLNKCLIME DIDRWNLPIY 201 NFPFDEDEIS DEDYETNMYL RTLLPFPAIG SNEVYEMGGD VGTIRGRKYP 251 WGIIDVEDSS ISDFVILRNA LLISHLHDLK NYTHEILYER YRTEALSGES 301 VAAESIRPNL TKLNGSSSSS TTRRNTNPF KQSNINNDV LNPASDMHGQ 351 STGENNETYM TREEQIRLEE ERLKAFEVRV QOELLKROE LLQREKELRE 401 IEARLEKEAK IKQEE </pre>	<p>Match to: CDC12 YEAST Score: 1116 34.d)</p> <p>Matched peptides shown in Bold Red Sequence Coverage: 48%</p> <pre> 1 MSAATATAAP VPPVVGISNL FNQRYKIVNE EGGTFTVMLC GESGLGKTF 51 INTLPQTVLK RADGQHRQE PIRKTVIEDI TRALLEEKHF ELRVNVIDTP 101 FGFDNVNNK ANQPLVDFID DQHDSYMRQE QQPYRTRKFP LRVHAVLYFI 151 RPTGHGLKPI DIETMKRLST RANLIPVIAK ADTLTAQELQ QFKSRIRQVI 201 EAQERIRFTP PLDADSKEDA KSGSNPDSAA VEHARQLIEA MPFAIVGSEK 251 KFDNGQGTQV VARKYPWGLV EIENDSHCDF RKLRALLRT YLLDLISTTQ 301 EMHYETYRRL RLEGHENTGE GNEDFTLPAI APARKLSHNP RYKEENALK 351 KYFTDQVKA EQRFRQWEQN IVNERIRLNG DLEBIQGVK KLEBQVKSQ 401 VKKSHLK </pre>

Figura 34 - O processo de *MS/MS* identificou as quatro proteínas utilizadas no primeiro ano deste trabalho: a) Cdc3, b) Cdc10, c) Cdc11 e d) Cdc12. As sequências indicadas em vermelho correspondem a peptídeos identificados das quatro diferentes septinas pelo programa MASCOT.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados oriundos da análise pelo *Mascot* identificaram as quatro septinas de levedura utilizadas ao longo deste projeto. Além do mais, nota-se que, em conformidade com os genes sintetizados, observa-se apenas a identificação dos aminoácidos que se localizam no interior da sequência proteica. Isso se deve porque as construções utilizadas não possuem o domínio N-terminal e C-terminal. A septina que teve a maior porcentagem de cobertura (52%) foi Cdc10(G), o que se deve ao fato, em parte pelo menos, de que a proteína selvagem possui um C-terminal curto.

4.1.2 Dicroísmo Circular (CD)

No presente trabalho, um espectrômetro Jasco J-815 CD foi utilizado para determinar a temperatura de *melting* (T_m) da septina Cdc3(G) e Cdc11(G). As proteínas foram purificadas em tampão fosfato NaCl 150mM. Dentro de uma cubeta de quartzo, 300 μ L da proteína purificada na concentração 5 μ M foi submetida a um gradiente de temperatura, que variava de dois em dois graus Celsius. O espectro de CD era então recordado em cada condição para que a análise de como esse espectro variava em função da temperatura fosse realizada. As temperaturas utilizadas durante os experimentos variaram de 4°C à 90°C e uma curva de *melting* (T_m) foi estipulada a partir dos dados referentes ao espectro de CD no comprimento de onda de 222nm, para cada temperatura. Como já mencionado, neste valor de λ , as α -hélices interagem fortemente com a luz polarizada circularmente, de modo que o T_m da proteína foi definido a partir da perda de sinal para esta estrutura secundária em função da temperatura.

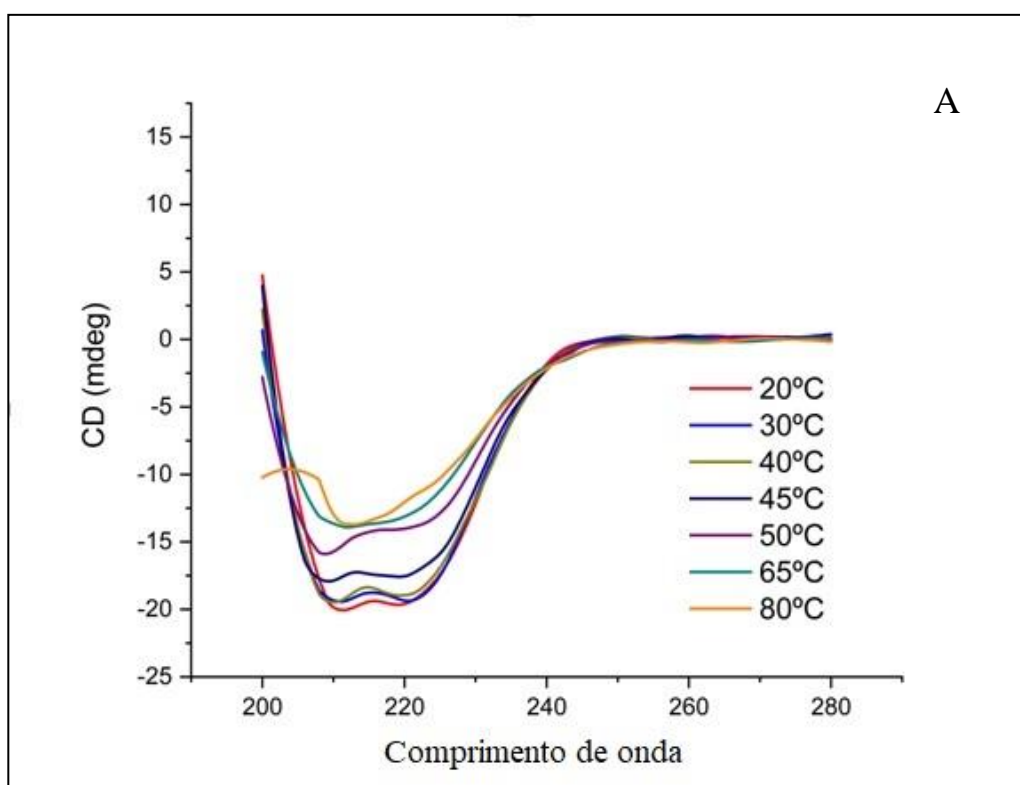
Na imagem seguinte (Figura 35.A) observa-se o espectro de CD da proteína Cdc11(G) submetida à variação térmica. Para cada temperatura específica, varreu-se o espectro de dicroísmo circular entre os comprimentos de onda de 200nm a 280nm. Para melhor visualização, são mostradas apenas as curvas do espectro intervaladas em 10°C.

Em relação aos espectros de CD demonstrados a seguir para Cdc11(G) é importante salientar que, mesmo estes estando ruidosos, nota-se que existem dois grupos de espectros que podem ser distinguidos: um abaixo de 45°C e outro a partir de 50°C. Esta mudança se deve a perda de estrutura pela proteína frente ao gradiente de temperatura. Por meio de uma modelagem matemática, onde uma curva sigmoide foi fitada a partir do sinal obtido em cada temperatura para o comprimento de onda de 222nm, estimou-se o T_m desta proteína em aproximadamente 48,5°C (Figura 35.B).

De maneira semelhante, o mesmo foi feito para a proteína Cdc3(G). Desta vez, de modo a melhor preservar a amostra e submetê-la a menores danos, apenas o espectro de CD no comprimento de onda de 222nm foi recordado em diferentes temperaturas. Assim, também se obteve uma curva sigmoide referente à perda de estrutura secundária nesta septina, com um valor de T_m aproximado de 62°C (Figura 35.C).

A curva de desnaturação por temperatura da proteína Cdc3(G) (Figura 35.C) revela um comportamento próximo a uma sigmoide, onde nos estágios iniciais observa-se o sinal de CD

obtido em 222 nm com a proteína estruturada. Este sinal é perdido à medida que proteína desnatura com o aumento da temperatura, até que se atinja um platô (totalmente desestruturada). Entretanto, Cdc3(G) apresenta um comportamento anômalo e não atinge totalmente este ponto, de modo que se percebe que a partir de 70°C a proteína começa a perder sinal numa escala menor. Mesmo assim, nota-se a transição de um comportamento inicial da curva (4°C – 40°C) para um em estágio próximo ao final (~70°C), sendo o T_m o ponto de inflexão desta (~62°C). O comportamento anômalo desta curva a partir de 70°C ocorre porque o controle sobre o experimento começou a se perder, com a precipitação da amostra dentro da cubeta. Deste modo, a precipitação começou a gerar ruído no sinal a partir de determinada temperatura, o que tornou os dados a partir de 70°C enviesados. Deste modo, o valor de T_m para Cdc3(G) deve ser tratado com um grau de cautela.



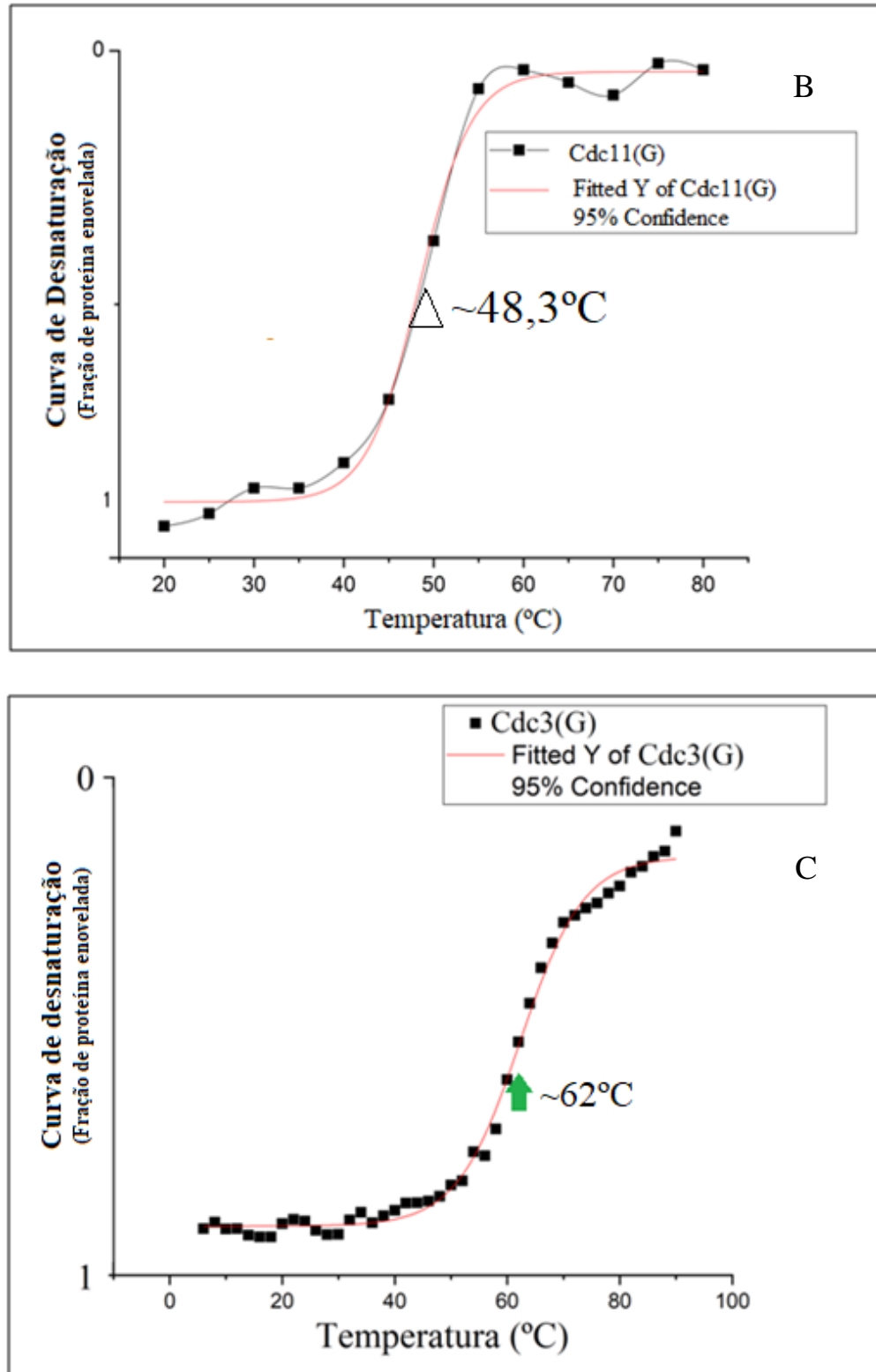


Figura 35 - A) Espectro de CD para a proteína Cdc11(G) em diferentes temperaturas. Algumas curvas foram omitidas para melhor visualização. 37.B) Curva de desnaturação proteica da mesma proteína. Por fim, curva de desnaturação térmica da proteína Cdc3(G), onde o T_m se encontra no valor intermediário da curva sigmoide fitada (seta verde) (37.C). Em temperaturas mais baixas, as proteínas estão enoveladas e estruturadas. Esse enovelamento se perde com o aumento da temperatura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Ensaio de conteúdo nucleotídico

Em razão do maior número de estruturas cristalográficas de septinas depositadas que possuem algum nucleotídeo em seu NBP, acredita-se que a presença de nucleotídeos de guanina possa estabilizar a estrutura proteica. Assim, uma vez que o objetivo deste projeto era a determinação da estrutura cristalográfica de septinas de levedura, em especial de Cdc11, se tornou importante saber se estas proteínas quando expressas sem a parceira (via interface G) continham GDP ou GTP em seu interior. No intuito de verificar a interação dos nucleotídeos GTP e GDP com as septinas de levedura, as proteínas Cdc3(G), Cdc11(G) e Cdc12(G) foram expostas a um tratamento químico desnaturante para que, na presença destes, eles pudessem ser liberados e quantificados.

Terminado o tratamento previamente descrito, as amostras foram centrifugadas para que a proteína desnaturada decantasse, sendo aplicado na coluna de troca iônica apenas o sobrenadante solúvel. Como controle positivo, septinas humanas (Sept2/Sept6) em concentração desconhecida também foram tratadas e analisadas quanto ao seu teor nucleotídico em alguns experimentos. Como já demonstrado ²³ este complexo sabidamente liga-se a GTP e o catalisa, de maneira que dois picos são observados nos cromatogramas a seguir referente a esta amostra: O GTP não hidrolisado e o GDP oriundo da hidrólise.

Uma vez que se conhece o tempo de eluição tanto de GDP quanto de GTP na coluna de troca iônica, observando-se o cromatograma das amostras chegou-se a conclusão de que tanto Cdc3(G) (Figura 36.A) como Cdc11(G) (Figura 36.B) são purificadas na forma apo, livre de nucleotídeos.

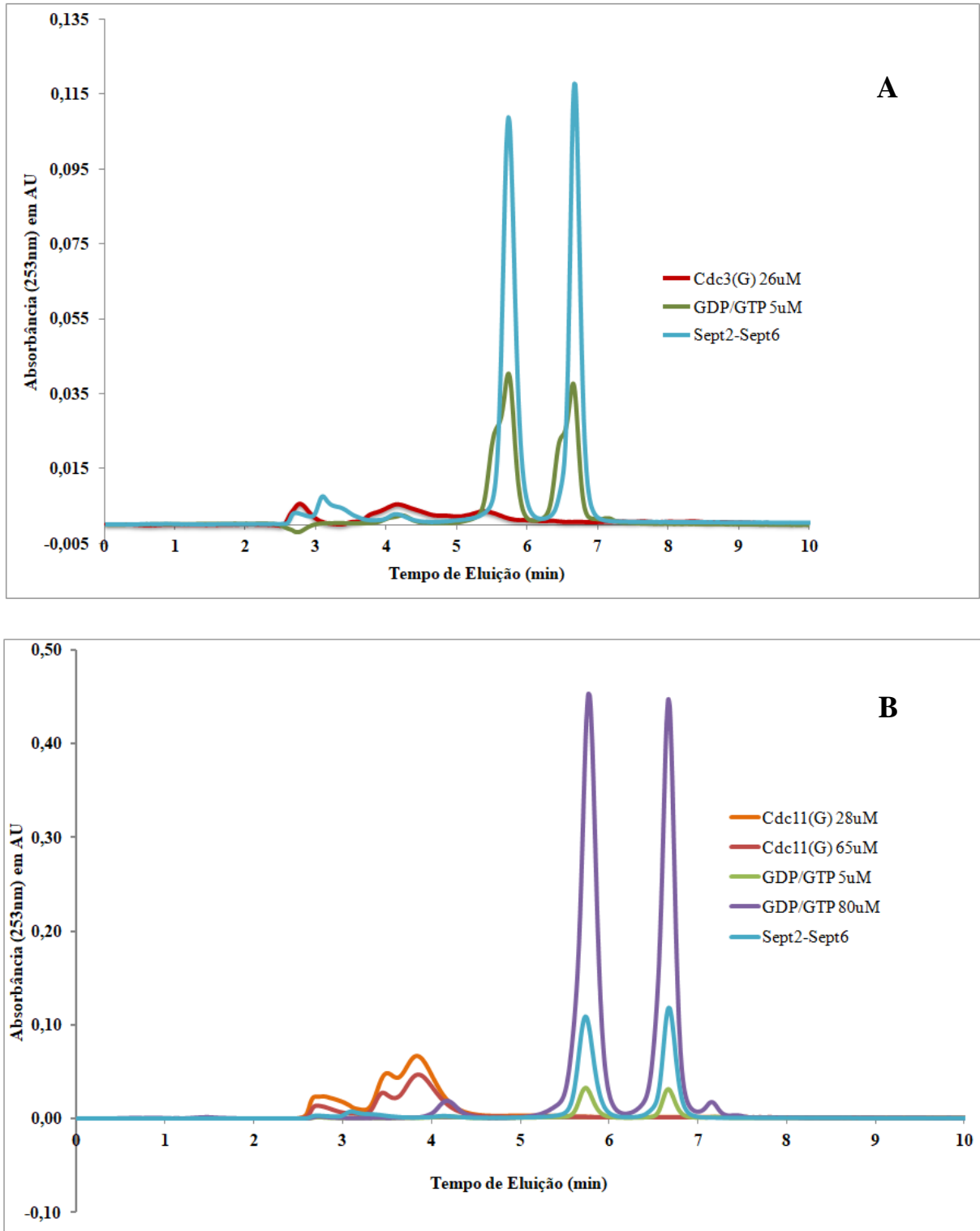


Figura 36 - Cromatograma relativo ao perfil de nucleotídeos liberados das septinas A) Cdc3(G) e B) Cdc11(G) após desnaturação. Nota-se na amostra a ausência de qualquer pico que coincidam com os tempos de aproximadamente 6 e 7 minutos, característicos do tempo de eluição de GDP e GTP, indicando que ambas as proteínas se encontram na forma não ligada. Resquícios de material proteico desnaturado pode ser observado entre os picos em 3 e 4 minutos. O complexo septina Sept2/Sept6, uma proteína humana conhecida por ligar-se à nucleotídeos (e cataliticamente ativa), foi utilizada como controle positivo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse dado vai ao encontro da estrutura relatada por BRAUSEMANN *et al*¹, em que o domínio G de Cdc11 não possui densidade eletrônica próximo ao sítio de ligação de nucleotídeos. Algo notório observado nessas duas proteínas purificadas na forma apo é que tanto Cdc11 quanto Cdc3 são cataliticamente inativas. Interessantemente, Cdc12(G), essa cataliticamente ativa, possui nucleotídeos ligados quando purificada por *IMAC* sem a septina parceira (Figura 37). Também foi demonstrado que, após incubação da amostra com GTP em excesso, esta septina leveduriana pode hidrolisar o nucleotídeo, conforme já descrito na literatura.⁸ Isso foi feito retirando-se uma alíquota da amostra com GTP após diferentes intervalos de tempo e efetuando o tratamento desnaturante, monitorando a reação até duas horas após o início do protocolo. Nota-se neste caso que existe consumo de GTP durante o período, com diminuição do pico de GTP e aumento do pico relativo ao GDP no cromatograma (Figura 37). O mesmo tratamento desnaturante foi feito com uma solução tampão contendo apenas GTP nos tempos 0 min. e 120 min., no intuito de se observar se os dados apresentados não seriam resultado de hidrólise espontânea do nucleotídeo. Uma vez que os picos foram próximos em ambos os tempos citados, indicando a baixa conversão de GTP em GDP de maneira espontânea, esses resultados foram omitidos para melhor visualização dos dados.

Dessa maneira é possível questionar se a presença de nucleotídeos em septinas de leveduras está associada à atividade catalítica ou se o fato observado é mera coincidência. Além disso, em septinas humanas estudadas pelo nosso grupo já se observou que a presença de nucleotídeos só ocorre quando existe interação com a septina parceira pelo domínio G^{16, 23, 25}. Entretanto, se a ligação do nucleotídeo ocorre após a formação de um dímero, se o dímero se forma após a ligação dos nucleotídeos ou se tanto a interação com os nucleotídeos e entre os parceiros ocorrem ao mesmo tempo, ainda é algo desconhecido. Caso a presença de nucleotídeo esteja atrelada a associação com a septina parceira via interface G, isso explica o porquê dos monômeros estarem na forma apo no caso de Cdc3 e Cdc11.

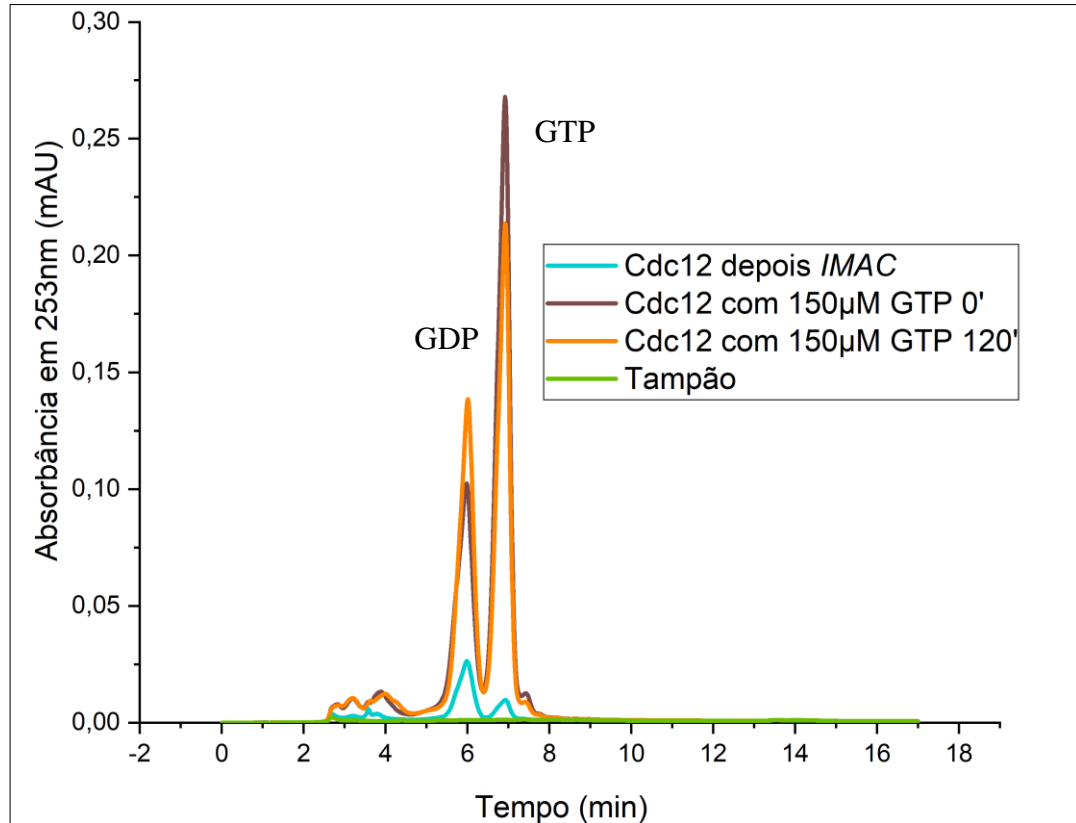


Figura 37 - Cromatograma do perfil de nucleotídeos para a proteína Cdc12(G). A proteína eluída por meio de IMAC possui ambos GDP e GTP (em azul). Adicionando-se GTP à solução proteica, observa-se o deslocamento ligeiro do pico de GTP (~7 minutos) para o pico de GDP (~6 minutos) passadas duas horas após o início da incubação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Estado oligomérico

Por meio de uma curva de calibração da coluna de exclusão molecular utilizada na etapa de purificação (Superdex 200 10/300 GL), calculou-se que as proteínas Cdc3(G) e Cdc11(G) foram purificadas na forma monomérica (Figura 38). Entretanto, como já mencionado anteriormente, Cdc12(G) é muito inclinada à precipitação, o que impossibilitou a definição de seu estado oligomérico pelas técnicas utilizadas neste trabalho.

A massa estimada tanto para Cdc3(G) e Cdc11(G) foi em torno de 35 kDa. Ambas as proteínas foram eluídas no volume aproximado de 17 mL, com valor de K_{av} de 0,53 (Equação 1). A equação definida experimentalmente para a calibração dessa coluna foi de $\text{Log. MW} = -2,83184 K_{av} + 3,03515$ (Equação 2), o que é condizente com o tamanho de ambos os monômeros previstos pelas sequências, respectivamente 36,82 kDa e 34,63 kDa. A

homogeneidade da cromatografia e a eluição em volumes similares mostram que as duas proteínas foram purificadas no mesmo estado oligomérico.

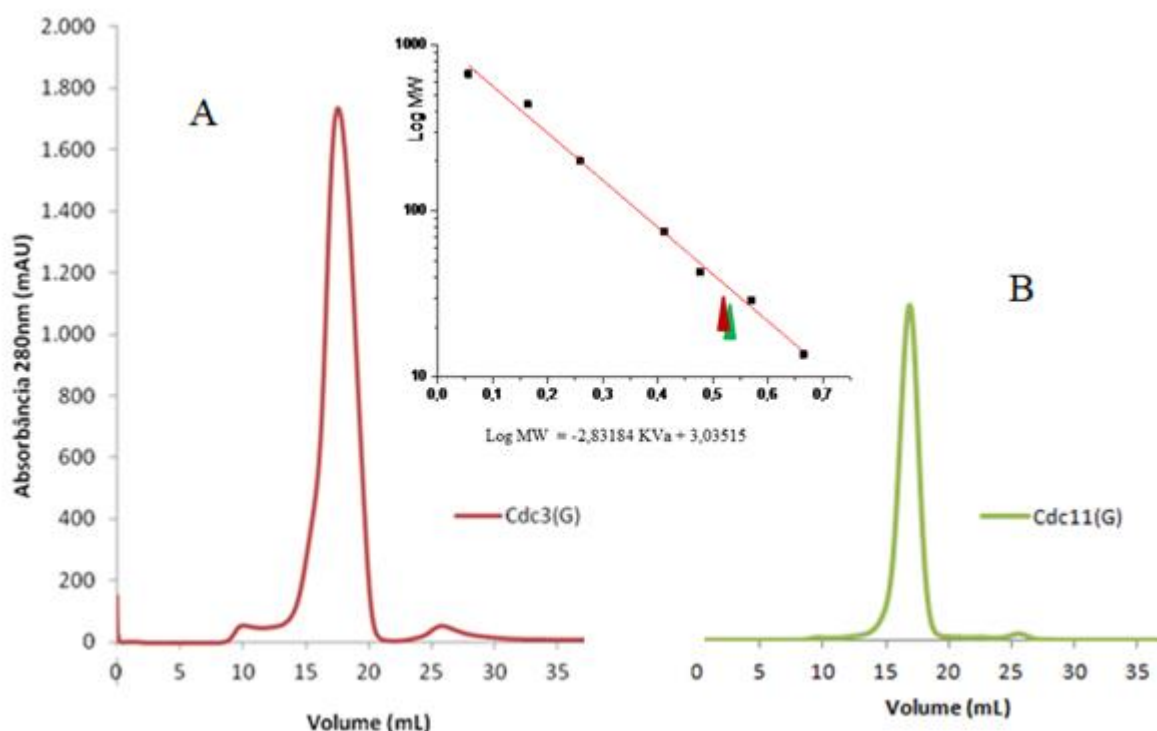


Figura 38 - Perfil de SEC de Cdc3(G) (à esquerda) e Cdc11(G) (à direita) mostrando a curva de calibração ao meio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O estado monomérico das proteínas Cdc11(G) e Cdc3(G) também foi confirmado pela técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz à múltiplos ângulos (*SEC-MALS*). As amostras foram centrifugadas antes de serem aplicadas, para que qualquer agregado decantasse.

Os resultados foram analisados pelo software *ASTRA 7.0.1* (*Wyatt Technology*), que detectou uma massa caracterizada em 35,9 kDa (com um desvio padrão representando +/- 6,37% de variação da massa molecular em Da) para Cdc11(G) e de 38,7 kDa (com um desvio padrão representando +/- 0,65% de variação da massa molecular em Da) para a septina Cdc3(G), o que confirma os estados monoméricos de ambas as proteínas, uma vez que estas possuem massa molecular de em torno de 35 kDa. Na imagem a seguir (Figura 39) vemos o cromatograma de SEC-MALS de Cdc11(G) e Cdc3(G), onde dois picos se destacam. A análise do espalhamento de luz da amostra presente no segundo pico da imagem à esquerda

revela que uma proteína de massa em torno de 35 kDa (35,9 kDa) é responsável por este espalhamento de luz, o que coincide com o estado monomérico de Cdc11(G). O mesmo pode ser dito sobre a imagem à direita, com exceção de que desta vez o traço que corta o pico de *LS* se aproxima à massa molecular de 40 kDa (38,7 kDa). Enfatiza-se que os traços que cortam ambos os picos na Figura 39 representam, no eixo Y, o tamanho calculado para as amostras, enquanto que a inclinação destes traços em relação ao eixo X está relacionada à homogeneidade proteica (o que explica, para Cdc11(G), o seu valor mais elevado de desvio padrão).

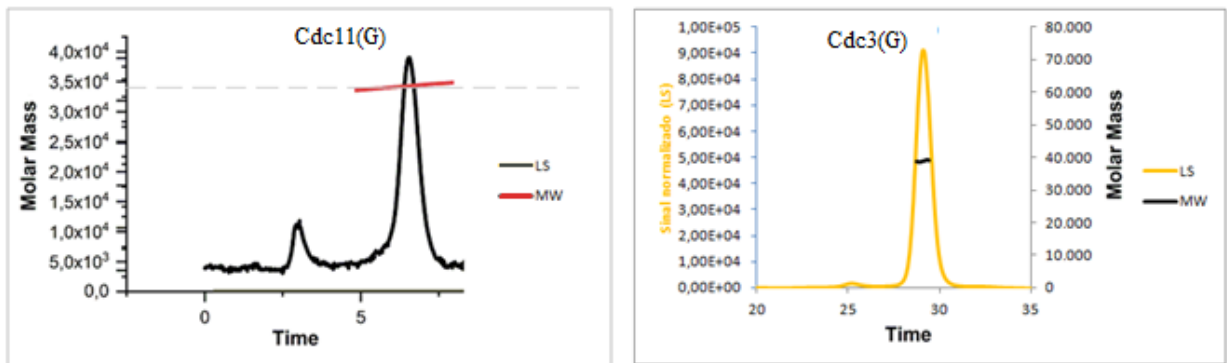


Figura 39 - Cromatograma da septina Cdc11(G) – esquerda – e Cdc3(G) obtido por SEC-MALS. MW (massa molecular) e LS (espalhamento de luz). À medida que a amostra percorre o caminho entre a luz UV e os detectores, estes últimos são capazes de detectar um aumento do índice de refração dada à presença proteica. O aumento do índice de refração devido à proteína em relação ao sinal base do tampão (dRI) é responsável pelos picos observados. Na imagem acima as linhas indicam o tamanho em daltons das amostras e, a inclinação desta, mostra a homogeneidade da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5 Ensaios de cristalização

Como mencionado anteriormente, um dos maiores objetivos deste projeto foi a redeterminação da estrutura cristalográfica de Cdc11(G), cuja estrutura depositada apresenta uma série de parâmetros de validação atípicos e de baixa qualidade.¹ Uma vez que também se obteve as septinas Cdc3(G) e Cdc12(G) de forma purificada, estas, junto ao domínio GTPase da septina Cdc11, foram submetidas a diferentes tentativas de cristalização utilizando-se de um robô de cristalização *Crystal Gryphon* (Art Robbins Instruments®). Placas com 96 condições diferentes e 288 poçinhos e diferentes kits de cristalização (*Morpheus MD*®, *BCS MD*®, *Index HR*®, *JCSG MD*® e *SG1 MD*®), contendo soluções precipitantes, foram utilizados para os ensaios.

Num primeiro instante, apenas a proteína Cdc11(G) formou cristais (na condição *Index G7*, descrito na tabela a seguir), que foram melhorados em relação ao tamanho através de modificações tanto no pH quanto na concentração do agente precipitante. Variou-se o pH para esta condição de 6,1 até 7,5, e a concentração de PEG3350 de 19% até 25%. Logo, esta proteína que sempre esteve no cerne deste projeto, passou por inúmeras tentativas de cristalização, com modificações no protocolo que incluíram a clivagem da cauda de histidina utilizada na purificação por *IMAC* e também a adição de GTP e GDP. Posteriormente, pequenos cristais foram observados em testes de cristalização contendo as proteínas Cdc3(G) e Cdc12(G), (Figura 40). Todas as condições em que ocorreu a formação de cristais estão listadas a seguir (Tabela 7)

Tabela 7 - Condições de cristalização onde se encontrou estruturas cristalinas em testes com as proteínas Cdc11(G), Cdc3(G) e Cdc12(G).

Proteína	Condição	Sal n.1	Sal n.2	Tampão	Precipitante n.1
Cdc11(G)	Index G7	Acetato de amônio 0,2 M		Bis-Tris 0,1M pH 6,5	25% PEG3350
Cdc11(G)	BCS E5	Sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,05 M		HEPES 0,1M pH 7,5	28% PEG SM
Cdc3(G)	Index G11	Cloreto de magnésio hexa-hidratado 0,2 M		Bis-Tris 0,1M pH 6,5	25% PEG3350
Cdc3(G)	BCS G7	Cloreto de cálcio di- hidratado 0,04 M	Formato de sódio 0,1M	PIPES 0,1M pH7,0	8% PEG SH
Cdc12(G)	Index D12	Cloreto de cálcio di- hidratado 0,2 M		Bis-Tris 0,1M pH 5,5	2-Methyl-2,4- pentanediol
Cdc12(G)	Index H9	Acetato de zinco di- hidratado 0,05 M			20% PEG3350

Fonte: Elaborada pelo autor.

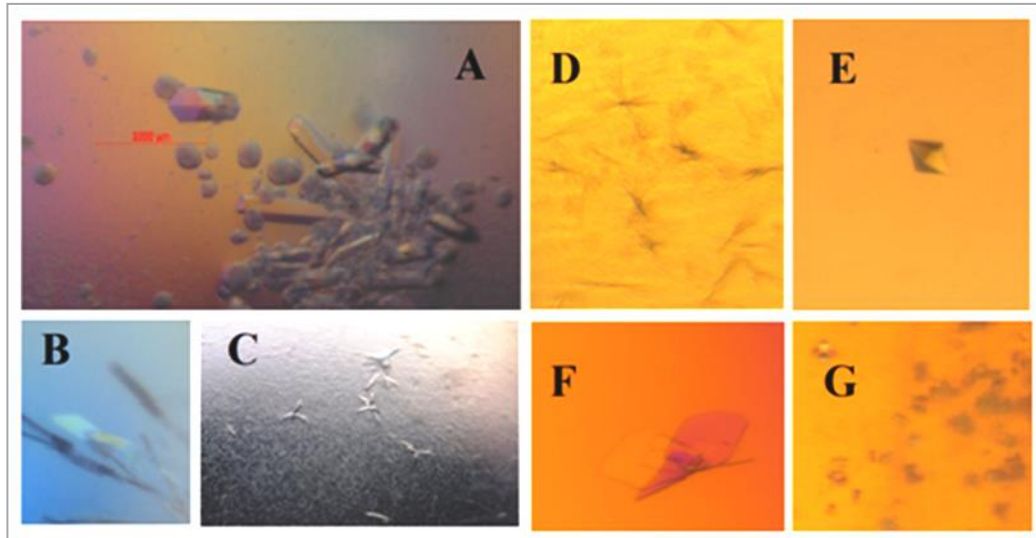


Figura 40 - Fotografias dos cristais das proteínas Cdc11(G) (A – C), Cdc3(G) (D e E) e Cdc12(G) (F e G). A) Cdc11(G) condição Index G7. B) Cdc11(G) condição BCS E5. C) Cdc11(G) + GTP 2 mM condição Index G7. D) Cdc3(G) condição Index G11. E) Cdc3(G) condição BCS G7 F) Cdc12(G) condição Index D12. G) Cdc12(G) condição Index H9.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Interessantemente, a proteína Cdc11(G) não gerou cristais sob as condições de cristalização relatadas em BRAUSEMANN *et al.*¹ (22% de PEG 3350 e 0,1 M Bis-Tris pH5,5). A condição que rendeu os maiores cristais é proveniente de modificações tanto na concentração de PEG 3350 quanto no pH da condição Index G7 (tabela 7). Cristais surgiram apenas nas concentrações de PEG 3350 acima de 23% e em pH acima de 6,5, o que provoca dúvida, uma vez que a estrutura relatada cristalizou em pH 5,5 (PDB 5AR1).

Embora os cristais tenham melhorado consideravelmente em tamanho, apresentassem macroscopicamente faces bem definidas e um formato de bastonete hexagonal aparentemente organizado (Figura 40 – A), os mesmos difrataram apenas a baixa resolução, insuficiente para a determinação da estrutura cristalográfica. Todos os cristais proteicos referentes à Cdc11(G) foram difratados no síncrotron britânico *Diamond Light Source (DLS)* e o melhor conjunto de dados até o momento tem um *cutoff* de 3,79 Å de resolução, onde é possível extrair os parâmetros de cela e a porcentagem de solvente. A substituição molecular, embora encontre uma solução, não condiz com o mapa de densidade eletrônica, impossibilitando a construção de um modelo fidedigno. Já em relação aos outros cristais, estes não difrataram quando expostos aos raios-x, de maneira que nenhum conjunto de dados para as septinas Cdc3(G) e Cdc12(G) foi obtido.

Algo que chama a atenção quando se analisa a estrutura cristalina depositada de Cdc11(G) (além dos critérios de validação relatados no PDB sendo pífios) é o alto conteúdo de solvente no cristal, apontado pelos autores como sendo de 79%. Mesmo sabendo-se que cristais proteicos possuem um conteúdo elevado de solvente quando comparados a cristais inorgânicos, comumente este se apresenta em torno de 60%. Embora o conjunto de dados coletado não tenha culminado numa estrutura cristalográfica, a análise das reflexões indicou que o cristal pertencia ao tipo cristalino hexagonal, sendo seu grupo espacial $P6_22$, muito próximo ao grupo espacial da estrutura depositada ($P6_322$). Além do mais, os parâmetros de cela de ambos eram muito similares ($a = 187,05$, $b = 187,05$ e $c = 57,96$ e $a = 185,98$, $b = 185,98$ e $c = 57,92$). Este fator pode ser um dos responsáveis pela baixa resolução dos conjuntos de dados coletados até o momento, uma vez que quanto maior a quantidade de solvente no interior do cristal, menor é o contato das proteínas no interior deste, geralmente reduzindo a ordem interna do cristal e, por consequência, a resolução do padrão de difração. Como já apontado na proposta inicial deste projeto, a estrutura cristalográfica de Cdc11(G) apresenta diversas incoerências que se refletem desde os dados de validação da estrutura quanto a repetição do protocolo descrito por BRAUSEMANN *et al*¹, que se tornou mais evidente ao longo deste último ano de trabalho. A importância deste trabalho reforça não só a busca pela elucidação correta da estrutura cristalográfica de Cdc11(G) como também mostra a replicabilidade da ciência como preceito fundamental.

4.2 As co-expressões de Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)

Com base nas interações características via interface G em septinas de levedura¹⁷, foi realizada a co-expressão de Cdc3(G) e Cdc10(G) ou Cdc11(G) e Cdc12(G). Os sobrenadantes das colônias onde houve a co-expressão de Cdc11(G)/Cdc12(G) e Cdc3(G)/Cdc10(G) inicialmente foram purificados por *IMAC* após lise celular. Utilizou-se nestes estudos uma coluna de 10 mL contendo 1 mL de resina Ni-NTA Agarose (Quiagen®), cujo metal presente é o níquel (também tentou-se o uso de uma resina TALON® na purificação por *IMAC*, esta contendo cobalto como metal imobilizado, o que aumentou a eficiência da purificação do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G)). Para limpar resquícios de outras proteínas, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão de lise antes do passo de eluição. Nas próximas etapas as proteínas ligadas à coluna foram eluídas num único passo ao invés da eluição com concentrações crescentes de Imidazol, como ocorreu com os monômeros. Foi utilizado 10 mL de tampão

contendo 200 mM de Imidazol seguido por mais duas aplicações de 5 mL deste mesmo eluente.

As amostras resultantes de cada etapa da purificação por *IMAC* foram aplicadas em um gel de poliacrilamida e submetidas à eletroforese (SDS-PAGE). Como resultado, observou-se o padrão de solubilidade das amostras purificadas, o aparente rendimento do processo e quão equimolar estão as proteínas co-expressas (pelo menos em termos qualitativos). Este último se deve ao fato de que nem toda proteína ligada à coluna cromatográfica estará com a sua septina parceira, com uma leve tendência de que haja uma maior quantidade da proteína onde a *His-tag* está presente.

Os diferentes géis de SDS-PAGE mostraram que ambas as proteínas foram eluídas de maneira satisfatória, uma vez que além de serem purificadas na fração solúvel, o rendimento desta etapa foi suficiente (para ambas as co-expressões) para satisfazer os experimentos seguintes (Figura 41). O gel também mostra a aparente fração de septinas que ficou retida no *pellet*, justamente pelo caráter hidrofóbico que algumas possuíam sem a sua devida parceira e, por esta razão, fácil agregação e precipitação.

Os diferentes géis contendo as amostras indicam que a co-expressão e purificação por *IMAC* de Cdc3(G)/Cdc10(G) foi bem sucedida (Figura 41, fração **E1**, à esquerda), com um rendimento satisfatório de ambas as septinas, que aparentam estar equimolares. O que se observa no gel são duas bandas bem definidas e separadas, onde a proteína Cdc3(G), de maior massa molecular por possuir a *His-tag*, aparece um pouco acima de Cdc10(G). Nota-se como a expressão com sua proteína parceira auxiliou a expressão solúvel de Cdc10(G), que não pôde ser purificada quando expressa sozinha (Figura 41, esquerda). Esta septina, que se encontra no centro do octâmero, sempre apresentou alta insolubilidade, não obstante as tentativas diversas de transformação e ajustes de tampão (Figura 32.D). Concluímos que a formação do dímero através de uma interface G com a septina parceira Cdc3(G) aumenta a solubilidade da Cdc10(G), provavelmente por ser uma interface fisiológica existente no heterocomplexo octamérico.

Com relação à Cdc11(G)/Cdc12(G), destaca-se que o dímero formado também foi purificado ao que parece ser em razão equimolar, embora mereça destaque que o rendimento desta etapa tenha sido mais baixo em relação a sua contraparteira Cdc3(G)/Cdc10(G). Veem-se duas bandas separadas (Figura 41 fração **E1**, à direita), onde a amostra maior é Cdc11(G), também por ser a portadora da *His-tag*. Também se observa uma grande porção do que

aparenta ser um excesso da septina Cdc12(G) na fração P (*pellet* insolúvel, Figura 41, circulado em vermelho). Desse modo, embora o dímero tenha sido formado, o gel nos mostra como é trabalhoso o manuseio desta septina de levedura que tende a fácil precipitação, como já discutido.

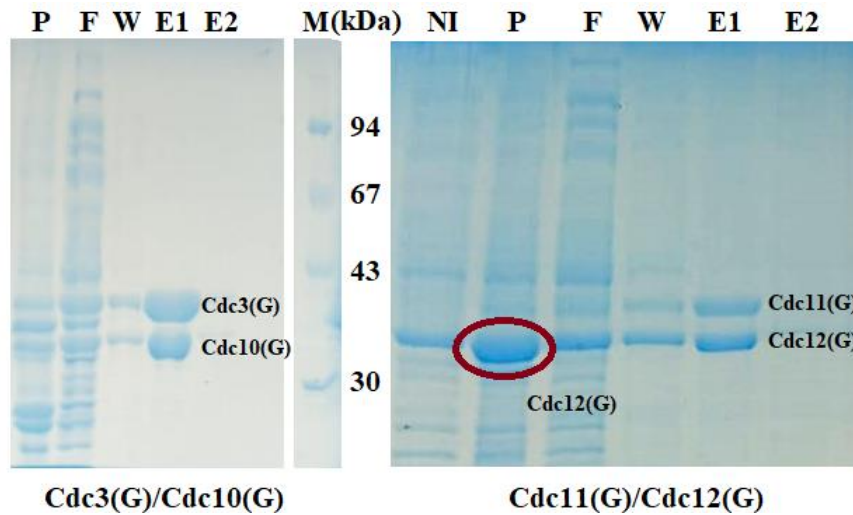


Figura 41 - Padrão de purificação do domínio GTPase das septinas co-expressas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G). **M** Marcador molecular **NI** Não induzido **P** Pellet **F** Não ligado **W** Lavagem **E1** Eluição 1 **E2** Eluição 2. A terceira eluição (**E3**) foi omitida por não possui bandas purificadas visíveis. Em ambos os géis se observa que na raia E1 existem, aparentemente, apenas duas proteínas purificadas, em razão aproximadamente equimolar. As proteínas Cdc3(G) e Cdc11(G) são um pouco maiores (em Da) por possuírem a *His-tag*, motivo pelo qual se localizam pouco acima de suas parceiras no gel. O círculo vermelho (à direita) indica provavelmente a proteína de Cdc12(G), que apresentou problemas de solubilidade e instabilidade quando expressa sem a septina parceira.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para maior eficiência na purificação das proteínas co-expressas e separação dos diferentes estados oligoméricos, as amostras eluídas na fração E1 (e às vezes misturadas à fração de limpeza W, já que muitas vezes uma quantidade considerável das proteínas de interesse não se ligava à coluna cromatográfica e o gel indicava pouca presença de contaminantes) passaram por uma etapa extra de purificação *SEC* utilizando um sistema ÄKTA purifier GE® e uma coluna Superdex 200 16/60 GL, necessária para a melhor separação entre a fração monomérica e dimérica. Ambas as proteínas expressas com a sua septina parceira puderam ser purificadas por exclusão molecular com relativo sucesso, conforme mostra a imagem a seguir (Figura 42)

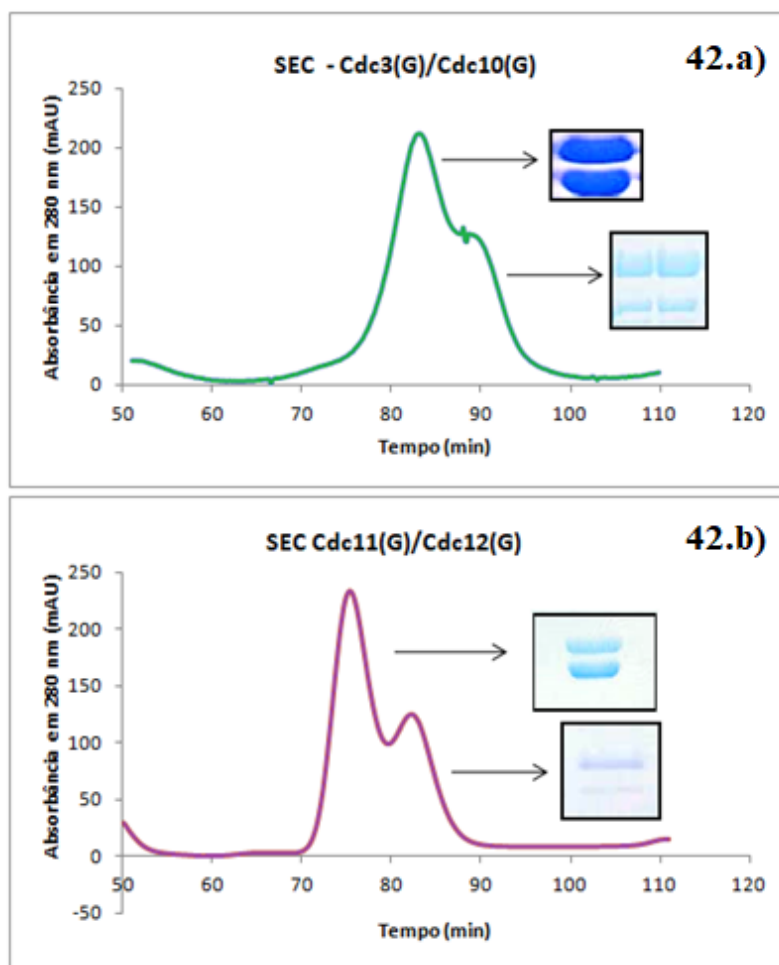


Figura 42 - Cromatograma de *SEC* (Superdex 200 16/60) após etapa de *IMAC* das proteínas co-expressas (a) Cdc3(G)/Cdc10(G) e b) Cdc11(G)/Cdc12(G). O gel *SDS-PAGE* das frações relativas ao primeiro pico dos cromatogramas (destaque) indica que as proteínas estão próximas da equimolaridade. Já o segundo pico mostra uma mistura de ambos os monômeros, que possuem massa molecular similar, onde a septina de maior peso molecular é mais presente por possuir a *His-tag* usada na etapa anterior de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diz se relativo sucesso da etapa de purificação pela baixa quantidade de proteína resultante deste processo para ambas as construções em comparação com as proteínas expressas isoladamente Cdc11(G) e Cdc3(G), estas com um rendimento de seis a oito vezes maior que as construções co-expressas, conforme pode ser visto pelo valor de absorbância das cromatografias de exclusão molecular (Figura 33 e Figura 42). Além do mais, os dois picos mostrados no cromatograma não são totalmente resolvidos, o que indica que dada à proximidade entre a massa molecular dos dois diferentes estados oligoméricos, existe uma mistura de espécies nos picos referentes às duas populações. Assim, a purificação por *SEC*

auxiliou na melhor separação entre dímeros e monômeros, porém não com a eficiência desejada.

O primeiro e o segundo pico observados nas Figura 42.a e Figura 42.b correspondem respectivamente a dímeros e monômeros, com massa molecular em torno de 70kDa e 35kDa aproximadamente. Essa afirmação será retomada numa sessão posterior, onde se aborda o estado oligomérico resultante das etapas de purificação.

Algo que merece especial destaque é o fato de que a co-expressão com o septina parceira permitiu que ambas as proteínas Cdc10(G) e Cdc12(G) pudessem ser purificadas tanto por *IMAC* quanto por *SEC*. Quando expressas isoladamente, boa parte dessas proteínas ficava retida na fração do *pellet* e a fração solúvel remanescente precipitava facilmente, conforme já relatado. A simples purificação com a parceira parece indicar uma melhora significativa no comportamento dessas duas septinas quanto à purificação, conforme já observado com algumas septinas humanas ²³.

A co-expressão de Cdc11(G)/Cdc12(G) em especial, conforme já descrito na literatura,⁶² é problemática. Além da baixa expressão, não raro o passo de eluição da purificação por *IMAC* resultou na liberação apenas da septina com a *His-tag* (no caso Cdc11(G)), com a sua parceira sendo descartada no processo de lavagem da coluna ou agregando no *pellet*. Essa Cdc11(G) projetada junto ao plasmídeo pETDuet para a co-expressão é muito similar àquela adquirida para a expressão sem a septina parceira, sendo que sua única diferença é a ausência de alguns aminoácidos na região N-terminal, assim como a ausência de um sítio de clivagem para a enzima TEV protease (tabela 3). Por ser um pouco diferente da construção passada ela foi denominada Cdc11(G)*, e quando a co-expressão não culminou na formação do dímero (Figura 43.a), esta septina foi purificada por *SEC* (Figura 43.b) com sucesso para ensaios de cristalização. Por possuir menos resíduos em seu N-terminal, esperava-se que esta proteína pudesse produzir cristais com maior ordem interna e gerar um padrão de difração adequado para a determinação da sua estrutura cristalográfica. Infelizmente, os dados de sua difração, obtidos no síncrotron *DLS*, são de muito baixa resolução também (por volta de 5 Å), não permitindo a elucidação da estrutura cristalográfica.

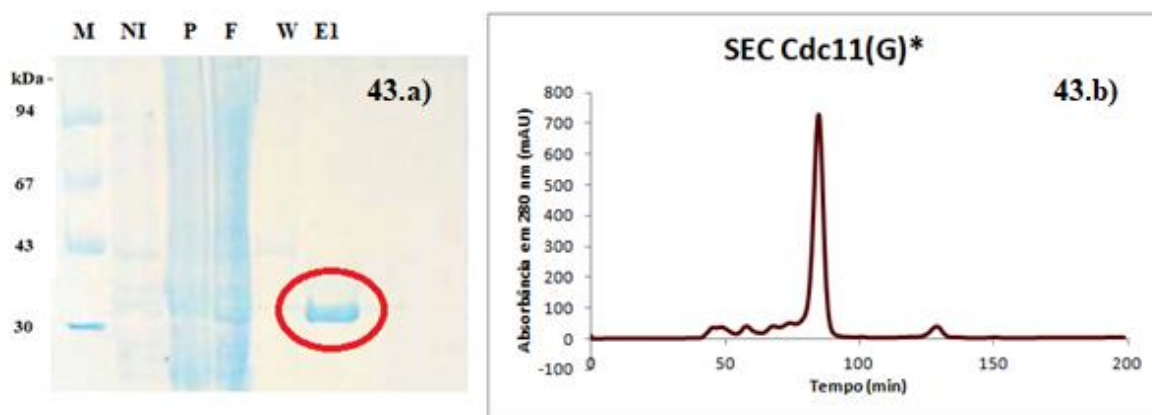


Figura 43 - a) Gel *SDS-PAGE* da septina Cdc11(G)*, mostrando a pureza da amostra eluída (E1, círculo) após a etapa de *IMAC*. Esta fração foi então purificada por *SEC* (b) utilizando-se uma coluna Superdex 200 16/60 onde se observa um pico bem definido, no tempo de eluição onde se espera um monômero de septina. Nesse caso, Cdc12(G) ficou na fração *pellet* ou na fração não ligada (não mostrado).

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.1 Dicroísmo circular (CD)

A técnica de Dicroísmo Circular associada ao aumento gradativo de temperatura foi utilizada desta vez para determinar o T_m do dímero de septina Cdc11(G)/Cdc12(G). O mesmo protocolo usado na determinação do T_m dos monômeros Cdc11(G) e Cdc3(G) foi aplicado no estudo deste dímero. O mesmo não pôde ser realizado com o dímero Cdc3(G)/Cdc10(G) dada as dificuldades na preparação da amostra. Isso se deve à dificuldade de estabilizar este complexo quando ele era preparado no tampão exigido pela técnica de CD (Tabela 6).

As amostras, após purificação por *IMAC* e *SEC* em tampão fosfato com menor concentração salina (Tabela 6), foram utilizadas no experimento. A faixa de temperatura variou mais uma vez de 4°C à 90°C e o T_m foi estimado a partir dos dados referentes ao espectro de CD no comprimento de onda de 222nm, para cada temperatura. Desse modo, a curva fitada para este dímero revela que o T_m deste está em torno de 41,9°C (Figura 44).

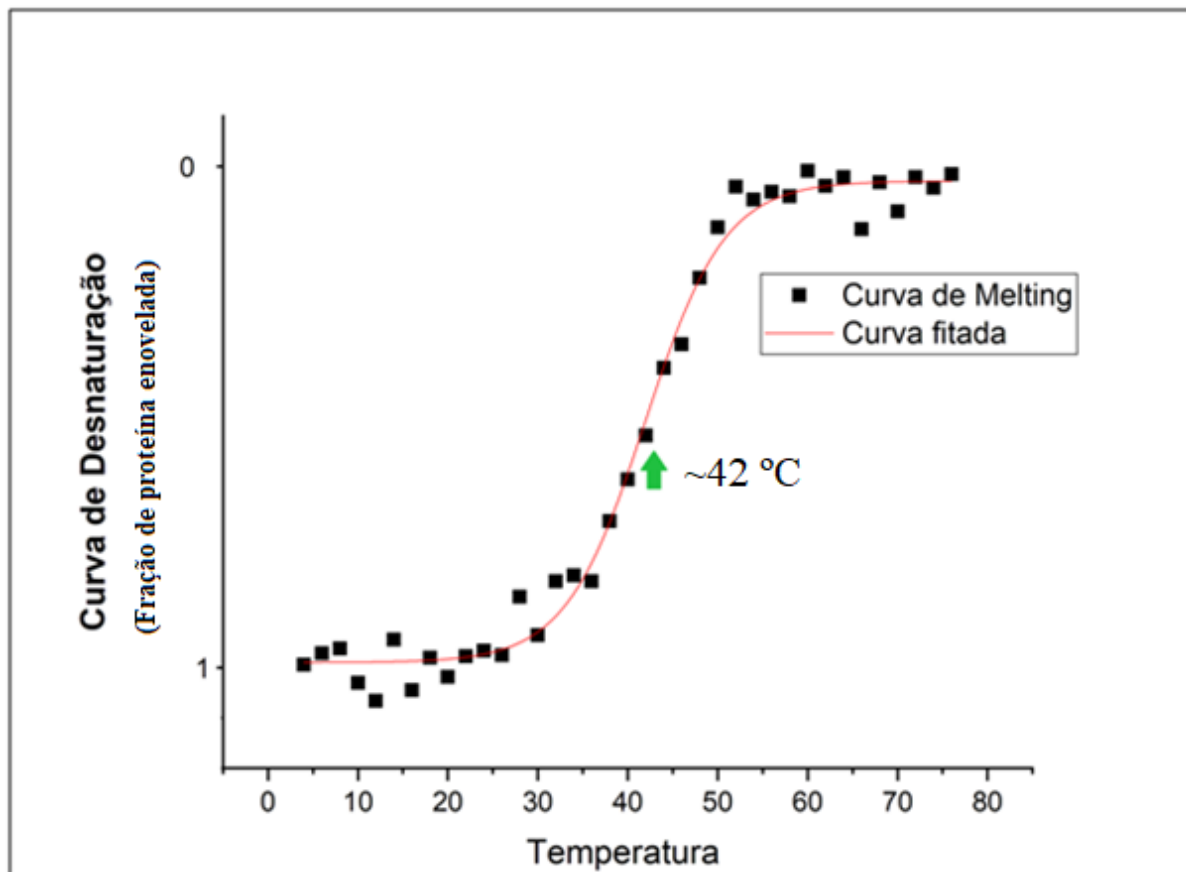


Figura 44 - Curva de desnaturação térmica do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A princípio planejava-se medir a estabilidade térmica dos monômeros expressos sozinhos para compará-los com as septinas expressas na presença da sua relativa parceira via interface G. Entretanto, uma série de variáveis tornou esta tarefa difícil, em especial a purificação de algumas septinas isoladas ou a precipitação das amostras diméricas dentro da cubeta (razão pela qual não foram obtidos resultado sobre o T_m do dímero Cdc3(G)/Cdc10(G)). Durante este projeto, determinou-se o T_m das septinas Cdc3(G) e Cdc11(G) (Figura 35) por meio de dicroísmo circular, o que não foi feito para as septinas Cdc10(G) e Cdc12(G) quando sem a parceira devido à instabilidade de ambas, que não puderam nem ao menos ser purificadas por *IMAC* e/ou *SEC*.

O fato de que durante a co-expressão todas as proteínas puderam ser purificadas advoga em favor de que as septinas parceiras auxiliaram a solubilidade/estabilidade de Cdc10(G) e Cdc12(G). Porém, o menor rendimento e a maior precipitação observada dos dois dímeros em relação aos monômeros Cdc3(G) e Cdc11(G) dão a entender que, por sua vez,

proteínas parceiras diminuem a estabilidade de Cdc11(G) e Cdc3(G), que quando expressas sozinhas, no estado monomérico, tiveram alto rendimento e não apresentaram problemas durante a purificação ou mesmo qualquer sinal de agregação. Isso é corroborado pela diminuição de T_m do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G) ($\sim 42^\circ\text{C}$) em relação ao monômero Cdc11(G) ($\sim 48,5^\circ\text{C}$) (Figura 45)

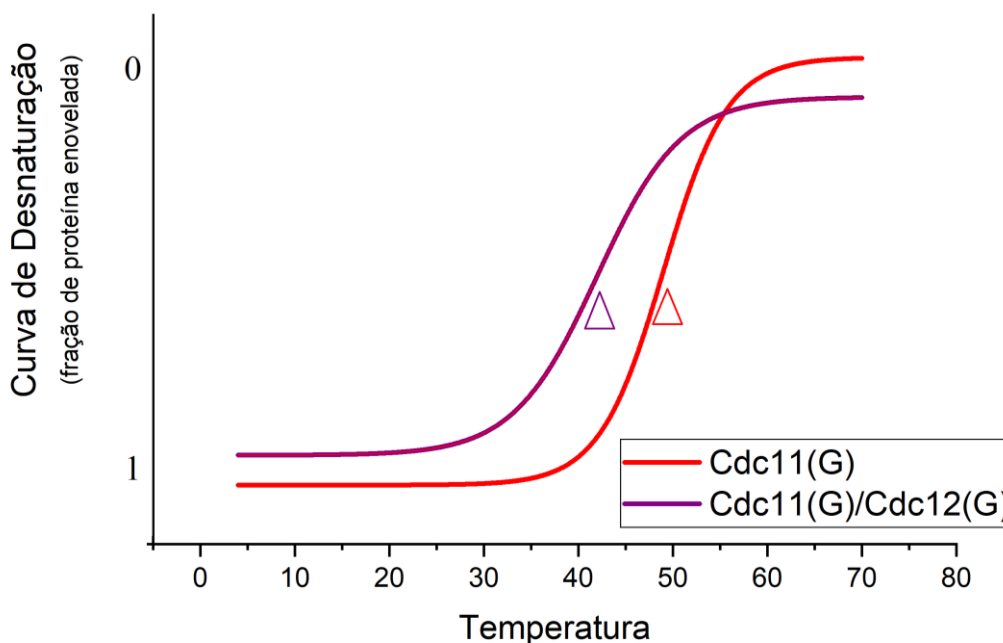


Figura 45 - Comparação das curvas de transição do estado enovelado para o desenovelado a partir do aumento de temperatura do monômero Cdc11(G) e do dímero Cdc11(G)/Cdc12(G), em vermelho e lilás respectivamente. Nota-se que o ponto no meio da curva sigmoide (cabeças de seta), que indica que metade das proteínas está enovelada e a outra metade perdeu estrutura, é atingido em menor temperatura na amostra dimérica do que na monomérica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Porém, a capacidade de determinar os T_m de Cdc11(G) e Cdc3(G) isoladas por CD (técnica que exige uma amostra estruturada) e a capacidade de purificar Cdc12(G) e Cdc10(G), que até então não haviam sido purificadas por SEC, na presença da septina parceira, revela a importante função de Cdc11 e Cdc3 no quesito estabilização de suas parceiras. Este ponto será retomado na seção sobre SEC-MALS, onde se confirmou a formação de dímeros quando co-expressos Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G).

4.2.2 Ensaios de conteúdo de nucleotídeo

Na seção 4.1.3 foi demonstrado que os monômeros Cdc11(G) e Cdc3(G) são purificados na forma apoproteína quando expressos isoladamente. Já Cdc12(G) não apenas é purificada com GTP ou GDP ligados assim como pode catalisar a hidrólise do nucleotídeo. A partir dessas informações, se buscou determinar se existem nucleotídeos nas amostras diméricas e a natureza dos mesmos. Assim, o mesmo protocolo de purificação e o mesmo método desnaturante relatado anteriormente foram seguidos para as amostras Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G). O cromatograma da troca iônica obtido a partir da solução dos nucleotídeos liberados é mostrado a seguir (Figura 46).

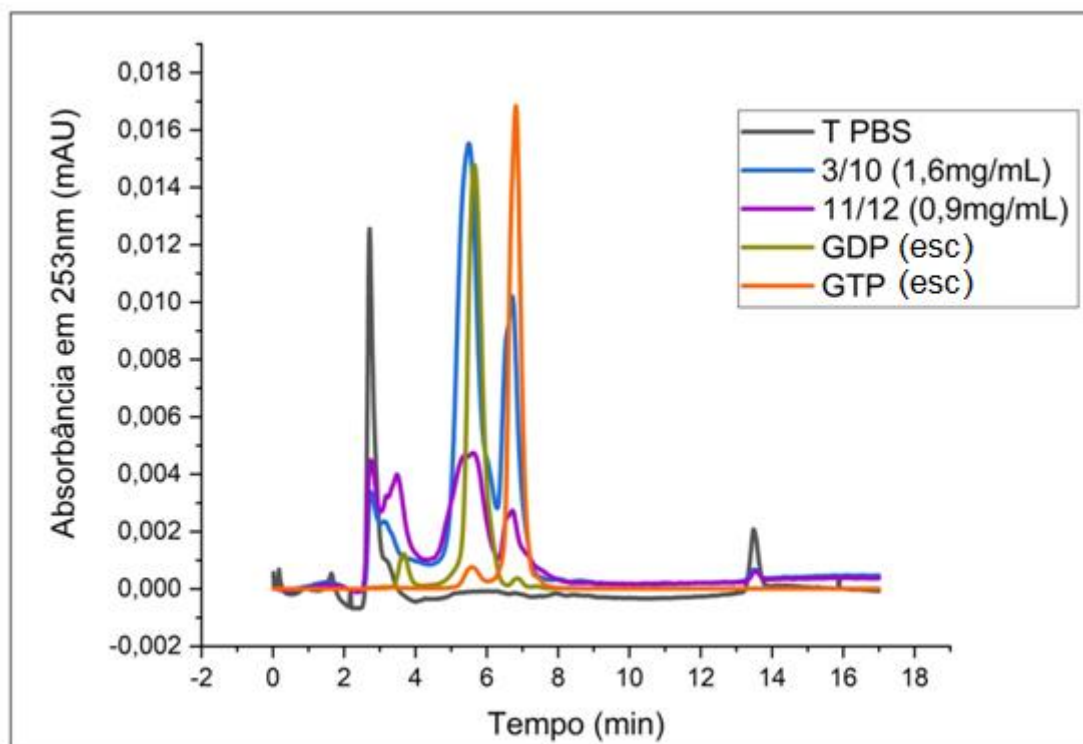


Figura 46 - Perfil de nucleotídeos extraídos dos complexos de septinas diméricas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G) comparados com os padrões de GTP e GDP normalizados, onde se observa tanto o nucleotídeo bi e trifosfatado em ambas as amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados desta cromatografia são muito interessantes e ao mesmo tempo intrigantes. Isso porque duas das septinas presentes nos dímeros não possuem nenhum nucleotídeo ligado quando expressas sem a parceira (Cdc3(G) e Cdc11(G)), como já demonstrado (Figura 36). Além do mais, a estrutura cristalográfica de Cdc11(G) relatada por BRAUSEMANN *et al* ¹

não possui nucleotídeo em seu interior, numa região (um bolsão) conhecida como *Nucleotide Binding Pocket* (NBP) e conservada nas septinas em geral (PDB: 5AR1). Entretanto, as amostras co-expressas liberam tanto GTP como GDP quando tratadas pelo protocolo desnaturante e, de modo qualitativo, se observa que a concentração dos nucleotídeos em ambas as amostras não é equimolar, com uma prevalência de GDP.

Uma mistura dos dois nucleotídeos pode ser explicada principalmente pela presença de uma septina cataliticamente ativa e outra inativa em cada um dos dímeros. Portanto, espera-se encontrar Cdc3(G) e Cdc11(G) (cataliticamente inativas) ligadas a GTP enquanto Cdc10(G) e Cdc12(G) ligadas a GDP. A maior quantidade de GDP liberado sugere que provavelmente existe uma mistura de populações de septinas, inativas onde no interior do NBP pode existir tanto GTP como GDP²⁵. É provável que o GDP seja adquirido do meio celular durante a expressão e purificação, uma vez que a falta de atividade catalítica dessas septinas proíbe a conversão de GTP em GDP.

As estruturas cristalográficas de septinas humanas mostram que em dímeros em que uma proteína é cataliticamente ativa e a outra não, em cada septina se encontra uma forma fosfatada do nucleotídeo de guanina²³. Os dados mostrados na Figura 46 mostram a presença de ambos (GDP e GTP), coerente com o que a literatura espera sobre a expressão de dímeros. Os dados sugerem, portanto, que os dímeros apresentam interfaces G fisiológicas estabilizadas pela presença de GTP ligado a Cdc3(G) ou Cdc11(G) e GDP ligado a Cdc10(G) ou Cdc12(G). Conforme indica a Figura 18, a capacidade das septinas cataliticamente inativas de ligar nucleotídeo na presença do parceiro e a estabilização da forma heterodimérica (com conseqüente polimerização do filamento), provavelmente são eventos indissociáveis.

4.2.3 Estado oligomérico

Os estados oligoméricos das proteínas co-expressas Cdc3(G)/Cdc10 e Cdc11(G)/Cdc12(G) foram confirmados por SEC-MALS. A análise dos resultados foi feita pelo software *ASTRA 7.0.1* (Wyatt Technology), que confirmou duas amostras com tamanho em torno de 65 - 70 KD, ratificando que Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G) formaram dímeros em solução.

Na Figura 47 se observam os cromatogramas de *SEC-MALS* para diferentes expressões de septinas, onde no eixo colorido à esquerda está o sinal normalizado do espalhamento de luz (LS) e no eixo à direita está o peso molecular da amostra. O traço em preto que corta os picos indica a massa molecular das partículas (observada no eixo à direita) e, quanto mais horizontal é este traço, mais homogênea é a amostra através do pico. Neste ponto vale retomar as discussões sobre estabilidade e homogeneidade dos monômeros e dos dímeros.

As septinas Cdc3(G) e Cdc11(G) na ausência da parceira via interface G foram purificadas sem problemas e com alto rendimento, não apresentando problemas de agregação durante as etapas. O cromatograma de *SEC-MALS* destas proteínas (Figura 39) mostra um pico simétrico, sugerindo uma grande homogeneidade da amostra, que possui pouca variação de massa molecular através do pico (traço horizontal). Já para os dímeros purificados, nota-se que ambos possuem massa molecular ao redor de 70 kDa, adequado para a caracterização de seus estados oligoméricos como diméricos (Figura 47), de acordo com o esperado. Todavia, existe grande variação do tamanho calculado para esta massa molecular, como indicam os traços horizontais não retos que cortam os picos (Figura 47.a e Figura 47.b). Isto versa sobre a heterogeneidade da amostra, que possui populações diferentes de partículas, onde parece haver uma transição de dímeros para monômeros. Para estudos estruturais, em especial a cristalografia de macromoléculas (que necessita de homogeneidade), essa heterogeneidade pode representar uma séria limitação.

O dímero Cdc11(G)/Cdc12(G), o mais instável, só pôde ser concentrado até ~1 mg/mL devido à sua instabilidade e fácil precipitação. Como discutido anteriormente na seção sobre CD, tanto Cdc11(G) quanto Cdc3(G) parecem estabilizar as septinas parceiras, permitindo a purificação de ambos os dímeros. Visto que tanto Cdc10(G) e Cdc12(G) quando expressas sozinhas não puderam ser purificadas por *SEC* devido à insolubilidade e/ou instabilidade de ambas, não é inesperado que os dímeros apresentem certa heterogeneidade. Isto também concorda com a dificuldade de realizar experimentos de CD com os dímeros de Cdc3(G)/Cdc10(G), cujos sinais eram demasiado ruidosos. Entretanto é necessário ressaltar que a co-expressão permitiu que tanto Cdc10(G) como Cdc12(G) pudessem ser purificadas na forma dimérica com a parceira, apesar de certa heterogeneidade.

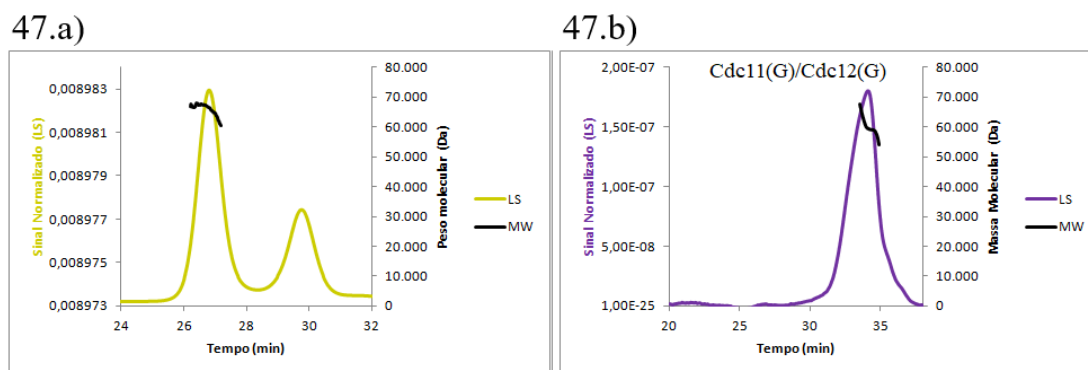


Figura 47 - Cromatograma de *SEC-MALS* do dímero (a) Cdc3(G)/Cdc10(G) e do dímero (b) Cdc11(G)/Cdc12(G). Detalhe para os traços que cortam os picos, cuja homogeneidade da amostra depende de quão reto eles são. Em (a), o segundo pico corresponde a uma amostra do tamanho de um monômero (o traço horizontal foi omitido).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.4 Ensaios de cristalização e difração de raios-x

Depois de purificados, os dímeros contendo os domínios G das septinas Cdc3(G)/Cdc10(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G) foram submetidos a tentativas de cristalização utilizando-se de um robô de cristalização *Crystal Gryphon* (*Art Robbins Instruments*®), placas de 96 poços e diferentes kits de cristalização (*Morpheus MD*®, *BCS MD*®, *Index HR*®, *JCSG MD*® e *SG1 MD*®) contendo soluções precipitantes. Em geral, devido a mais fácil precipitação destes, desta vez varreu-se um espectro de concentrações proteicas que variaram de 1 mg/mL até 10 mg/mL dependendo de quão bem se comportou cada amostra durante as etapas de preparação. A proteína denominada Cdc11(G)* (produto da não formação do dímero com a sua parceira, Cdc12(G)) também passou por tentativas de cristalização após purificada, nas mesmas condições descritas anteriormente. Em geral, para cada uma das 96 condições diferentes do kit varreu-se três proporções distintas entre proteína e solução precipitante (2:1, 1:1 e 1:2) na técnica conhecida como gota sentada. As placas foram mantidas a 20°C, e alguns cristais surgiram para as construções contendo Cdc11(G)* e Cdc3(G)/Cdc10(G) após 24 horas (Figura 48). Após atingirem o seu tamanho máximo (3-7 dias) os cristais foram congelados em nitrogênio líquido para serem preservados até o experimento de difração. As condições que originaram cristais estão descritas na tabela a seguir (tabela 8).

Tabela 8 - Condições de cristalização onde ocorreu o surgimento de cristais proteicos em testes com as proteínas Cdc11(G)* e Cdc3(G)/Cdc12(G).

Proteína	Condição (screening)	Sal n.1	Tampão	Precipitante n.1
Cdc11(G)*	SG1 F2	Acetato de sódio tri-hidratado 0,2M	Hepes 0,1 M pH 7,5	25% PEG3350
Cdc11(G)*	PACT F12	Malonato de sódio dibásico mono-hidratado 0,2M	Bis-Tris propano 0,1 M pH 6,5	20% PEG3350
Cdc11(G)*	Morpheus A4	Cloreto de magnésio 0.3M Cloreto de cálcio 0.3 M	MES/imidazol 0.1 M pH 6.5	12.5% PEG1000, 12.5% PEG3350, 12.5% MPD
Cdc11(G)*	Index D11		BIS-TRIS 0,1 M pH 6,5	28% PEG2000
Cdc11(G)*	Index G7	Acetato de amônio 0,2M	BIS-TRIS 0,1 M pH 6,5	25% PEG3350
Cdc3(G)/ Cdc10(G)	PACT A9	Cloreto de lítio 0,2M	Acetato de sódio 0,1 M pH 5,0	20% PEG6000
Cdc3(G)/ Cdc10(G)	PACT B1		MIB 0,1 M pH 4,0	25% PEG1500
Cdc3(G)/ Cdc10(G)	PACT B2		MIB 0,1 M pH 5,0	25% PEG1500
Cdc3(G)/ Cdc10(G)	PACT D1		MMT 0,1 M pH 4,0	25% PEG1500

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como os cristais de Cdc11(G), Cdc11(G)* não resultou num padrão de difração adequado para a determinação da sua estrutura cristalográfica, não apresentando qualquer sinal de melhora, em termos de resolução, quando comparado à Cdc11(G). O melhor conjunto de dados obtidos até o presente para esta construção foi na ordem de 5 Å. O intuito deste projeto teve como alicerce redeterminar a estrutura depositada do domínio GTPase de Cdc11¹, que apresentou vários problemas de validação de sua estrutura cristalográfica. O motivo de se ter usado apenas o domínio GTPase da septinas nestes estudos inclusive decorre da desordem intrínseca do domínio N-terminal, cuja presença dificulta a formação de cristais proteicos.

As condições de cristalização de Cdc11(G) foram expandidas ao longo deste trabalho e dados de mais de 100 cristais foram coletados durante este projeto. Entretanto, todos eles difrataram a uma resolução baixa. Tentou-se resolver um desses conjuntos de dados pelo método de substituição molecular, todavia sem sucesso. A solução encontrada pela substituição molecular não condizia com a cadeia polipeptídica e as tentativas de refinamento

não foram possíveis. Na Figura 48 (H) observa-se um destes cristais na linha de raios-x i04-1, do síncrotron britânico *DLS*, onde aguardava difração. Mesmo possuindo faces bem definidas e um tamanho considerável, eles não geraram bons dados de difração.

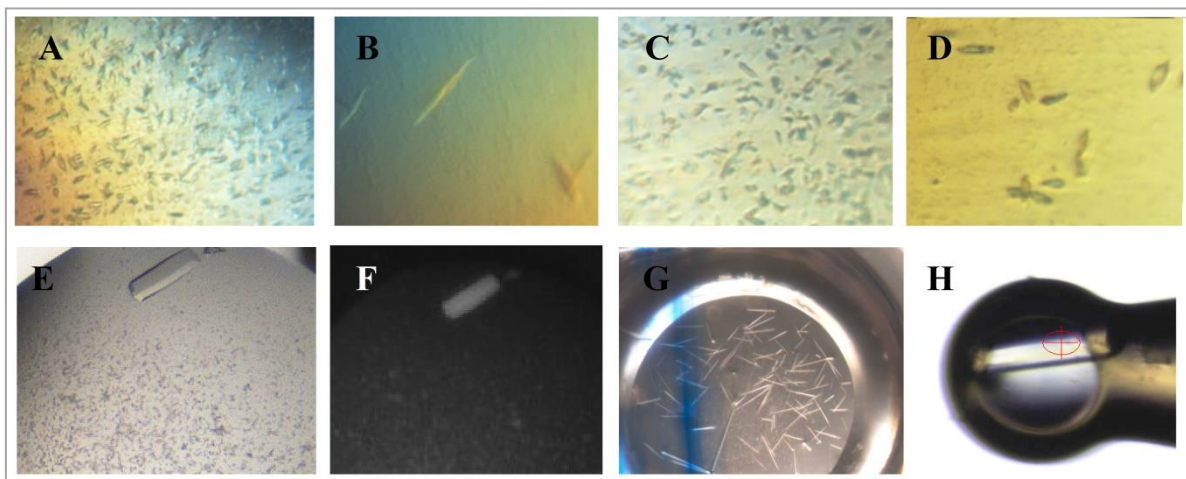


Figura 48 - Cristais proteicos provenientes de amostras contendo Cdc3(G)/Cdc10(G) (A-D), Cdc11(G)* (E-F) e Cdc11(G) (G-H). Em (F) uma foto tomada com luz ultravioleta do cristal mostrado em (E) revela a natureza proteica deste. Em (H) um cristal montado para o experimento de difração

Fonte: Elaborada pelo autor.

Numa tentativa de gerar cristais mais ordenados, este projeto foi na direção de co-expressar as septinas com as suas parceiras, visando que os dímeros pudessem render cristais com maior ordem interna. A cristalização dos dois dímeros se realizou (Cdc11(G)/Cdc12(G) rendeu apenas um cristal, motivo pelo qual não aparece na Figura anterior), porém os conjuntos de dados referentes a eles, coletados na linha *Manacá* do síncrotron brasileiro *Sirius*, infelizmente não permitiram a elucidação da estrutura cristalográfica das amostras devido à limitação da resolução ($\sim 5 \text{ \AA}$).

De fato 2020 e 2021 foram anos muito atípicos em virtude da pandemia de COVID-19, sendo muito difícil a logística das coletas (envio e recebimento de Dewars) e até mesmo o acesso às linhas de raios-x. Em decorrência destes fatores externos, a produção de cristais foi interrompida até que as condições voltem à normalidade. Em outra frente, se optou por modelagem por homologia utilizando-se a estrutura de dímeros de septinas humanas elucidadas pelo nosso grupo de pesquisa, título da próxima sessão.

4.2.5 Os modelos de Cdc11(G) e Cdc11(G)/Cdc12(G)

4.2.5.1 Cdc11(G) e sua interação via interface G com Cdc12(G)

Uma vez que a estrutura cristalográfica de Cdc11(G) depositada (PDB: 5AR1) apresenta uma série de problemas, como anteriormente mencionado, e de que, infelizmente, este projeto não logrou cristais capazes de difratar a alta resolução, uma modelagem a partir de septina homóloga (Sept2 – PDB: 6UPR) foi feita para esta proteína (Figura 49.a). De maneira semelhante foram modelados os dímeros Cdc11(G)-Cdc11(G) e Cdc11(G)-Cdc12(G) com base na estrutura de Sept2 e sept8 (PDB: 6UPR²³), que apresentam uma interface NC e outra G, respectivamente (Figura 49.b e Figura 49.c). Estas interfaces existem no filamento maduro, uma vez que a interface-G entre Cdc11 e Cdc12 faz parte do octâmero e a interface NC existe entre duas cópias de Cdc11 que se formam durante a polimerização dos octâmeros. Os modelos foram gerados usando o programa *Modeller* conforme detalhado nos métodos desta dissertação.

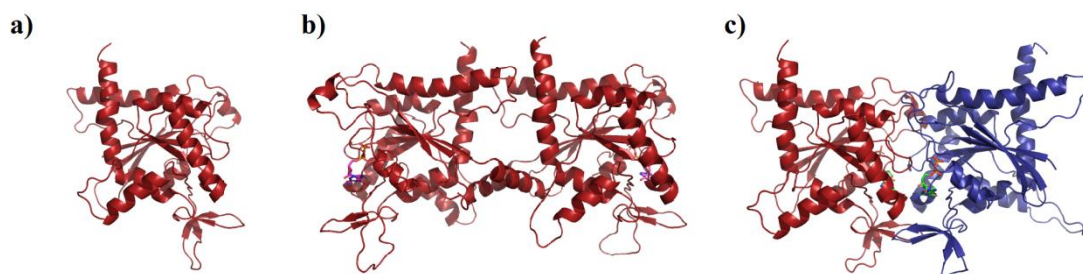


Figura 49 - Representação do tipo *cartoon* das modelos gerados por homologia das septinas Cdc11(G) monomérica (a), dimérica (interface NC) (b) e heterodimérica (interface G) com a parceira Cdc12(G) (c).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cinco melhores modelos gerados pelo *Modeller*, ranqueados a partir de seu *DOPE Score*,⁵⁵ foram avaliados segundo os servidores de validação descritos na metodologia. Após uma análise geral dos resultados de cada programa de validação, foi escolhido o melhor modelo para cada modelagem entre estes cinco (destacado em amarelo, na tabela).

Tabela 9 - Parâmetros de validação dos modelos gerados por *Modeller* de acordo com os programas *Errat*, *Verify3D*, *Prove*, *Whatcheck* e *Procheck*. As estruturas cristalográficas de Cdc11 e Sept2/Sept8 (usada na modelagem) também foram avaliadas, para finalidade de comparação. Em *Procheck*, **e** = erro, **w**= aviso e **p** = passou.

Modelo	Dope	Errat	Verify3D	Prove	Whatcheck	Procheck
5AR1	x	83.1395	82.79%	7.9%	39,41,42,43	5e,3w,1p
6UPR	x	95.3908	89.20%	2.7%	35,42,45,46	1e,5w,3p
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cdc11	-31572	67.803	79.50%	5.3%	1,2,33,40,42,43	0e,6w,3p
Cdc11	-31547	69.629	82.73%	6.4%	1,2,33,40,42,43	0e,6w,3p
Cdc11	-31436	72.180	80.22%	6.1%	1,2,33,40,42,43	2e,4w,3p
Cdc11	-31383	68.029	77.70%	6.0%	1,2,33,40,42,43	3e,3w,3p
Cdc11	-31372	74.444	80.22%	4.7%	1,2,33,40,42,43	2e,3w,4p
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cdc11/Cdc11 1	-65224	68.8696	81.46%	5.8%	35,42,44,45	2e,4w,3p
Cdc11/Cdc11 2	-65178	65.6897	76.87%	6.1%	35,42,44,45	3e,3w,3p
Cdc11/Cdc11 3	-65081	59.1379	72.45%	6.6%	35,42,44,45	2e,4w,3p
Cdc11/Cdc11 4	-65016	61.3793	80.44%	6.0%	35,42,44,45	2e,4w,3p
Cdc11/Cdc11 5	-64924	65.1724	76.36%	6.5%	35,42,44,45	3e,3w,3p
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cdc11/Cdc12 1	-65236	63.1295	83.89%	5.9%	35,42,44,45	3e,3w,3p
Cdc11/Cdc12 2	-65213	68.5817	85.31%	6.6%	35,42,44,45	3e,3w,3p
Cdc11/Cdc12 3	-65119	66.6062	86.19%	6.5%	35,42,44,45	2e,4w,3p
Cdc11/Cdc12 4	-65112	70.0361	80.35%	5.6%	35,42,44,45	2e,4w,3p
Cdc11/Cdc12 5	-65111	71.7668	84.60%	5.9%	35,42,44,45	2e,4w,3p

Fonte: Elaborada pelo autor

A comparação da estrutura relatada por BRAUSEMANN *et al*¹ (PDB 5AR1) e dos modelos produzidos mostra algumas diferenças importantes (Figura a). A sobreposição entre estrutura e modelo mostra algumas divergências sobre como a estrutura depositada difere

principalmente na região de um meandro (indicado com uma seta na Figura) e entre as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$. Essa região em particular é muito importante porque está compreendida dentro do *SUE*, sendo esta uma característica primordial que difere septinas de outras pequenas GTPases. A estrutura depositada não apenas mostra posições não usuais para resíduos nessa região como também não possui elementos muito conservados encontrados em outras estruturas de septinas. (supostamente por conta de desordem na estrutura cristalográfica). Uma vez que o *SUE* é um elemento estrutural característico das septinas, a sua falta de conservação estrutural era surpreendente e um dos motivos que estimulou o presente estudo.

Uma característica frequentemente encontrada em estruturas de septinas é um ângulo proeminente entre as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$, gerando uma estrutura do tipo “cotovelo” cuja consequência é expor os grupos carbonila no C-terminal da $\alpha 5$. . Trabalhos recentes mostram como estas carbonilas livres interagem com resíduos carregados que se encontram numa região polibásica das septinas ¹⁶ à jusante do domínio G, que formam uma hélice conhecida como $\alpha 0$. Por sua vez a estrutura depositada (PDB 5AR1) não apresenta este cotovelo, de modo que a hélice $\alpha 6$ é contínua em relação ao que deveria ser $\alpha 5$. A falta do cotovelo entre $\alpha 5$ e $\alpha 6$ (e portanto a ausência das carbonilas livres) elimina a possibilidade da interação com a região polibásica da hélice $\alpha 0$ da subunidade vizinha ao formar uma interface NC durante a polimerização. Novamente, a perda da possibilidade de formar esta interação é surpreendente uma vez que ajuda em estabilizar a interface NC.

Também corrobora com essa interpretação o modelo gerado recentemente pelo *AlphaFold2*, ferramenta que usa inteligência artificial ao buscar o correto enovelamento proteico com base na sequência de aminoácidos, disponibilizado durante o desenvolvimento do presente trabalho. A sobreposição dos modelos gerados pelo *Modeller* e pelo *AlphaFold2* aponta tanto a presença deste meandro (ausente na estrutura cristalográfica) como para esse ângulo entre $\alpha 5$ e $\alpha 6$, encontrados na região C-terminal (Figura .b). Essas informações são destacadas na Figura 51, onde a sobreposição da estrutura cristalográfica com os modelos obtidos pelo *Modeller* (Mod) e pelo *AlphaFold2* (AF) demonstra a discrepância dessas duas regiões. A similaridade entre os dois modelos, junto com a crescente confiança na comunidade científica nos resultados produzidos por *AlphaFold2*, são indicativos que provavelmente se aproximam melhor à estrutura verdadeira de Cdc11 do que a estrutura cristalográfica. Mesmo assim, confirmação experimental ainda é desejável.

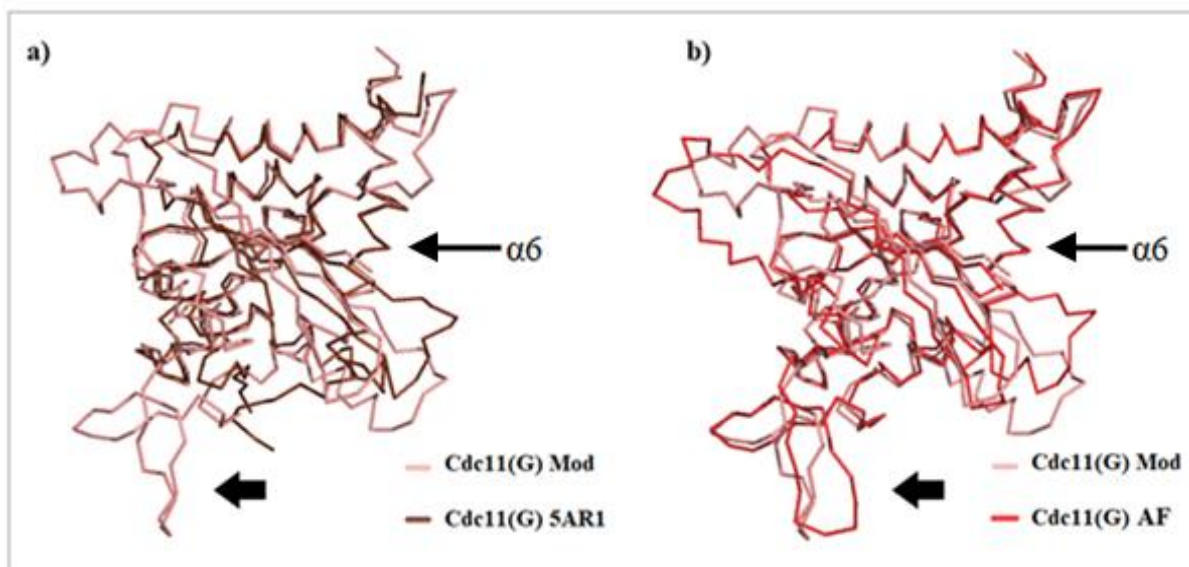


Figura 50 - a) Sobreposição dos $C\alpha$ da estrutura cristalográfica de Cdc11 com o modelo gerado pelo *Modeller* (Mod). Em b) pode ser vista a sobreposição dos $C\alpha$ desta vez entre os modelos gerados pelo *Modeller* e pelo *AlphaFold2*, que indicam consenso na região do meandro (setas).

Fonte: Elaborada pelo autor.

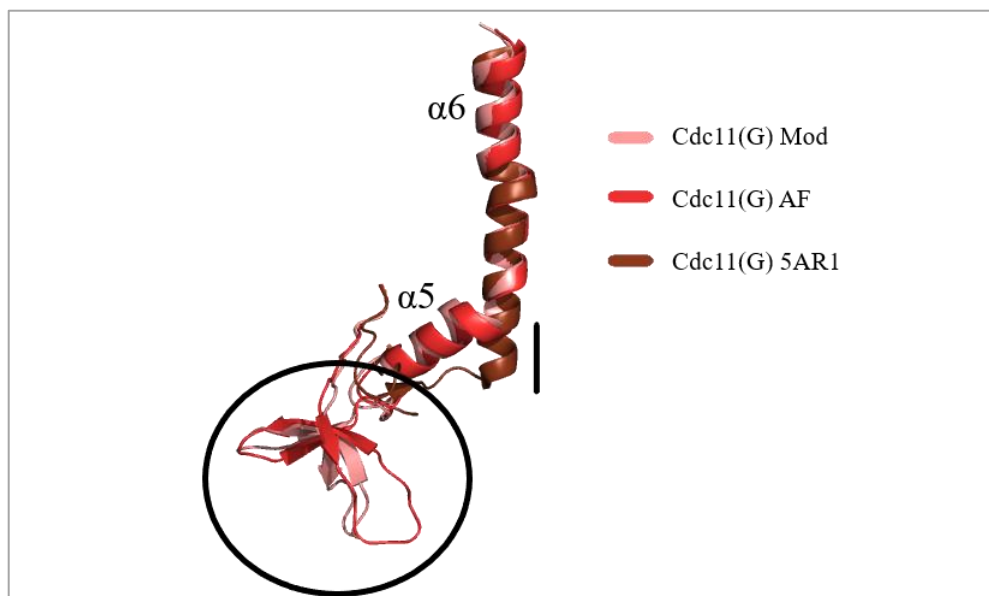


Figura 51 - Quando sobrepostos com a estrutura cristalográfica (Cdc11(G) – PDB 5AR1) os modelos produzidos por *Modeller* (Mod) e *AlphaFold2* (AF) indicam incongruências em relação à ausência de um meandro conservado na região *SUE* (círculo) e da extensão da hélice $\alpha 6$ (traço).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Também nota-se, ao comparar os dois modelos produzidos, como a hélice $\alpha 5'$ proposta pelo *AlphaFold2* está ligeiramente levantada em relação ao resultado oriundo do *Modeller* (Figura 52). Um trabalho recente discutiu como no grupo das septinas humanas Sept3 uma ligeira inclinação na hélice $\alpha 5'$ parece resultar em diferentes conformações em referência ao comprimento do filamento, que poderia estar mais compacto ou distendido ²⁵. Caso verdadeiro, Cdc11 poderia emular o comportamento descrito até o momento apenas para septinas que ocupam a posição central do octâmero humano (diferentemente de Cdc11, que ocupa a posição terminal), que culminaria em diferentes tamanhos para filamentos de septinas de levedura. No entanto, ainda são necessários estudos estruturais para verificar a plausibilidade desta hipótese.

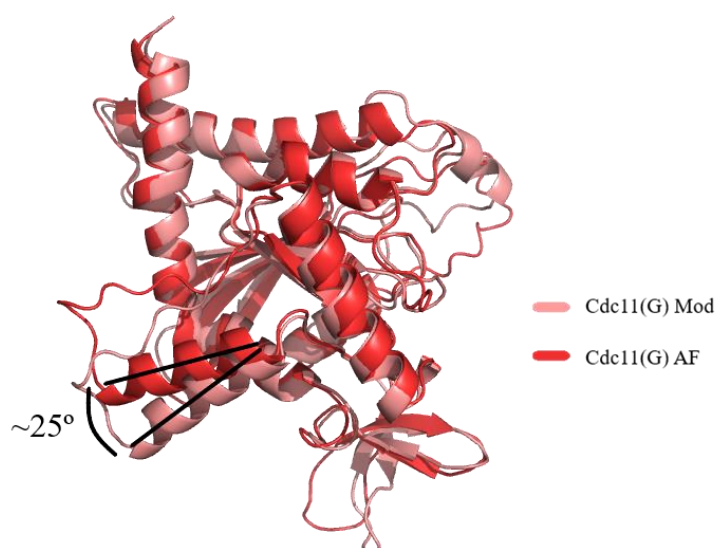


Figura 52 - Os modelos gerados sobrepõem-se em quase sua totalidade, com exceção da hélice $\alpha 5'$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quanto à modelagem dos dímeros, Cdc11 foi modelada a partir de Sept2 e Cdc12 a partir de Sept8, com base nas posições em que ocupam no octâmero ^{28,63}. No que se refere à interação de Cdc11 com a sua parceira pelo domínio GTPase, Cdc12, os modelos provenientes de modelagem por homologia ou *AlphaFold2* revelaram propriedades interessantes sobre esta interface. ROSA *et al.* ²³ num trabalho minucioso resolveu as estruturas cristalográficas de quatro dímeros de septinas humanas que fazem contato através da interface G. Em seguida, identificou os resíduos que se encontram entre os dímeros e que lhes confere a especificidade de interação. De maneira similar foi possível fazer a mesma

análise em relação aos modelos produzidos durante este estudo e identificar quais resíduos são característicos da interface G entre Cdc11 e Cdc12.

Em relação ao *backbone* é possível observar que a posição da cadeia principal é muito conservada entre as septinas humanas e de levedura, com poucas diferenças que, em sua maioria, se encontram em regiões flexíveis da cadeia polipeptídica (Figura 53). Os modelos produzidos pelo *AlphaFold2* para o dímero Cdc11(G)/Cdc12(G) também construíram a hélice $\alpha 5'$ numa orientação similar ao observado para o monômero de Cdc11(G). Interessantemente, o mesmo não ocorreu com a hélice $\alpha 5'$ de Cdc12(G) deste modelo dimérico, não sendo claro quais as imputações estruturais e fisiológicas proveniente de ambas as orientações, porém indicando que pode haver diferenças entre as duas septinas. Em CASTRO *et al*²⁵ mostrou-se que septinas possuem esta hélice orientada paralelamente ao eixo do filamento, o que culmina numa melhor acomodação da região polibásica presente na hélice $\alpha 0$ (anterior a fita $\beta 1$) no interior da interface NC sob determinadas condições. Talvez o mesmo possa ocorrer numa interface NC entre duas septinas Cdc11, embora os resíduos responsáveis pela orientação da $\alpha 5'$ em Sept3 (Pro237, Ile319 e Phe241, PDB 4Z54) não sejam conservados em Cdc11 e portanto a origem da reorientação da hélice parece ter uma base estrutural diferente.

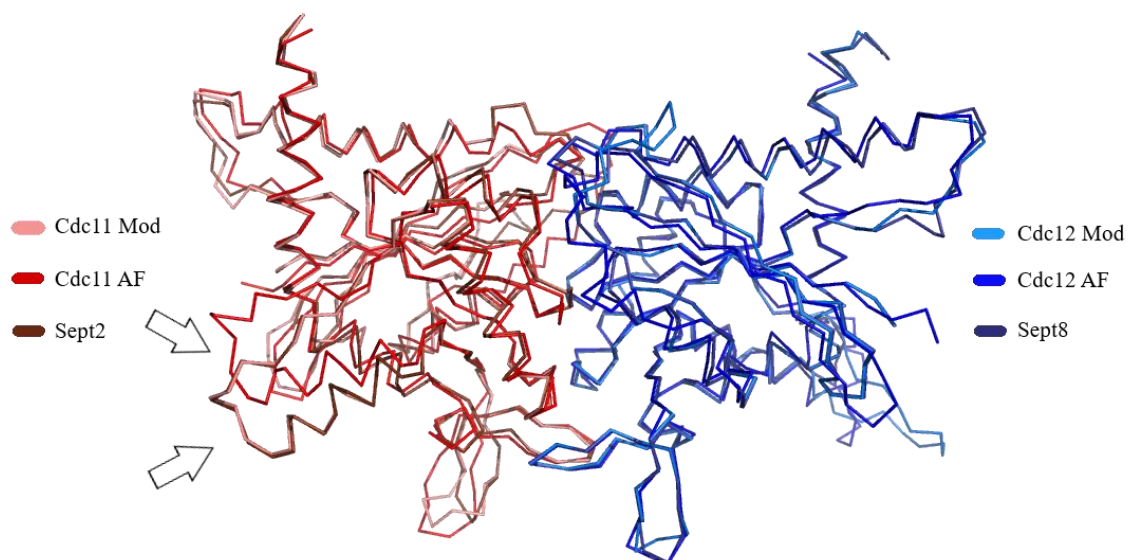


Figura 53 - A estrutura cristalográfica das septinas Sept2 e Sept8 sobreposta com dois modelos heterodiméricos (Cdc11(G)/Cdc12(G)) gerados a partir de diferentes metodologias (*Modeller* e *AlphaFold2*). As setas indicam a diferente orientação das hélices $\alpha 5'$. Esta orientação pode estar envolvida na melhor acomodação da interface NC entre dois monômeros de Cdc11.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Olhando para a outra face das septinas, existem resíduos capazes de formar pontes salinas entre as duas septinas na interface G. Os resíduos envolvidos nestas pontes salinas nem sempre são conservados entre septinas de diferentes espécies, particularmente quando presentes nas porções periféricas da interface. Entretanto, algumas destas pontes salinas são muito conservadas em diferentes septinas de organismos distintos. Um exemplo é entre uma arginina (Arg247 em Cdc11 e Arg263 em Cdc12) do meandro (compreendido na região SUE) e um ácido glutâmico (Glu180 em Cdc11 e Glu188 em Cdc12) da hélice $\alpha 4$. O grupo guanidino da arginina faz um contato do tipo “stacking” com a base do nucleotídeo e é uma característica de todas as interfaces G observadas em estruturas cristalográficas de septinas resolvidas até o momento. Uma arginina e um ácido glutâmico, por exemplo, são muito comuns entre a estrutura do meandro (compreendido na região *SUE* das septinas) e a hélice $\alpha 4$ dentro desta interface. Além do mais o carbono carboxila de um aminoácido apolar e a cadeia lateral básica de outro aminoácido (ambos encontrados no *loop* anterior à $\alpha 2$) frequentemente estão posicionados próximos um ao outro. A Figura 54 mostra como várias pontes salinas auxiliam na formação do dímero entre Cdc11 e Cdc12 e que estas são uma característica comum entre interfaces G. Por outro lado, a conservação dos resíduos envolvidos sugere que não devem ser responsáveis pela interação seletiva entre parceiras específicas durante a montagem de octâmeros e filamentos. Finalmente, a presença de pontes salinas na interface é coerente com cálculos teóricos que indicam a desestabilização da interface em função do aumento da força iônica.²⁸

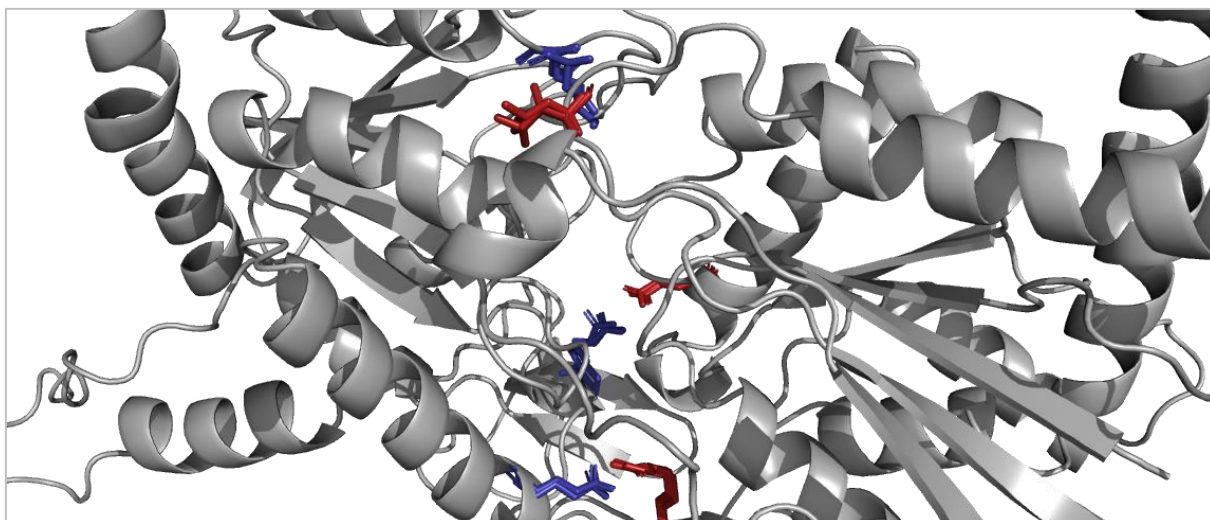


Figura 54 - O modelo gerado para o dímero Cdc11(G)/Cdc12(G) a partir do *Modeller* com destaque para a interface G e seus resíduos característicos. Os resíduos em vermelho e azul mostram, respectivamente, as orientações das cadeias laterais de Cdc11(G) e Cdc12(G) obtidas a partir do *Modeller*, *AlphaFold2* e da estrutura cristalográfica de Sept2/Sept8 (PDB 6UPR).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entretanto, as interações do tipo ponte salina parecem não ser as únicas responsáveis pela associação dos dímeros na interface G. Embora a presença destas pontes conservadas demonstre a importância dessas interações para a formação do dímero entre Cdc11 e Cdc12 via uma interface G, as análises dos aminoácidos presentes nesta interface e sobre a eletrostática das moléculas envolvidas indicam que outros atores desempenham um papel relevante entre essas duas septinas. Os modelos produzidos mostram uma interface G com carga próxima da neutralidade, com alguns poucos resíduos carregados no seu interior (Figura 55). Interações hidrofóbicas não são interações de fato, mas o resultado final de um estado de maior entropia, onde os resíduos proteicos se escondem do entorno aquoso enterrando-se no interior da biomolécula. Deste modo, observa-se que esta interface possui muitos resíduos apolares em seu interior, o que culmina na compactação na região de interação entre essas duas septinas. Em suma a interface apresenta uma diversidade de interações como é comum em interfaces proteína-proteína.

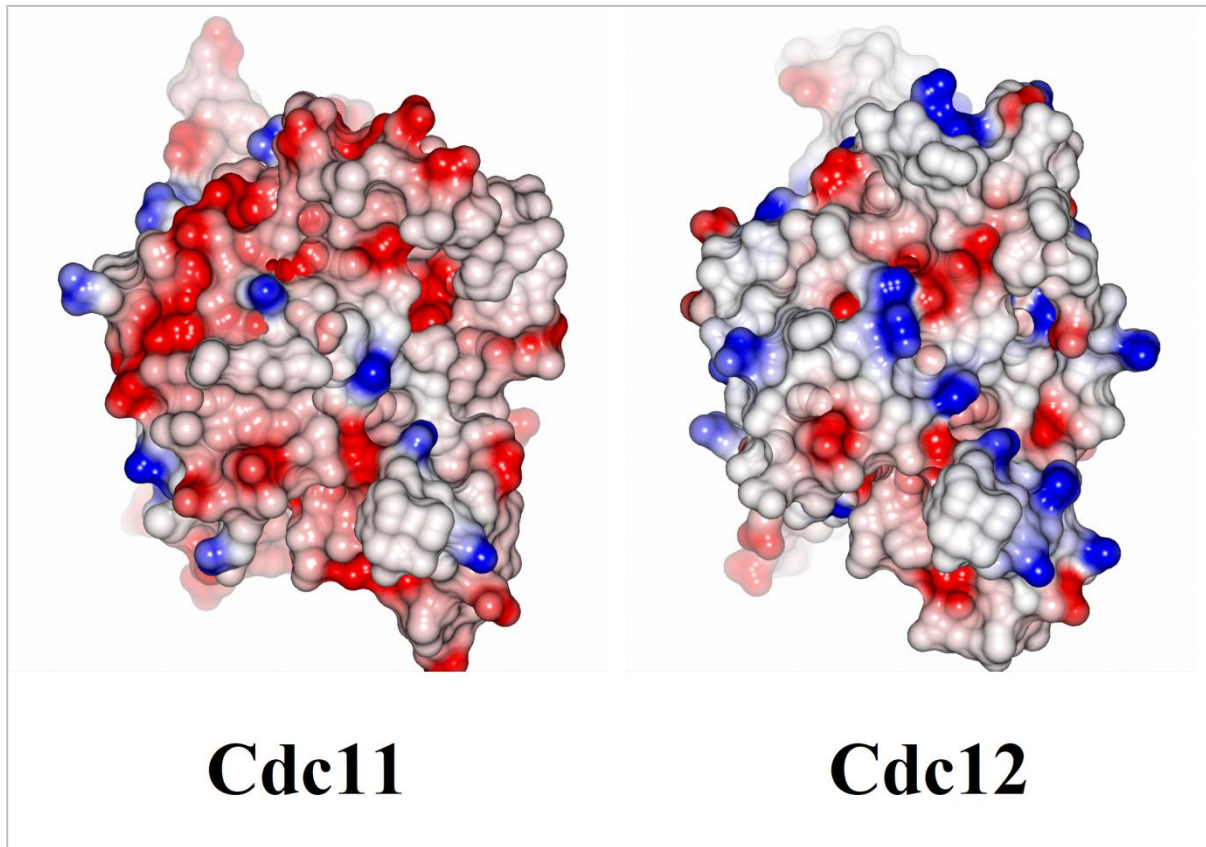


Figura 55 - Caracterização eletrostática da interface G entre as septinas Cdc11 e Cdc12. Na imagem, as duas faces da molécula que interagem estão voltadas para o leitor. Nota-se uma vasta área em cinza, especialmente em Cdc12, que denota a predominância de uma região hidrofóbica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Interessantemente, diferente das pontes salinas há pouco descritas, alinhamentos entre septinas de humanos e leveduras referentes à região que compreende a interface G mostra que esta porção não aparenta ser muito conservada. Ou seja, parecem ter ocorrido várias mutações neutras ao longo da história evolutiva de septinas, desde que preservadas as características eletrostáticas do interior da interface.

Deste modo, mesmo que a interface G possua diferentes resíduos em determinadas posições dependendo do organismo estudado, observa-se que as características relacionadas à carga frequentemente são similares. Isto pode ser observado ao analisar a característica das cargas que apontam para a interface G de septinas de diferentes organismos. Na Figura 56 são mostradas as interfaces G dos modelos produzidos neste trabalho e da estrutura da Sept2 e Sept8 (usada como molde na modelagem por homologia). A similaridade na distribuição de cargas está evidente. Por exemplo, na figura observa-se uma cadeia de cargas positivas na

diagonal (superior esquerda para inferior direita, indicado pela linha tracejada) com cargas negativas ao redor, em posições características.

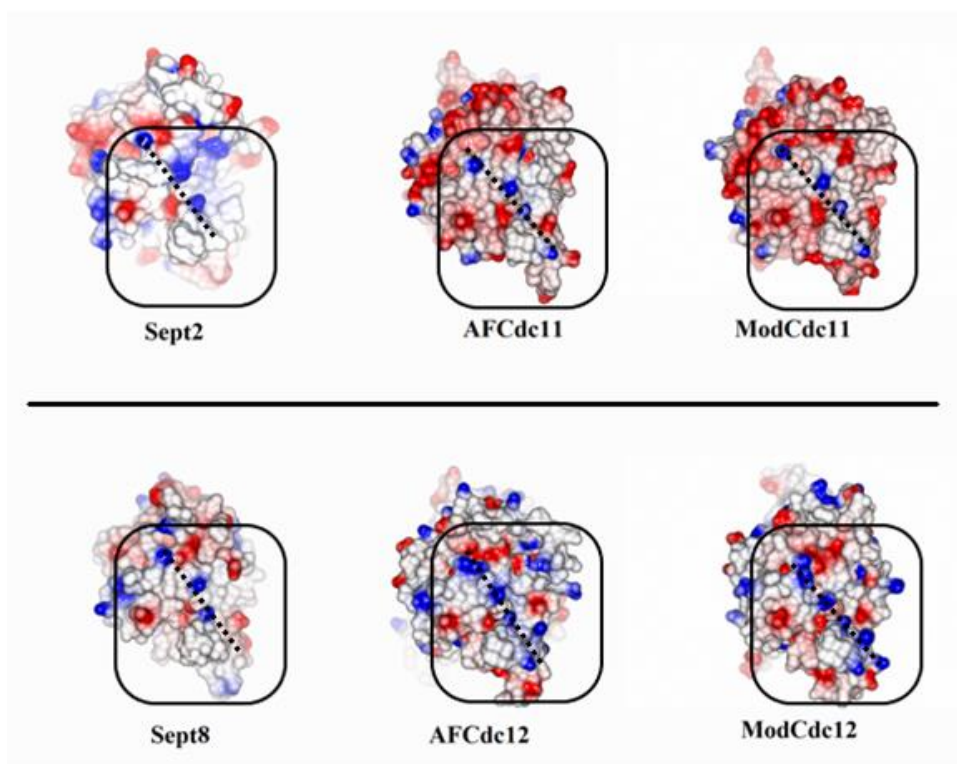


Figura 56 - Perfil eletrostático dos aminoácidos enterrados na interface G entre Sept2/Sept8 e Cdc11/Cdc12 (*Modeller* e *AlphaFold2*) Em detalhe a similaridade do padrão de cargas entre estas, com a linha tracejada indicando uma diagonal de cargas positivas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro fato interessante é de como alguns aminoácidos envolvidos no interior da interface G podem representar seletividade entre diferentes parceiros. ROSA *et al.*²³ discute como uma alanina presente em Sept2 (Ala71) tem o tamanho exato para poder se encaixar com a septina parceira (um membro do subgrupo da SEPT6). Em outros subgrupos esta alanina está ausente, ocupando a sua posição um aminoácido com cadeia lateral maior. Neste caso, a tentativa de formar um dímero com uma septina de outro subgrupo resultaria num impedimento estérico, enfraquecendo a interface de contato. Uma situação análoga acontece com His73 do membro do grupo SEPT6, cuja cadeia lateral se encaixa num bolsão específico de Sept2. ROSA *et al.*²³ propõe que são interações específicas deste tipo que favorecem a

formação das interfaces G corretas e desfavorecem o aparecimento de pareamentos errados, assim guiando a montagem da sequência correta de septinas ao longo do oligômero.

Tanto Ala71 quanto His73 pertencem à região conhecida como *Switch I*. Portanto seria interessante averiguar nos modelos do complexo entre Cdc11 e Cdc12 se era possível identificar, na região do *Switch I*, evidências para interações específicas capazes de garantir a formação da interface G entre elas, de forma análoga ao observado no caso das septinas humanas. Cdc12 possui uma histidina homologa a His73, sugerindo que este resíduo pudesse ter um papel em embutir especificidade na interação. Porém, os resíduos específicos que compõem o bolsão complementar não são conservados em Cdc11 e a cadeia lateral da histidina não está orientada para a interface nos modelos gerados por *AlphaFold2*, indicando que não devem cumprir o mesmo papel em septinas de levedura. Por outro lado, os modelos mais confiáveis produzidos por *AlphaFold2* sistematicamente geram uma interação entre a Arg68 do *Switch I* da Cdc12 e um par de resíduos ácidos (Glu190 e Asp191) da hélice $\alpha 4$ da Cdc11 (Figura 57). Essa interação é vista em quatro dos cinco modelos produzidos por *AlphaFold2*, cujos parâmetros de validação e confiabilidade do modelo também são mostrados na Figura 57 (inferior). Examinando as sequências das demais septinas de levedura (Figura 9) nota-se que somente Cdc12 possui a arginina nesta posição, enquanto somente Cdc11 possui os dois resíduos ácidos característicos em sequência. Assim, a interação observada na figura a seguir só poderia existir quando a interface G é formada entre Cdc11 e Cdc12. Além do mais, esses três resíduos estão presentes nas mesmas posições nas proteínas Cdc11 e Cdc12 de outras espécies de fungos (não mostrado), o que parece indicar que esta interação, conservada em seres vivos aparentados, pode culminar em seletividade entre essas duas septinas. Portanto, potencialmente estas interações eletrostáticas poderiam ser determinantes em garantir o pareamento correto entre Cdc11 e Cdc12 durante a montagem do octâmero, cumprindo um papel semelhante ao descrito por His73 (grupo SEPT6) e Ala71 (grupo SEPT2) em septinas humanas.²³

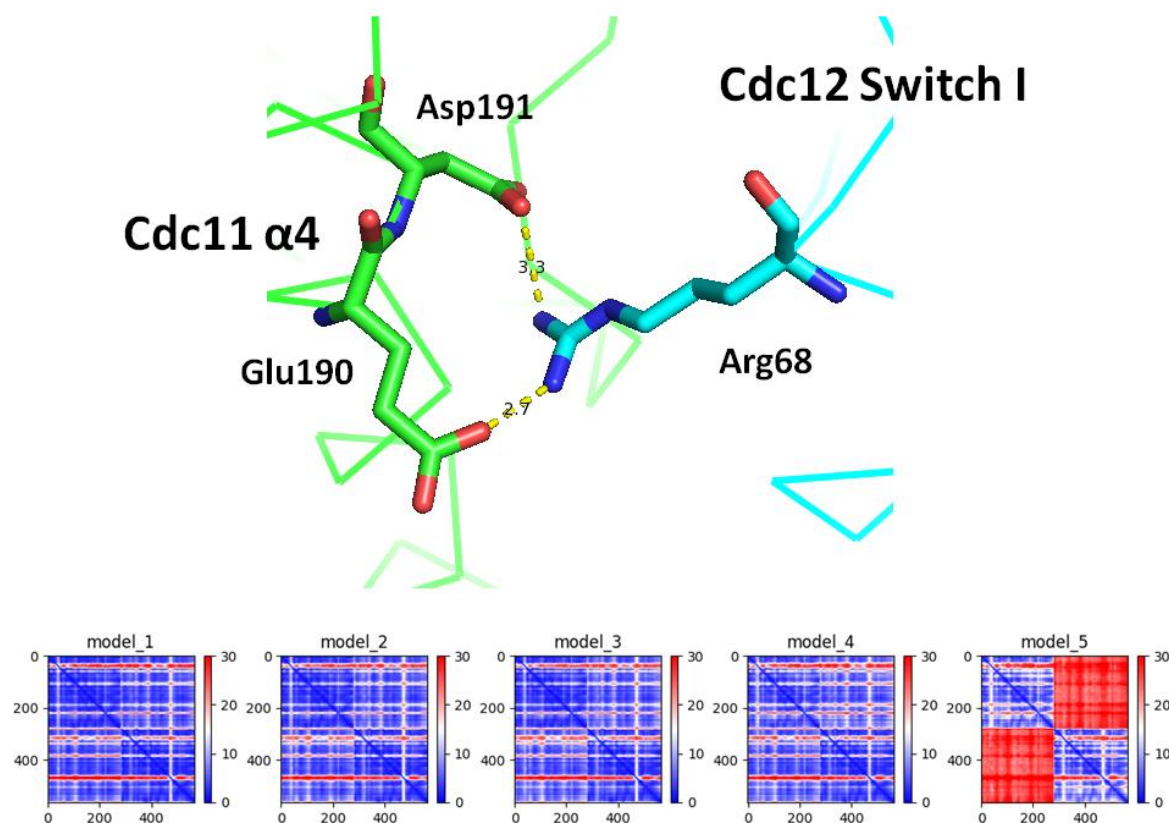


Figura 57 - Dois aminoácidos ácidos (Glu190 e Asp191) presentes na hélice $\alpha 4$ de Cdc11 interagem com a Arg68 do *Switch I* de Cdc12 na maioria dos modelos gerados por *AlphaFold2*. Uma vez que apenas Cdc11 possui esses resíduos nessa posição, eles podem ser um indicador da seletividade da interação com Cdc12. Na porção inferior da figura é mostrado o Predicted Align Error (PAE) dos cinco modelos produzidos. Resumidamente, esse gráfico indica a confiabilidade de um modelo ao comparar o erro esperado em dada posição para cada resíduo predito, sendo que quanto mais azul, mais confiável é o modelo gerado para determinada posição. Conseqüentemente, quanto mais vermelho pior é a predição de um resíduo em determinada posição da molécula.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando a região do *Switch I* em Cdc11 não se observa com facilidade nenhuma interação específica que poderia ser responsável para embutir seletividade na interface. A Ala71 de Sept2 humana, por exemplo, não tem equivalência em Cdc11. Na verdade, os modelos gerados por *AlphaFold2* nesta região variam entre si, sugerindo incerteza nas posições atômicas geradas. Portanto, até o momento, os modelos não foram capazes de gerar uma hipótese concreta em relação à relevância o *Switch I* de Cdc11 na formação da interface G. Porém, deve ser lembrado que não é necessário o envolvimento dos dois *switches I* para garantir seletividade. Em princípio, a interação eletrostática envolvendo a *switch I* da Cdc12 descrita acima poderia ser suficiente.

Durante este projeto tentou-se a co-expressão de quimeras de septinas humanas e de levedura via interface G. A transformação foi bem sucedida para as colônias de Sept2/Cdc12 e Cdc11/Sept6, assim como a expressão de ambas. Entretanto, durante a purificação por *IMAC*, elas não interagiram entre si e foram eluídas separadamente, em frações diferentes (resultado omitido). Assim, embora os modelos indiquem a existência de um padrão de carga entre as interfaces estabelecida, os diferentes aminoácidos enterrados na região de interação garantem seletividade em relação à septina parceira.

É interessante notar que Sept2 possui dois aminoácidos ácidos na hélice $\alpha 4$ equivalentes a Glu190 e Asp191 em Cdc11, que poderiam potencialmente interagir com a Arg68 de Cdc12. Porém, as posições do Glu e do Asp são trocadas, o que pode ser crítico para a formação das ligações de hidrogênio. Certamente, há ainda muito para aprender sobre a natureza da interface G entre Cdc11 e Cdc12. No entanto, o presente estudo levanta uma hipótese concreta que pode ser testada experimentalmente por via de mutação sítio dirigida da Arg68 de Cdc12 e/ou Glu190/Asp191 de Cdc11 e, em seguida, estudos da estabilidade do heterodímero.

4.2.5.2 Cdc11 e sua interação via interface NC

Do lado oposto a interface G, pela outra interface de interação (NC), Cdc11 pode interagir com outra cópia de Cdc11, aumentando o tamanho dos filamentos de septinas. Dessa forma, um octâmero pode ser incorporado ao filamento crescente (Figura 18) e apto a realizar suas funções.

Entretanto informações sobre essa interface são escassas na literatura. A maioria dos projetos relacionados às estruturas de septinas opta por remover uma parte da região N e também C-terminal uma vez que estes contêm porções desestruturadas⁹. Além do mais, a remoção destes aminoácidos auxilia no processo de purificação das septinas recombinantes, aumentando a chance de conseguir amostras melhores e mais ordenadas para a técnica de cristalografia de raios-x.

Até recentemente havia apenas uma estrutura depositada de septinas cujas proteínas não eram truncadas, ou seja, possuindo ambos os domínios N e C-terminal,⁹ esta correspondente ao complexo hexamérico das septinas humanas Sept2, Sept6 e Sept7. Porém, a estrutura por possuir baixa resolução (4Å) continha pouca informação confiável referente à

interface NC. Valendo-se da rápida evolução recente da técnica de criomicroscopia eletrônica, MENDONÇA *et al.* ¹⁶ conseguiu elucidar a estrutura do hexâmero humano formado pelas septinas Sept2, Sept6 e Sept7, descrevendo com detalhes pela primeira vez a interface NC entre Sept6 e Sept7. Nesta é possível observar que em especial duas porções da interface contribuem para a interação. A primeira são interações entre resíduos ácidos e básicos entre a região terminal da hélice α_6 e um *loop* após α_2 . Já a segunda envolve uma série de interações hidrofóbicas e de pontes salinas entre as duas hélices α_0 , que também interagem com *loops* entre as hélices α_5 e α_6 e entre as fitas β_2 e β_3 , formando um *domain swapping* (Figura .a).

O modelo gerado pelo *Modeller* para o homodímero Cdc11-Cdc11 mostra exatamente essas mesmas interações, mostrando principalmente como esses resíduos carregados são conservados nos mais diferentes grupos na região terminal da hélice α_6 (Figura .b). No modelo, a região polibásica da hélice α_0 , que faz parte da segunda região de interação, faz interações através da interface, como esperado. Em Cdc11 há um resíduo básico a mais (Arg12) quando comparado com Sept7 humana. A cadeia lateral da arginina aponta para a cavidade central da interface (Figura 58). Também é observado que a Arg14 está orientada no modelo em direção às carbonilas livres do C-terminal da α_5 , como visto na interface NC entre Sept7 e Sept6. Porém, no modelo, as distâncias são muito longas para a formação de ligações de hidrogênio. Isso pode ser o resultado das imperfeições na modelagem por homologia, e portanto a determinação de uma estrutura cristalográfica continua imperativa.

Em geral, a conservação das pontes salinas entre duas interfaces NC sugere que é uma condição basal na história evolutiva de septinas.

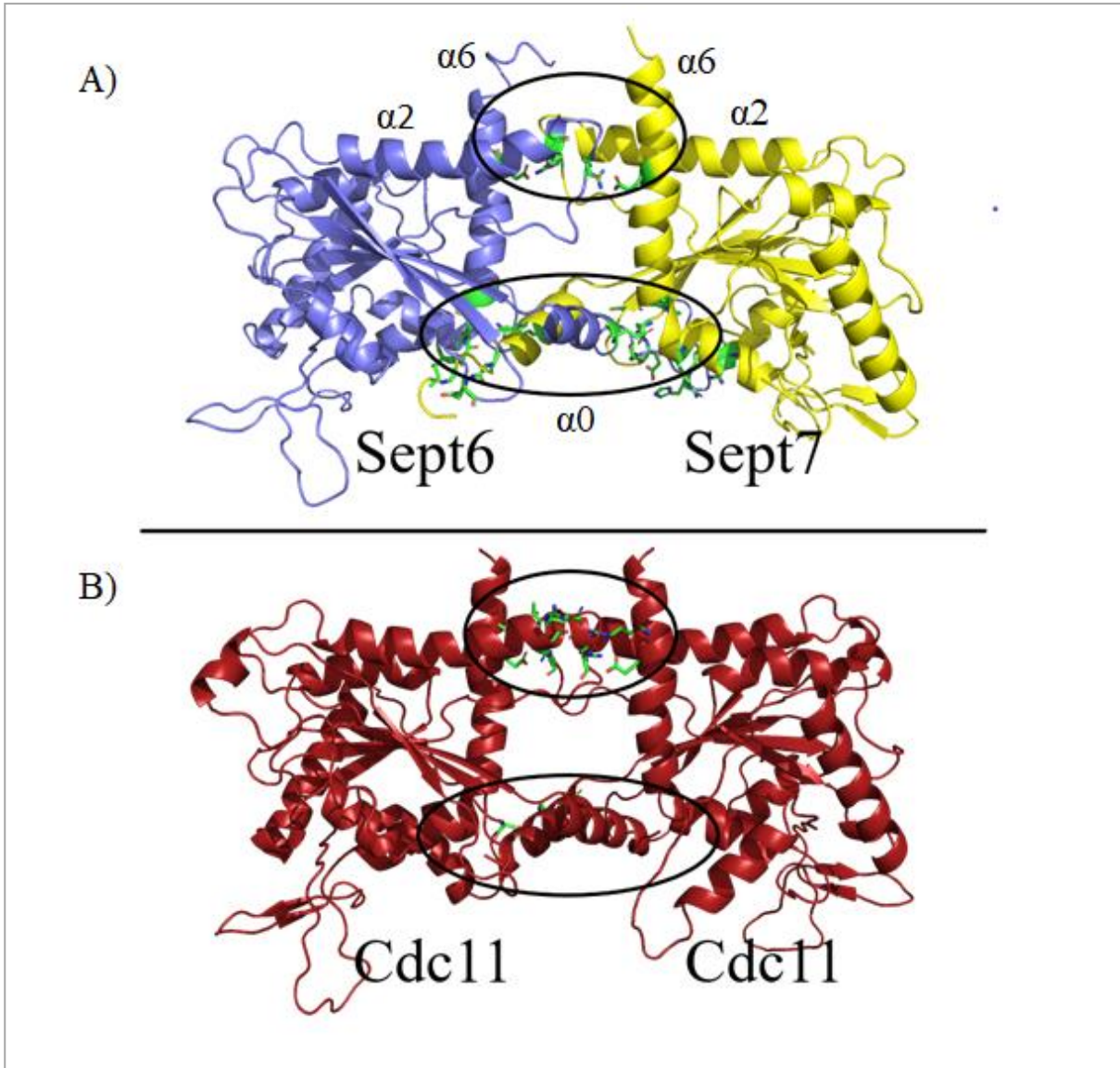


Figura 58 - A interface NC de septinas 6 e 7 (A) mostra como as interações se dão basicamente em duas partes da estrutura proteica. Uma que se localiza na porção distal da hélice $\alpha 6$ e outra próxima ao seu início, na hélice $\alpha 0$. O modelo do complexo Cdc11(G)/Cdc11(G) produzido por homologia (B) mostra essas mesmas interações, indicando como os mesmos resíduos são conservados na posição necessária para a formação do dímero.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além dos resíduos característicos da interface NC, é notória a presença de uma cavidade entre os dois monômeros, seja entre Sept6 e Sept7 ou entre Cdc11 e Cdc11. MENDONÇA *et al.*¹⁶ discute como essa cavidade pode permitir algum grau de movimentação ao filamento. Por exemplo, a cavidade seria necessária para permitir a abertura e fechamento da interface NC como foi visto em septinas humanas do subgrupo SEPT3.²⁵ No modelo de

representação de superfícies carregadas essa cavidade pode ser notada devido a pequenas “janelas” laterais (Figura 59).

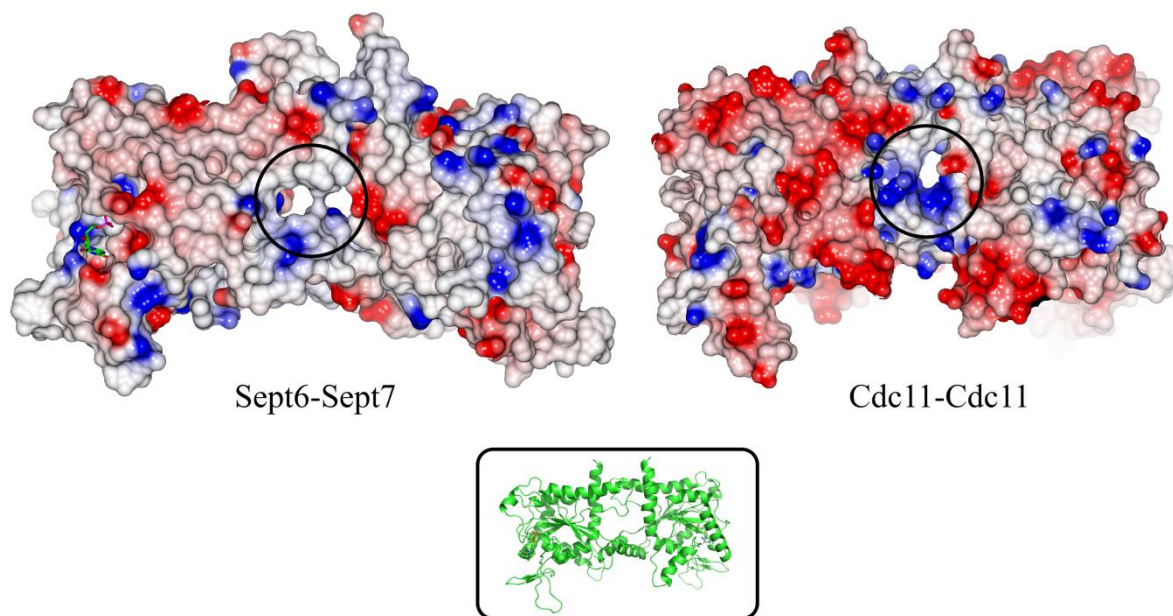


Figura 59 - Representação das superfícies dos dímeros Sept6/Sept7 9 (à esquerda) e Cdc11/Cdc11 (à direita) via uma interface NC. As cargas positivas estão representadas em azul e as negativas em vermelho. Os círculos ao centro indicam as janelas que possibilitam enxergar dentro da cavidade, de onde é possível observar um lúmen. Na porção inferior está um modelo do tipo *cartoon* de um dímero de Cdc11 mostrando a orientação das moléculas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Interessantemente, quando são analisadas as cargas expostas na interface entre os dois tipos de monômeros, nota-se que, diferente do que foi observado entre o dímero via interface G que apresentava similaridade no padrão eletrostático, os dois dímeros via interface NC divergem em suas características (Figura 60).

Ao comparar os resíduos expostos na interface NC entre Sept6 e Sept7 com os do dímero de Cdc11, este último apresenta uma interface muito carregada, principalmente de cargas positivas em seu centro, com cargas negativas nas porções periféricas. Já o dímero humano possui um padrão com menos cargas, com resíduos hidrofóbicos apontando para a interface NC. Desse modo, as cavidades encontradas em ambos os dímeros tem características eletrostáticas diferentes, com uma densidade de cargas positivas apontando para o interior da cavidade que é mais marcante no caso do homodímero via interface NC de Cdc11.

MENDONÇA *et al.*¹⁶ propôs um modelo para um filamento deitado sobre uma membrana biológica. Neste modelo as janelas que dão acesso à cavidade apontam para a superfície da membrana. Assim, é possível imaginar lipídios negativamente carregados sendo atraídos para dentro da cavidade pelo potencial positivo no seu interior. Porém, tal possibilidade é meramente especulativa.

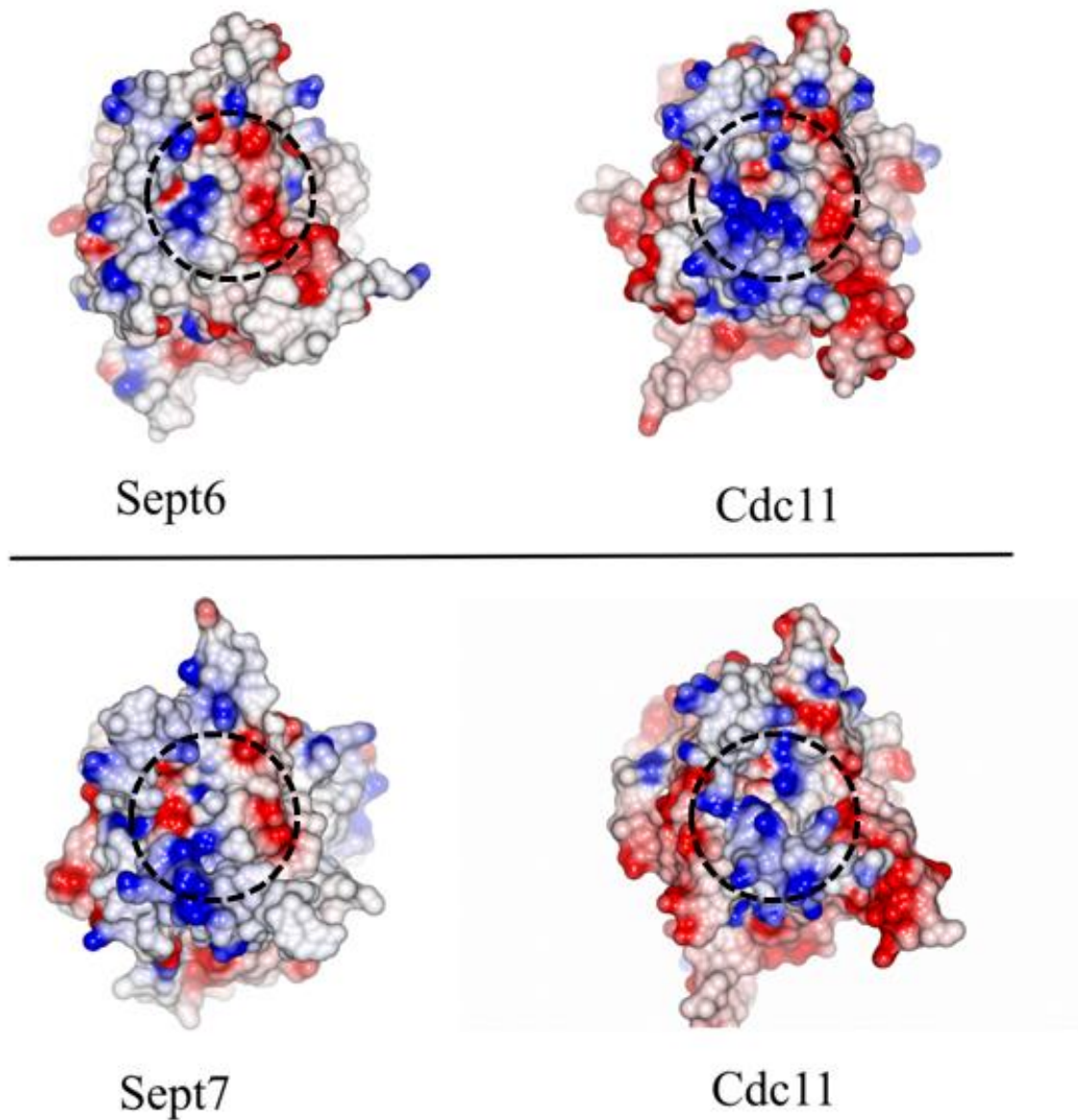


Figura 60 - Os resíduos encontrados na interface NC entre as septinas humanas Sept6 e Sept7 (à esquerda) e as septinas de levedura Cdc11 (à direita) diferem quanto à distribuição de cargas. Na vista apresentada, os monômeros foram rotacionados de tal forma que a interface NC está apontando para o leitor. Em destaque, os círculos tracejados indicam o local da cavidade entre as duas interfaces.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A cavidade encontrada nos modelos para o dímero Cdc11-Cdc11 é menor do que a cavidade presente nas septinas humanas ¹⁶, possuindo um volume de 2352.25 Å³ e área superficial de 1256.53 Å² (Figura 61). Entretanto, o atributo mais notório desta se deve a preponderância de cargas positivas em seu interior.

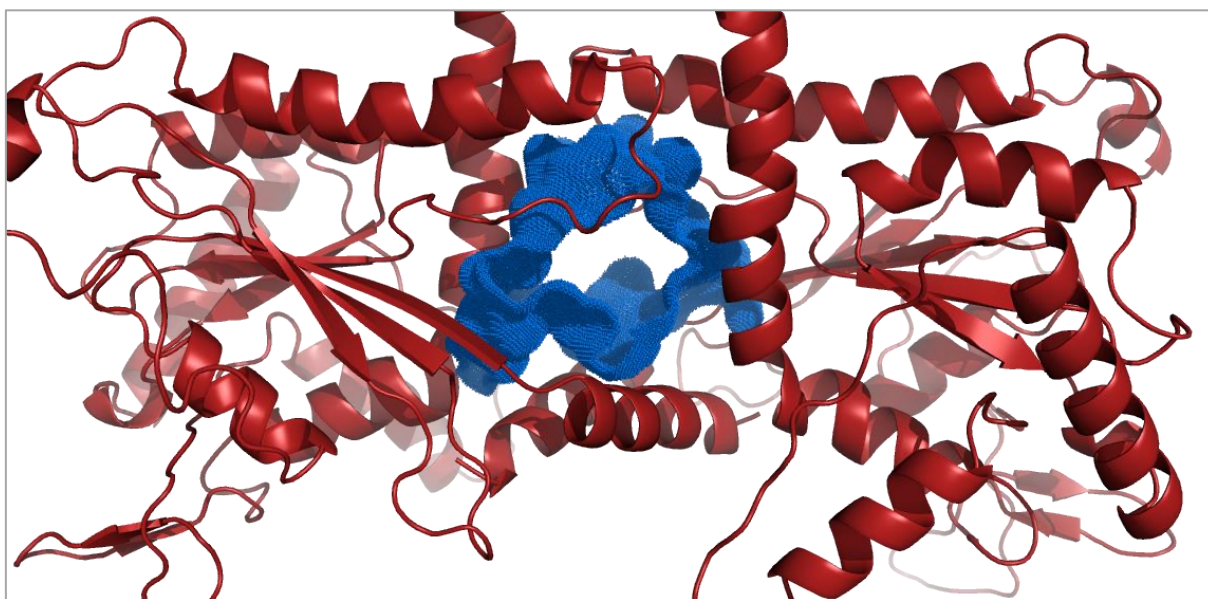


Figura 61 - Modelo de dímero entre duas septinas de levedura (Cdc11) via interface NC. A região ao centro forma uma cavidade básica, mostrada em azul.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As septinas podem formar longos filamentos apolares a partir de octâmeros que se polimerizam de ponta a ponta, tanto em humanos quanto em leveduras. Diversas interfaces G e NC se intercalam até que o octâmero, o protofilamento inicial, esteja completo. Porém é importante ressaltar que cada interface é única, o que garante a especificidade na escolha da septina parceira.

As interfaces NC de Cdc11 e entre Sept6 e Sept7 se encontram em posições diferentes ao longo do filamento ^{17,28} e isso tem consequências em sua montagem. A primeira ocorre entre dois octâmeros enquanto a segunda está mais interiorizada, entre o segundo e o terceiro monômero (também entre o sexto e o sétimo). O padrão de carga mais neutro nesta interface NC humana podem ajudar em garantir maior estabilidade uma vez que as proteínas se

encontram no ambiente aquoso do citosol, fazendo com que essa interação seja mantida por meio de interações hidrofóbicas dentro de um ambiente hidrofílico.

Já o caso da interface homodimérica Cdc11-Cdc11 parece explicar o porquê de ser possível obter octâmeros onde Cdc11 está na ponta deste ¹⁷ lembrando que tais octâmeros são gerados a partir de filamentos em condições de alta força iônica. As interações iônicas formadas pelos grupos carregados na interface são enfraquecidas em condições de alta força iônica ²⁸. Assim, a maior fragilidade desta interface em relação às outras, tende a manter este arranjo, um octâmero, como a unidade básica da polimerização de um filamento. Ademais esta interface carregada e exposta diretamente ao solvente poderia auxiliar na solubilidade do protofilamento além de, talvez, poder interagir com as cargas negativas na membrana, mantendo o octâmero no sítio de interação onde este poderia, aleatoriamente, encontrar outro octâmero ou a ponta de um filamento maior em formação. É sabido que a formação de filamentos em levedura é facilitada pela presença da membrana. ⁶⁴

5 CONCLUSÃO

Este trabalho caracterizou os perfis de solubilidade do domínio GTPase das septinas de levedura Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 expressas de maneira recombinante sozinhas ou com a septina parceira por meio de uma interface G. Observou-se que Cdc11(G) e Cdc3(G) quando expressas sem a septina parceira são monômeros em solução e não estão ligadas a nucleotídeos. Em contrapartida tanto Cdc12(G) e Cdc10(G) tendem a precipitação quando expressas sozinhas, só podendo ser purificadas de maneira satisfatória quando na presença da septina parceira, onde formam um heterodímero, este sim com a presença dos nucleotídeos GDP e GTP.

O projeto também buscou a elucidação das estruturas cristalográficas destas proteínas, porém sem sucesso na difração dos cristais. Em vista disso, diversos modelos foram produzidos durante este estudo uma vez que a estrutura cristalográfica depositada de Cdc11 parece ter uma série de incongruências, em especial na interpretação da hélice α_6 e na construção da região *SUE*. Estes modelos indicaram como parece haver em Cdc11 um padrão de cargas na interface G que não se repete na sua interface NC (que também apresenta uma cavidade básica em seu interior), indicando que uma destas interfaces pode ser mais frágil do que a outra e sugerindo o porquê de a unidade básica do filamento ser octâmeros em que extremidades possuem duas cópias de Cdc11. Os modelos gerados por *AlphaFold2* também indicam uma interação entre a Arg68 do *Switch I* em Cdc12 e dois resíduos ácidos (Glu190 e Asp191) da hélice α_4 de Cdc11 que poderia explicar a seletividade em relação à septina parceira, ou seja, porque Cdc11 e Cdc12 interagem entre si e não com Cdc3 ou Cdc10 durante a montagem do filamento.

Em vista da maior confiabilidade dos modelos gerados por *Modeller* e *AlphaFold2* durante este projeto e dos parâmetros de validação ruins apresentados pela estrutura cristalográfica de Cdc11, pode-se inferir que os modelos são mais precisos e por isso devem ser preferíveis para estudos posteriores no que se refere a estudos estruturais de septinas de levedura.

Como outras perspectivas futuras seria interessante modelar o dímero Cdc3 e Cdc10 na busca de interações específicas que possam explicar a seletividade na formação deste complexo para o fim de comparação com a interface G entre Cdc11 e Cdc12. Mutações sítio dirigidas na Arg68 de Cdc12 e/ou nas Glu190 e Asp191 poderiam responder em parte dúvidas sobre a seletividade desta interface G entre as septinas parceiras envolvidas. Além do mais, insistir na obtenção da estrutura de cada septina de levedura por meio de Cryo-EM, um campo

em contínua evolução, seria muito interessante para poder entender as interações que ocorrem dentro de cada interface do octâmero, podendo assim confirmar a discussão gerada através dos modelos produzidos durante este trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 BRAUSEMANN, A. *et al.* Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Structural Biology**, v. 193, n. 3, p. 157–161, 2016.
- 2 VALADARES, N. F. *et al.* Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481–500, 2017.
- 3 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 69, n. 2, p. 265–276, 1971.
- 4 SANDERS, S. L.; FIELD, C. M. Cell division: septins in common? **Current Biology**, v. 4, n. 10, p. 907–910, 1994.
- 5 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 66, n. 2, p. 352–359, 1970.
- 6 MALUMBRES, M. *et al.* Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1275–1276, 2010.
- 7 ZHANG, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458–1467, 1999.
- 8 VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701–715, 2004.
- 9 SIRAJUDDIN, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311–315, 2007.
- 10 LEONARDO, D. A. *et al.* Orientational ambiguity in septin coiled coils and its structural basis. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 9, p. 1–19, 2021.
- 11 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; THAI, L. SI: Phosphatidylinositol-4, 5- bis phosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 404, n. 4, p. 711–731, 2010.
- 12 GARCIA, G. *et al.* Assembly, molecular organization, and membrane-binding properties of development-specific septins. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 5, p. 515–529, 2016.
- 13 SIRAJUDDIN, M. *et al.* GTP-induced conformational changes in septins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009.
- 14 FARKASOVSKY, M. *et al.* Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 643–656, 2005.
- 15 VRABIOIU, A. M. *et al.* The Majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes

do not exchange guanine nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 3111–3118, 2004.

16 MENDONÇA, D. C. *et al.* An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 15, p.1–16 2021.

17 BERTIN, A. *et al.* Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8274–8279, 2008.

18 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, p. 1–17, 2007.

19 CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2762–2777, 2003.

20 SPILLOTIS, E. T. Spatial effects - site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 1, p. 1–10, 2018.

21 WEEMS, A.; MCMURRAY, M. The step-wise pathway of septin heterooctamer assembly in budding yeast. **eLife**, v. 6, p. 1-25, 2017. DOI: 10.7554/eLife.23689.

22 WALKER, J. E. *et al.* Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO Journal**, v. 1, n. 8, p. 945–951, 1982.

23 ROSA, H. V. D. *et al.* Molecular Recognition at Septin Interfaces: The Switches Hold the Key. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 21, p. 5784–5801, 2020.

24 JOHNSON, C. R. *et al.* Guanidine hydrochloride reactivates an ancient septin heterooligomer assembly pathway in budding yeast. **eLife**, v. 9, p. 1–31, 2020. DOI: 10.7554/eLife.54355

25 CASTRO, D. K. S. V. *et al.* A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. **International Union of Crystallography Journal**, v. 7, p. 462–479, 2020. DOI: 10.1107/S2052252520002973

26 SALA, F. A. *et al.* Heterotypic coiled-coil formation is essential for the correct assembly of the septin heterofilament. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 12, p. 2608–2619, 2016.

27 BROGNARA, G. *et al.* Revisiting SEPT7 and the slippage of β -strands in the septin family. **Journal of Structural Biology**, v. 207, n. 1, p. 67–73, 2019.

28 MENDONÇA, D. C. *et al.* A revised order of subunits in mammalian septin complexes. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 9–10, p. 457–466, 2019.

29 WOODS, B. L.; GLADFELTER, A. S. The state of the septin cytoskeleton from assembly

to function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 68, p. 105–112, 2021.

30 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001. DOI: 10.1016/j.ceb.2020.10.007.

31 TAKIZAWA, P. A. *et al.* Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. **Science**, v. 290, n. 5490, p. 341–344, 2000.

32 HOROWITZ, A. *et al.* The human septin7 and the yeast CDC10 septin prevent Bax and copper mediated cell death in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta: molecular cell research**, v. 1833, n. 12, p. 3186–3194, 2013.

33 TANG, C. S. L.; REED, S. I. Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. **Cell Cycle**, v. 1, n. 1, p. 42–49, 2002.

34 CANNON, K. S. *et al.* An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 4, p. 1128–1137, 2019.

35 TADA, T. *et al.* Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1752–1758, 2007.

36 TOURE, A. *et al.* Septins at the annulus of mammalian sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 392, p. 799–803, 2011. DOI: 10.1515/BC.2011.074.

37 FLIEGAUF, M.; KAHLE, A.; ZIEGER, B. Distinct localization of septin proteins to ciliary sub-compartments in airway epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 151–156, 2014.

38 MONTAGNA, C.; BEJERANO-SAGIE, M.; ZECHMEISTER, J. R. Mammalian septins in health and disease. **Research and Reports in Biochemistry**, v.5, p. 59–72, 2015. DOI: 10.2147/RRBC.S59060.

39 CHASTANET, A.; SPILOTIS, E. T.; MOSTOWY, S. Septins recognize and entrap dividing bacterial cells for delivery to lysosomes. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 6 p. 866–874, 2018.

40 DULAL, N. *et al.* Dynamic assembly of a higher-order septin structure during appressorium morphogenesis by the rice blast fungus. **Fungal Genetics and Biology**, v. 140, p. 1–4, 2020. DOI: 10.1016/j.fgb.2020.103385.

41 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012.

42 PINTO, A. P. A. *et al.* Filaments and fingers : novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 10899–10911, 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.762229.

43 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 478–489,

2008.

44 DOLAT, L.; SPILIOTIS, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 123–141, 2015.

45 ZUVANOV, L. *et al.* A blueprint of septin expression in human tissues. **Functional & Integrative Genomics**, v. 19, n. 5, p. 787–797, 2019.

46 BERTIN, A. *et al.* Three-dimensional ultrastructure of the septin filament network in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 3, p. 423–432, 2012.

47 BYERS B, GOETSCH L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, p.717-721, 1976. DOI:10.1083/jcb.69.3.717.

48 BRIDGES, A. A. *et al.* Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 1, p. 23–32, 2016.

49 KHAN, A.; NEWBY, J.; GLADFELTER, A. S. Control of septin filament flexibility and bundling by subunit composition and nucleotide interactions. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 6, p. 702–712, 2018.

50 GARCIA, G. *et al.* Subunit-dependent modulation of septin assembly: Budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 6, p. 993–1004, 2011.

51 IWASE, M. *et al.* Shs1 plays separable roles in septin organization and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 177, n. 1, p. 215–229, 2007.

52 ZERAIK, A. E. *et al.* Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7799–7811, 2014.

53 SOME, D. *et al.* Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS). **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 148, p. 1–9, 2019.

54 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

55 SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006.

56 COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.

57 LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

58 PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v.264, p.

121–136, 1996. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0628.

59 HOOFT, R.W.W. *et al.* Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 1, p. 272, 1996.

60 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

61 SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

62 BAUR, J. D. *et al.* Dissecting the nucleotide binding properties of the septins from *S. cerevisiae*. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 1, p. 45–54, 2019.

63 BERTIN, A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8274–9, 2008.

64 BRIDGES, A. A. *et al.* Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. 2146–2151, 2014.