

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

FERNANDO ALESSANDRO

**Estudos estruturais e bioquímicos das
septinas 7 e 9 humanas**

São Carlos

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO ALESSANDRO

Estudos estruturais e bioquímicos das
septinas 7 e 9 humanas

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação do Instituto de Física de São
Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique
Thiemann**

**São Carlos
2010**

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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Alessandro, Fernando
Estudo estruturais e bioquímicos das septinas 7 e 9 humanas./Fernando Alessandro; orientador Otavio Henrique Thiemann - São Carlos, 2010.
144 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Septina 7. 2. Septina 9. 3. Clonagem. 4. Expressão. 5. Caracterização estrutural. 6. Atividade GTPásica I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Alessandro

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada –
Opção: Física Biomolecular.

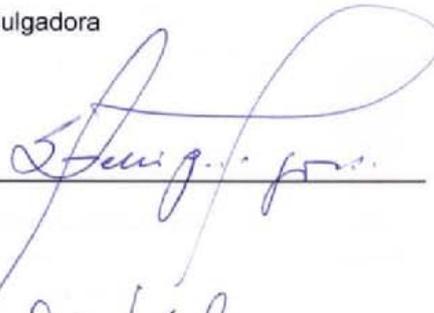
Aprovado(a) em: 07.06.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Stenio Perdigão Fragoso

Instituição: FIOCRUZ

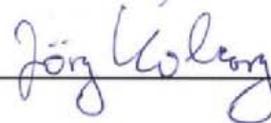
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Jörg Kobarg

Instituição: LNLS

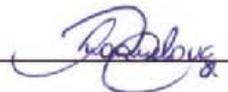
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Iran Malavazi

Instituição: UFSCar

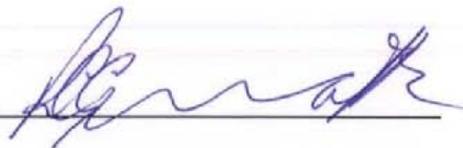
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Richard Charles Garratt

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Otavio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Dedico esse título, essa tese de doutorado e todo tempo a ele empenhado a duas pessoas mais importantes da minha vida, minha avó e minha esposa. Minha avó educou-me ensinando com seus pensamentos simples e precisos o que é necessário saber para ser educado, esforçado, trabalhador, crítico e acima de tudo um homem honrado. À minha esposa por ser meu chão, meu céu, meu objetivo, o poema da minha história e por sempre me fazer feliz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela orientação, ensinamentos, criatividade científica e acima de tudo a capacidade de manter seus alunos sempre motivados na busca de grandes resultados acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pelo envolvimento no projeto, auxiliando na formulação de perguntas e resolução de respostas.

A Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pelo apoio, atenção e contribuições importantes durante todo o doutorado.

Ao amigo e aluno de iniciação científica Vitor (B2) que participou do projeto, mostrando durante o desenvolvimento deste, capacidade de aprendizagem, organização, iniciativa e trabalho acima da expectativa esperada para um aluno de graduação.

Aos amigos e alunos de iniciação científica Victor (Wally) e Rafaela que participaram e mostraram empenho em trabalhos importantes para o projeto.

Ao aluno de Pós-Doutorado Humberto Pereira pelo auxílio, apoio, dedicação e enorme entusiasmo na realização do projeto.

Ao aluno de Doutorado Mario Oliveira Neto pelo seu auxílio e dedicação.

Aos colegas e, sobretudo, aos amigos do grupo de septinas, em especial, Joci, Júlio e Ivo.

Aos colegas do grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural.

Aos técnicos e colegas do grupo de Biofísica e Cristalografia: Bel, Suzana, Bianca e Kelvin.

Aos professores dos grupos de Biofísica e Cristalografia.

À minha família - meu irmão Lauro, minhas irmãs Fernanda e Claudinéia, minhas sobrinhas Bárbara e Julia, meu sobrinho João Pedro, meus cunhados Marco, Marcos e João, minha sogra Maria, meu sogro Marcos e por último a minha mãe Marisa e ao meu padasto Marcos.

Aos meus filhos de coração: Gaia, Lelé, Tocha, Doce e Burguesa.

Aos amigos que fiz Livia Manzine, Marcos Michel, Sheila Couto e Marcel Nakahira.

Agradeço à Universidade de São Paulo, em especial, ao programa de Pós-Graduação em Ciências, área de concentração Física Aplicada: opção Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos.

À FAPESP e à CNPq pelo apoio financeiro

O HOMEM QUE AGE MULTIPLICA SUAS
FORÇAS DOMINA-SE E SE APERFEIÇA.
MARIA MONTESSORI

RESUMO

ALESSANDRO, Fernando. **Estudos estruturais e bioquímicos da septinas 7 e 9 humanas**. 2010. 144p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

As proteínas pertencentes à família das septinas foram originalmente descobertas em 1971 em decorrência de estudos genéticos em células mutantes. Essas proteínas – encontradas em fungos e animais, mas não em plantas – apresentam como principais características a presença de um domínio conservado de ligação aos nucleotídeos de guanina (GTP) e a formação de filamentos homo- e hetero-oligoméricos, que são estruturas altamente organizadas. Estudos filogenéticos e moleculares em humanos identificaram 14 septinas que são divididas em 4 grupos (I, II, III e IV). Estas moléculas associam-se com membranas celulares, actina, microtúbulos do citoesqueleto e estão envolvidas em inúmeros processos que ocorrem no córtex celular e requerem organização espacial, tais como: citocinese, ciclo celular, formação de barreiras de difusão, alinhamento de fuso. Alterações na expressão das septinas estão associadas a vários tipos de tumores e a doenças de Parkinson e Alzheimer. Neste trabalho, com o objetivo de obter informações estruturais e bioquímicas das septinas 7 e 9 humanas. Este projeto é parte de um esforço conjunto coordenado pelo Prof. Dr. Richard C. Garratt e conhecido informalmente como “Septimoma”. As construções recombinantes SEPT 7, SEPT 7G, e SEPT 9G foram expressas em *Escherichia coli* e as proteínas recombinantes obtidas. As análises em eletroforese SDS-Page e em gel nativo indicam que essas proteínas foram purificadas com sucesso. A atividade GTPase e o estado oligomérico na forma dimérica foram verificados. Estudos de dicroísmo circular e fluorescência determinaram que esses recombinantes são formados por uma mistura de estruturas secundárias α e β , e também que o C e o N terminais aumentam a estabilidade das proteínas. Foram obtidos cristais da SEPT 7G e, por meio da técnica de raios-X, foi determinado um modelo tridimensional da proteína com resolução de 3,4°.

Palavras-chave: Septina 7. Septina 9. Clonagem. Expressão. Caracterização estrutural. Atividade GTPásica.

ABSTRACT

ALESSANDRO, Fernando. **Structural and biochemical studies of human septins 7 e 9**. 2010. 144p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Proteins belonging to the septin family were originally discovered in 1971 through genetic studies of mutant cells. These proteins – found in fungi and animals, but not in plants – present, as their main characteristics, a conserved guanine nucleotide-binding domain (GTP) and they also form homo and hetero-oligomeric filaments that are highly organized structures. Phylogenetic and molecular studies in humans have identified 14 septins which are divided into 4 subfamilies (groups I, II, III and IV). These molecules associate with cell membranes, actin, cytoskeleton microtubules and they are related to a number of processes that take place in the cell cortex and that require spatial organization, such as cytokinesis, cell cycle, diffusion barrier formation and spindle alignment. Alterations in the expression of septins are associated with several types of tumors and with Parkinson's and Alzheimer's diseases. In this work, with the goal of obtaining structural and biochemical information of human septins 7 and 9, the recombinants SEPT 7, SEPT 7G and SEPT 9G were expressed in *E. coli*. Analyses both in SDS-Page electrophoresis and in native gel suggest that these proteins were purified successfully for they are soluble and homogeneous. GTPase activity has been verified in all of these recombinants, which shows that these proteins are present in native form and that additional molecules are not needed for this activity. It was possible to determine – through different techniques such as molecular exclusion chromatography and SAXS – that all the molecules in solution are grouped as dimeric form. Circular dichroism and fluorescence spectroscopic studies have determined both that such recombinants are formed by means of a mixture of α and β secondary structures and that the C and N-terminals increase the stability of proteins. Protein stability studies under different pH and temperature conditions show that the raise of the latter produces a greater molecular aggregation. Measurements of fluorescence emissions have indicated that the SEPT 7, SEPT 7G and SEPT 9G form structures of amyloid-like filaments found in many septins. Crystal structures of SEPT 7G have been obtained and, by means of the X-ray technique, a 3-D model of the protein has been determined with a resolution of 3.4 $^{\circ}$. It has been possible to predict, with molecular modeling studies, regions formed by loops that showed low electronic density in the GTPase

crystallographic model. Therefore, it has been possible to add more structural information to this domain and to form the complete polypeptide without cuts.

Keywords: Septin 7. Septin 9. Cloning. Expression. Structural Characterization. Gtpase Activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Figura 1.1 – Localização dos filamentos de septinas em *C. elegans* (a) e em células humanas (b). A figura mostra a grande similaridade na expressão, especialmente na citocinese. As células foram coradas por imunofluorescência indireta. Figura adaptada da figura (100)..... 26
- Figura 1.2 – Filamentos de septinas de *C. elegans* in vitro. As imagens dos filamentos foram produzidas por microscopia eletrônica corada negativamente em *E. coli* (A) e em células de inseto (B,C) depois da diálise com tampão 500mM de NaCl para 200mM NaCl. (B) Visão geral dos filamentos de septinas. (C) Visão amplificada indicada pelas áreas 1, 2, 3 em (B). As barras representam escala de 50nm em (A,C) e 250nm em (B). Figura adaptada da figura (45)..... 27
- Figura 1.3 – Mostra a sequência primária das septinas indicando os domínios comuns N e C-terminal e o domínio central conservado GTPase. Estas proteínas podem ser classificadas em 4 diferentes grupos (I - IV) baseado na similaridade sequencial da região C-terminal da proteína. Neste modelo, as sequências não semelhantes são mostradas como uma linha. Figura adaptada da referência (31)..... 29
- Figura 1.4 – Estrutura típica de septinas com sequências que variam de trezentos a seiscentos aminoácidos aproximadamente. Essa proteína apresenta domínio GTP_CDC conservado com três motivos: G1, GxxxxGK (126 - 135 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p), G3, DxxG (aminoácidos 204 - 209 em *S. cerevisiae* Cdc3p), e G4, xKxD (280 - 289 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p). A região descrita anteriormente como polibásicas (aminoácidos 110 - 120 em *S. cerevisiae* Cdc3p) é mostrada como uma caixa preta e as anteriormente descritas como "único elemento" (360 - 413 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p) são mostradas como uma caixa cinza. S1-S4 marca posições dos novos motivos. Figura adaptada da figura (34)..... 32
- Figura 1.5 – À direita: Formação dos filamentos em *S. Cerevisiae*, mostrando os bastões hetero-oligoméricos altamente ordenados. À esquerda: imagem de alta ampliação mostrando em detalhes os bastões e o alinhamento entre eles. Figura adaptada da referência (45)..... 33
- Figura 1.6 – Microscopia eletrônica das unidades hexaméricas formadas pelas septinas SEPT2, SEPT6 e SEPT7, formando o bastão SEPT7- SEPT6- SEPT2- SEPT2- SEPT6- SEPT7. Figura adaptada da referência (60, 46)..... 34

Figura 1.7 –	Representação da SEPT 2 mostrando a possibilidade de formar dímeros pela interface G ou NC terminal como indicado pelas linhas. Figura adaptada da referência (46).....	35
Figura 1.8 –	Modelo do complexo trimérico formado pelas septinas humanas que forma o bastão SEPT7–SEPT6–SEPT2, indicado pela seta seus respectivos nucleotídeos. Figura adaptada da referência (46).....	35
Figura 1.9 –	Representação da superfície do heterofilamento formado pelas septinas humanas, mostrando a ordem no bastão hexamérico. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada (GTP ou GDP). A possível orientação do C-terminal predito como coiled coil é mostrada esquematicamente. Figura adaptada da referência (46).....	36
Figura 1.10 –	Cultura de neurônios hipocampal (DIV) foi fixada e imunocorada para a septina 7. Imagens de alta ampliação mostrando a localização das septinas 7 na base das saliências individuais (setas em vermelho).....	40
Figura 3.1 –	Gráfico de Ramachandran gerado pelo Procheck. As regiões representadas em vermelho são as mais favoráveis, as representadas em amarelo, são as favoráveis, as representadas em bege, são as menos favoráveis e as regiões brancas, são as desfavoráveis.....	69
Figura 4.1 –	Mostra o produto da PCR dos fragmentos que codificam a SEPT 7 e o seu domínio GTPase - SEPT 7G . Análise da reação foi realizada em gel de agarose (1% TAE) corado com brometo de etídeo. Marcador de pares de base MM (1 Kb DNA Ladder).....	72
Figura 4.2 –	Resultado da amplificação dos fragmentos que codificam a SEPT 9G e SEPT 9GC. Análise realizada em gel de agarose 1% TAE (1X). Marcador em pares de bases MM (1Kb DNA Ladder - Fermentas).....	72
Figura 4.3 –	Padrão de restrição do DNA plasmidial digeridos pelas enzimas de restrição NheI e XhoI das septinas humanas. A) Mostra os fragmentos digeridos das septinas 7 e do seu domínio GTPase. B) Mostra os fragmentos das septinas 9 humanas - SEPT 9GC e o SEPT 9G. Análise realizada em gel de agarose 1% e TAE (1X). Marcador em pares de bases MM (1Kb DNA Ladder - Fermentas).....	75
Figura 4.4 –	Gel SDS-PAGE 15% mostrando o padrão de expressão em E. coli da SEPT 7 e SEPT 7G após a indução. As setas indicam as proteínas recombinantes. Marcador de massa molecular (MM) em KDa.....	76

- Figura 4.5 – Perfil cromatográfico da amostra submetida à coluna de troca iônica DEAE Sepharose. (1) amostra de interesse - SEPT 7, (2) contaminante. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 100 μ M e frações de 1,0 mL foram coletadas com um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 – 1M..... 78
- Figura 4.6 – Padrão cromatográfico da fração 35 eluída da coluna de troca iônica submetida à coluna de exclusão molecular (1) no tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 e 100 μ M de GDP. Esse perfil evidencia a possível forma dimérica da molécula..... 79
- Figura 4.7 – A) Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, (1) Extrato bruto de B121(DE3), (2) Fração 40 eluída da coluna de exclusão molecular, (MM) marcador de massa molecular. B) Gel nativo da amostra de Septina 7 eluída da coluna de exclusão molecular, (MM) marcador de massa molecular..... 80
- Figura 4.8 – Gel de poliacrilamida 15% da purificação da Septina 7 GTPase. (1) Marcador; (2) sobrenadante; (3) precipitado; (4) void, eluição com (5) 5mM, (6) 10mM, (7) 20mM, (8) 100mM e (9) 250mM de imidazol..... 82
- Figura 4.9 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular do domínio SEPT 7G na coluna Superdex-200. O pico 1 é referente à SEPT 7G, de massa molecular aparente de aproximadamente 60kDa. O pico 2 é referente ao imidazol..... 82
- Figura 4.10 – Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, mostrando a septina 7 GTPase depois das etapas de purificação, (1) SEPT 7G, (2) extrato bruto de B121(DE3), (MM) padrão de peso molecular. B) Gel nativo mostrando uma única isoforma para a Septina 7 GTPase e marcador (MM)..... 82
- Figura 4.11 – Gel SDS-PAGE 15% mostrando o padrão da expressão em E. coli da SEPT 9G após a indução. A seta indica a proteína recombinante. Marcador de massa molecular (MM) em KDa..... 83
- Figura 4.12 – Gel de poliacrilamida 15% da purificação da septina 9 GTPase. (1) Marcador; (2) sobrenadante; (3) void, eluição com (4) 5mM, (5) 10mM, (6) 20mM, (7) 100mM..... 85
- Figura 4.13 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular do domínio GTPase na coluna Superdex-200. O pico 1 é referente à SEPT 9G, de massa molecular aparente de aproximadamente 60kDa. O pico 2 é referente ao imidazol..... 86

Figura 4.14 – Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, mostrando a septina 9 G depois das etapas de purificação, (1) extrato bruto de B121(DE3), (2) SEPT 9G, (MM) padrão de peso molecular.....	87
Figura 4.15 – (A) Perfil cromatográfico de troca aniônica mostrando a separação do GDP e GTP quando tratados com o método de desnaturação química com ácido perclórico. (B) Os picos correspondentes ao ácido perclórico submetido à troca aniônica. A reação foi monitorada a 254 nm.....	89
Figura 4.16 – Perfil cromatográfico da SEPT 7 após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.....	90
Figura 4.17 – Perfil cromatográfico do domínio GTPase da septina 7 humana após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.....	91
Figura 4.18 – Perfil cromatográfico do domínio GTPase da septina 9 humana após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo GDP em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.....	92
Figura 4.19 – Para o processo de desconvolução dos espectros de CD das septinas, foi utilizado o pacote de programas CDPro. A) SEPT 7 é constituída de 39% hélices- α , 17% folhas- β , 11% voltas e 33% estruturas irregulares . B) SEPT 7 GTPase é formada por 31% hélices- α , 22% Folhas- β , 16% voltas e 31% estruturas irregulares.....	94
Figura 4.20 – Espectro de CD registrado de 200 a 250nm, acompanhando o efeito da temperatura sobre a SEPT 7G. A temperatura investigada variou de 15°C a 80°C com intervalo de 5oC. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado no aparelho.....	96
Figura 4.21 – Curva de transição em função da temperatura da SEPT 7G monitorada no comprimento de onda de 200nm.....	97
Figura 4.22 – Espectro de CD registrado de 203 a 250nm, mostrando o efeito da temperatura sobre a SEPT7 G. A temperatura investigada variou de 10°C a 80°C em intervalo de 10°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado no aparelho.....	98
Figura 4.23 – Curva de transição em função da temperatura da SEPT 7 monitorada no comprimento de onda de 200nm.....	99

Figura 4.24 –	Espectros de CD no UV distante da proteína em função do pH, monitorados a temperatura de 18oC. A) Espectros da SEPT 7G em diferentes pHs (2,0 a 11,0). B) Espectro da SEPT 7 em diferentes pHs (3,0 a 11,0). As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL variando o comprimento de onda de 193 a 250nm.....	100
Figura 4.25 –	Espectro de CD da proteína SEPT 9 GTPase em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 a 18oC. A desconvolução do espectro mostrou a seguinte proporção de estruturas secundárias: 35 % de hélice- α , 23% de folhas- β , 25% voltas e 20% de estruturas irregulares.....	102
Figura 4.26 –	Espectro de CD registrado de 205 a 250nm, mostrando o efeito da temperatura sobre a SEPT9 G. A temperatura investigada variou de 10°C a 90°C em intervalo de 5°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado ao aparelho.....	103
Figura 4.27 –	Curva de transição em função da temperatura do domínio GTPase da septina humana 9, monitorada no comprimento de onda de 200nm.....	104
Figura 4.28 –	Espectros de CD no UV distante da SEPT 9G em diferentes pHs (2,0 a 11,0) a 18oC. As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL variando o comprimento de onda de 193 a 250nm.....	105
Figura 4.29 –	Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 7 (A) e seu domínio GTPase (B), em função da temperatura. O comprimento de onda usado foi 350 nm e a intensidade do espalhamento foi monitorada durante 5400 segundos.....	106
Figura 4.30 –	Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 9G em função da temperatura. O comprimento de onda usado foi 350 nm e a intensidade do espalhamento foi monitorada durante 5400 segundos.....	108
Figura 4.31 –	Emissão de fluorescência do ThT ligado à SEPT 7 (A) e a seu domínio GTPase (B), em função da temperatura. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm durante um intervalo de tempo de 5400 segundos.....	109
Figura 4.32 –	Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT 9G em função da temperatura. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm durante um intervalo de tempo de 5400 segundos.....	110
Figura 4.33 –	Curvas de espalhamento da proteína SEPT 7G corrigidas pelo efeito de smearing, (1) 1 mg/ml – Gnom 1e (2) 7 mg/ml – Gnom 2.....	112

Figura 4.34 – Função de distribuição de distâncias evoluídas a partir das curvas de espalhamento utilizando o programa Gnom. (1) Gnom 1, (2) Gnom 2, (3) SEPT 2 - proteína de referência (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, et al., 2007) e (4) SEPT 7G.....	113
Figura 4.35 – Modelo tridimensional de baixa resolução da SEPT 7G usando procedimento ab initio por meio do programa Gasbor. As duas imagens são diferentes ângulos da mesma figura.....	113
Figura 4.36 – À esquerda: a seta indica os pontos de nucleação encontrados no ensaio. À direita: as setas indicam os cristais formados nos primeiros ensaios de cristalização.....	114
Figura 4.37 – As setas indicam os cristais do domínio GTPase da septina 7 humana (SEPT 7G) obtido através da técnica de difusão de vapor em gotas suspensas com 0,1M Tris; pH 8,4; 16% glicerol; 1,5M sulfato de amônio; 12,5% Isopropanol, 500mM GDP. Dimensão típica de 0,2 x 0,2 x 0,2mm....	115
Figura 4.38 – Resolução estrutural da SEPT 7G de 3.4Å. Foi feita a substituição molecular com os dados cristalográficos do complexo 2-6-7 (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, et al., 2007). As imagens ilustram duas disposições diferentes da mesma estrutura.....	116
Figura 4.39 – (A) Resolução estrutural da SEPT 7G a 3,4 Å, evidenciando a simetria das moléculas dentro do retículo cristalino. (B) A imagem anterior (A) da estrutura cristalográfica em um ângulo em 90° em relação a um dos eixos. (C) A estrutura cristalográfica em (B) em um ângulo em 90° em relação a um dos eixos perpendiculares ao anteriormente rodado.....	119
Figura 4.40 – (A) Modelo gerado pelos dados obtidos pela técnica de SAXS sobreposto ao modelo cristalográfico obtido do domínio GTPase da septina 7 humana. (B) O mesmo modelo de SAXS anterior sobreposto ao cristalográfico da SEPT 7G, em um ângulo de 90° em relação ao outro.....	120
Figura 4.41 – Sequências das proteínas recombinantes SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G. Em preto, o C-terminal; em vermelho, o domínio GTPase e em azul o N-terminal de cada proteína recombinante.....	122
Figura 4.42 – Visualização do modelo gerado em duas posições diferentes. A estrutura apresenta conservação no enovelamento dos domínios GTPase das septinas.	123
Figura 4.43 – Visualização do modelo gerado (azul) sobreposto ao modelo obtido experimentalmente (verde) em duas posições diferentes. Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo, refletindo nos valores RMS 2.41Å.....	124

Figura 4.44 –	Visualização do modelo gerado em duas diferentes posições. A estrutura apresenta conservação no enovelamento encontrado nos domínios GTPase das septinas.....	124
Figura 4.45 –	Visualização do modelo gerado (azul) sobreposto ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde) em duas diferentes posições. Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo que reflete nos valores RMS 0.292Å.....	125
Figura 4.46 –	(A) Visualização do modelo gerado. (B) Sobreposição ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde). Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo que reflete nos valores RMS 0.415Å.....	127
Figura 4.47 –	Mostra em duas diferentes posições a sobreposição do modelo gerado (azul) ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde). Também são visualizados regiões de não sobreposição estruturais evidenciadas (vermelho) e o sítio de ligação à GDP (alaranjado).....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 –	Características das septinas humanas. Carga A (ácido $pI < 6,5$); carga B (básico $pI > 7.5$) e carga N(neutro). Tabela adaptada da referência (27).....	29
Tabela 1.2 –	Informação do agrupamento de septinas dos metazoários. Tabela adaptada da referência (38).....	31
Tabela 3.1 –	Oligonucleotídeos sintetizados para as ampliações das SEPT 7 e SEPT 7G. A tabela mostra os sentidos de cada primer e seus respectivos sítios para a enzima de restrição destacados em vermelho.....	47
Tabela 3.2 –	Reações de amplificação para a PCR das SEPT 7 e SEPT 7G. A tabela mostra os reagentes e as suas respectivas quantidades utilizadas.....	48
Tabela 3.3 –	Ciclo de PCR para amplificação do DNA SEPT 7 e de SEPT 7G. O ciclo foi o mesmo para ambas as amostras, com alteração apenas da temperatura de anelamento mostrada em destaque.....	47
Tabela 3.4 –	Ciclo de PCR da região que codifica os fragmentos de DNA SEPT 9GC e de SEPT 9G. O ciclo foi o mesmo para ambas as amostras, com a alteração da temperatura de anelamento mostrada em destaque.....	49
Tabela 4.1 –	Predição de estrutura secundária.....	93
Tabela 4.2 –	Parâmetros do cristal e estatísticas do processamento de dados.....	115
Tabela 4.3 –	Parâmetros das septinas SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G. Massa molecular (M.M), coeficiente de extinção teórico (ϵ), ponto isoelétrico (pI), resíduos fluorescentes (R) e número de aminoácidos (aa).....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Å – Angstroms

aa – Aminoácidos

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

ADP – Adenosina 5'-difosfato

BI21 – Linhagem bacteriana para expressão plasmidial

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CD – Dicroísmo circular

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

DH5α – Linhagem bacteriana para propagação plasmidial

DNA – Ácido desoxirribonucleico

cDNA – Ácido desoxirribonucleico cíclico

DO – Densidade óptica

DSL – Espalhamento dinâmico de luz

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo

GTP – Guanosina trifosfato

GDP – Guanosina difosfato

IPTG – Isopropil-thio-β-D-galactopiranosídeo

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

LB – Luria Bertani

MM – Peso molecular

M – Molar

mM – milimolar

Ni-NTA – Coluna de níquel

pb – pares de bases

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PDB – Protein Data Bank

pI – Ponto isoelétrico

P-loop – Loop de interação com fosfato

SEPT – Septina

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

ThT – Thioflavin-T

Tris – [Tris(hidroximetil)aminoetano]

$[\Theta]$ – Elipcidade molar

λ – Comprimento de onda

ϵ – Coeficiente de extinção polar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Septinas.....	26
1.2 Famílias e nomenclatura de septinas.....	28
1.3 Membros das septinas e sua evolução.....	29
1.4 Estrutura e domínios das Septinas.....	31
1.5 Complexos de septinas.....	33
1.6 Estruturas cristalográficas.....	34
1.7 Funções das septinas.....	37
1.8. Atividade GTPase.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
2.1. Objetivos específicos deste trabalho.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Construções do DNA Recombinante.....	47
3.1.1 Amplificação do fragmento de DNA da septina 7 humana (SEPT 7) e do seu domínio GTPase (SEPT 7G).....	47
3.1.2 Amplificação dos fragmentos de DNA da septina 9 humana (SEPT 9GC) e o do seu domínio GTPase (SEPT 9G).....	49
3.1.3 Adição da cauda poli (A).....	49
3.1.4 Preparo dos vetores de propagação.....	50
3.1.5 Transformação de células competentes.....	50
3.1.6 Extração e clivagem dos DNAs plasmidiais.....	51
3.1.7 Subclonagem no vetor de expressão pET-TEV.....	51

3.1.8 Análises dos plasmídeos recombinantes (pET TV).....	53
3.2 Expressão da proteína recombinante.....	53
3.2.1 Indução proteína recombinante SEPT 7 e SEPT 7G.....	53
3.2.2 Indução da proteína recombinante SEPT 9G e SEPT 9GC.....	54
3.3 Purificações da proteína.....	55
3.3.1 Precipitação.....	55
3.3.2 Cromatografia de afinidade.....	56
3.3.3 Cromatografia de exclusão molecular.....	57
3.3.4 Cromatografia de troca iônica.....	58
3.3.5 Purificação das proteínas SEPT9G e SEPT 9GC.....	58
3.4 Técnicas espectroscópicas.....	59
3.4.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	59
3.4.2 Ensaio de cristalização das SEPT 7G e SEPT 7.....	62
3.4.3 Coleta de dados de difração de raios X.....	61
3.4.4 Dicroísmo circular (CD).....	62
3.4.5 Fluorescência Intrínseca.....	63
3.4.6 Experimento de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	64
3.4.7 Espalhamento de luz a ângulo fixo.....	65
3.5 Testes de atividade biológica.....	66
3.5.1 Ensaio de hidrólise de GTP.....	66
3.6 Estudos Teóricos.....	67
3.6.1 Análise bioinformática.....	67
3.6.2 Modelagem por Homologia.....	67

3.6.3. Validação dos modelos gerados.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 Amplificação e clonagem.....	72
4.1.1 Amplificação e clonagem da SEPT 7 e SEPT 7G.....	72
4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	76
4.2. 1 Expressão das proteínas recombinantes SEPT 7 e SEPT 7G.....	76
4.2. 2 Purificação das proteínas recombinantes SEPT 7 e SEPT 7G.....	77
4.2.3 Expressão da proteína recombinante SEPT 9GC e SEPT 9G.....	83
4.2.4 Purificação das proteínas recombinantes SEPT 9GC e SEPT 9G.....	84
4.3 Teste de atividade GTPase e análise do conteúdo de nucleotídeo liberado.....	87
4.4 Estudos espectroscópicos por dicroísmo circular (CD).....	93
4.4.1 Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD) das SEPT 7 e SEPT 7G.....	93
4.4.2. Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD) das SEPT 9G.....	101
4.5 Espalhamento de luz a ângulo fixo.....	105
4.5.1 Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 7 e SEPT 7G.....	104
4.5.2 Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 9G.....	108
4.6 Estudos de fluorescência: emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavin-T.....	108
4.6.1 Estudos de emissão de fluorescência do fluoróforo (Tht) das SEPT 7 e SEPT 7G.....	108
4.6.2 Estudos de emissão de fluorescência do fluoróforo (Tht) das SEPT 9G.....	110
4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	112
4.8 Ensaio de Cristalização.....	114
4.9 Resolução Estrutural.....	116
4.9.1. Análise dos dados de cristalografia e SAXS.....	119

4.10 Técnicas computacionais.....	121
4.10. 1 Determinação de parâmetros biofísicos dos recombinantes.....	121
4.10. 2 Modelagem molecular por homologia.....	122
5 CONCLUSÕES.....	129
6 PERSPECTIVA.....	132
REFERÊNCIAS.....	134

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

As proteínas pertencentes à família das septinas foram originalmente descobertas em 1971 por meio de estudos genéticos em células mutantes de leveduras deficientes no ciclo celular e no processo de brotamento (1).

Essas proteínas – encontradas em fungos e animais, mas não em plantas – apresentam como principal característica um domínio conservado de ligação aos nucleotídeos de guanina (GTP) e formam filamentos (2, 3). As septinas polimerizam formando homo e hetero-oligômeros (4, 5) que formam estruturas altamente organizadas, que podem ser visualizadas na figura 1.1

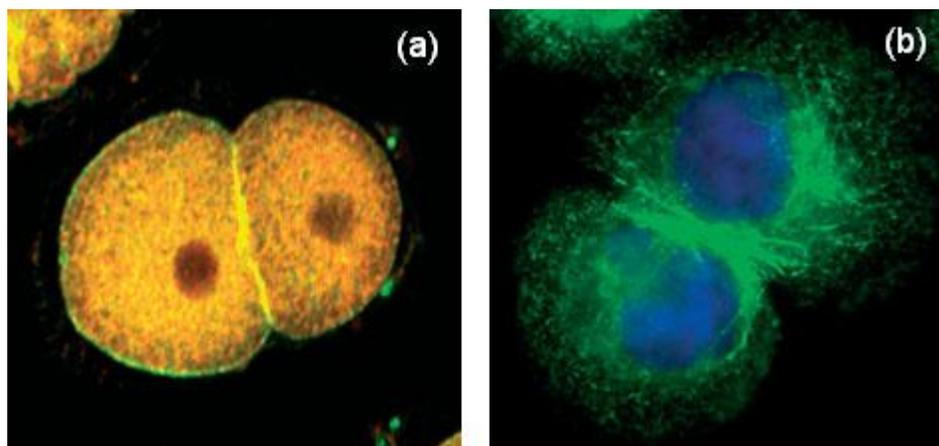


Figura 1.1 – Localização dos filamentos de septinas em *C. elegans* (a) e em células humanas (b). A figura mostra a grande similaridade na expressão, especialmente na citocinese. As células foram coradas por imunofluorescência indireta. Figura adaptada da referência (10).

Estas moléculas associam-se com membranas celulares, actina, microtúbulos do citoesqueleto e estão envolvidas em inúmeros processos que ocorrem no córtex celular e requerem organização espacial, tais como: citocinese (6), ciclo celular, formação de barreiras de difusão, alinhamento de fuso (3, 7), exocitose (8), além de determinar e manter a polaridade da célula (9,7).

A função das septinas não é limitada a divisão celular e eventos de secreção celular. Trabalhos mostram que alterações na expressão de septinas estão associadas a tumores de mama (11, 12), ovário (13), cérebro (14, 15) entre outros (16, 17, 18, 19, 20).

Estas moléculas também estão associadas a neuropatologias (21, 22, 23, 24). A expressão irregular de septinas tem sido relacionada à doença de Parkinson e Alzheimer. Várias linhas de evidências sugerem que as septinas estão envolvidas em doenças infecciosas, visto que o processo pelo qual patógenos intracelulares invadem e se locomovem nas células depende da interação do agente infeccioso com o citoesqueleto da célula (25, 26).

Septinas de mamíferos podem ser encontradas *in vivo* como agregados de complexos homo e hetero-oligoméricos formado por diferentes membros da família desta proteína (figura 1.2.). Pouco se sabe sobre as agregações de filamentos ou como estes são regulados (3, 27, 28). As associações heterotípicas destas moléculas têm sido documentadas entre diferentes espécies, com três ou quatro diferentes polipeptídios associados (29, 30, 31, 32, 33).

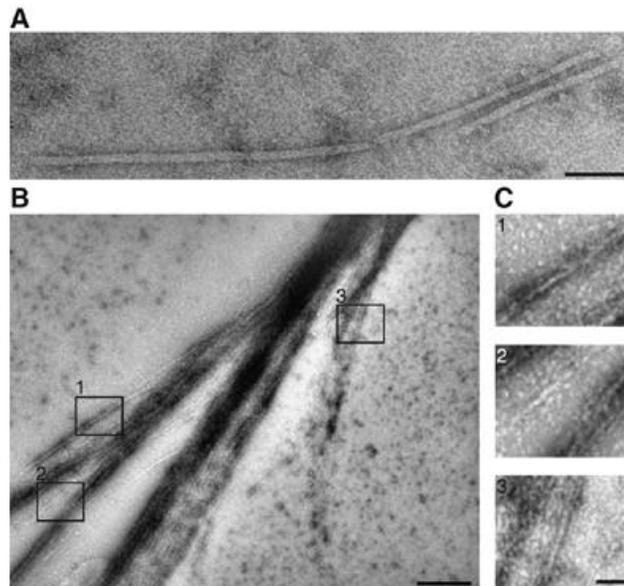


Figura 1.2 – Filamentos de septinas de *C. elegans in vitro*. As imagens dos filamentos foram produzidas por microscopia eletrônica corada negativamente em *E. coli* (A) e em células de inseto (B,C) depois da diálise com tampão 500mM de NaCl para 200mM NaCl. (B) Visão geral dos filamentos de septinas. (C) Visão ampliada indicada pelas áreas 1, 2, 3 em (B). As barras representam escala de 50nm em (A,C) e 250nm em (B). Figura adaptada da referência (45).

1.2 Famílias e nomenclatura de septinas

Estudos de reconstrução filogenética mostram que a família das septinas é encontrada nos reinos *fungi*, *microsporidia* e *animalia*. As mais recentes pesquisas sugerem que todas essas moléculas são agrupadas da seguinte forma: os grupos 1 e 2 contêm sequência de septinas de fungos e animais, os grupos 3 e 4 de fungos e microsporídia e o grupo 5 de fungos filamentosos (34).

Essa análise sobre a evolução das proteínas - baseada da sequência primária dessas moléculas - teve como principal resultado mostrar que septinas de diferentes reinos são ortólogas

Baseado na similaridade sequencial ou por estudos de filogenia, as septinas de mamíferos podem ser classificadas em quatro grupos (31, 35, 36, 37) ou quatro subfamílias relacionadas (Figura 1.3).

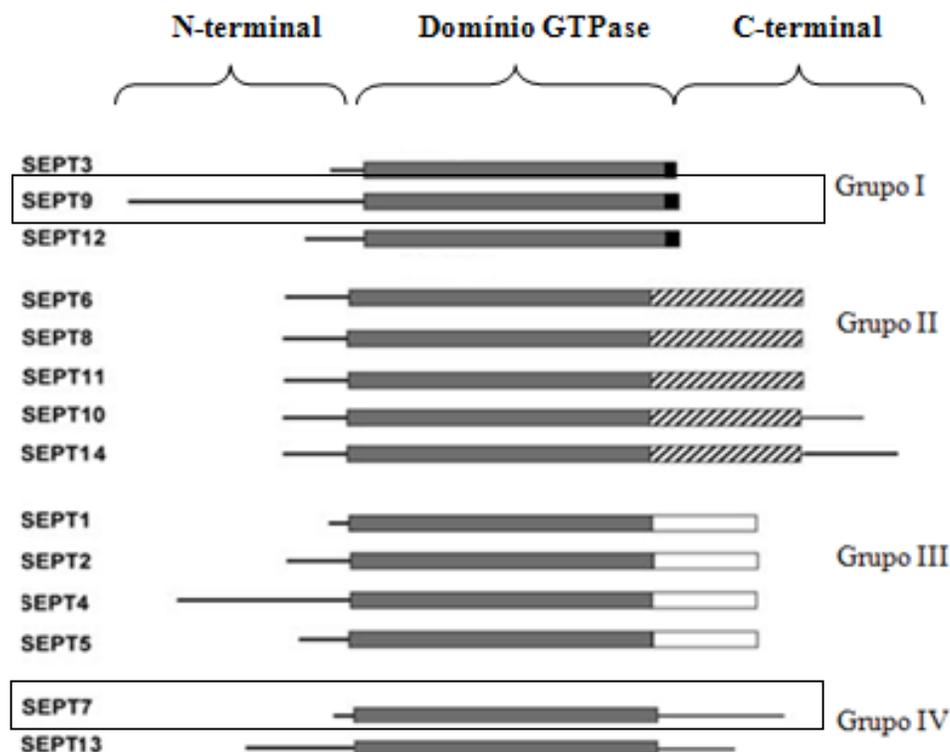


Figura 1.3 – Mostra a sequência primária das septinas indicando os domínios comuns N e C-terminal e o domínio central conservado GTPase. Estas proteínas podem ser classificadas em 4 diferentes grupos (I - IV) baseado na similaridade sequencial da região C-terminal da proteína. Neste modelo, as sequências não semelhantes são mostradas como uma linha. As septinas 7 e 9, trabalhadas nesta tese, estão destacadas. Figura adaptada da referência (31).

Trabalhos recentes identificaram a 14^a proteína da família de septinas humanas, em adição às 13 anteriormente identificadas (34, 36). Esta macromolécula apresenta características em comum às outras moléculas desta família, entretanto, apresenta maior similaridade com as septinas 6, 8, 10 e 11.

A tabela 1.1 mostra o nome, a localização e as características físicas e estruturais das 14 septinas humanas já identificadas.

Tabela 1.1 – Características das septinas humanas. Carga A (ácido pI < 6,5); carga B (básico pI > 7.5) e carga N(neutro). Segundo a referência (27).

Nome do gene	Localização cromossômica	Número de aminoácido	Massa (KDa)	pI ponto isoelétrico	Carga	Número de Coiled Coils	Número de acesso
SEPT3	22q13.2	345	39.3	6.8	N	0	NM_145733
SEPT4	17q23	478	55.1	5.7	A	2	NM_004574
SEPT5	22q11.2	369	42.3	6.4	A	2	NM_002688
SEPT6	Xq24	427	48.9	6.4	A	1	NM_145799
SEPT7	7q36.1	418	48.8	9.0	B	1	NM_001788
SEPT8	5q31	483	55.8	5.9	A	1	XM_034872
SEPT9	17q25.3	586	65.4	9.3	B	0	AF189713
SEPT10	8q11.23	517	60.0	6.6	N	1	BC020502
SEPT11	4q21.22	429	49.4	6.4	A	1	NM_018243
SEPT12	16p13.3	358	40.8	6.7	N	0	NM_144605
SEPT13	7p13.3	427	49.4	9.0	B	1	NC_003007
SEPT14	7p11.2	425	50.8	6.0	N	1	NC_003001

Nas septinas humanas é utilizada a nomenclatura padrão SEPT1 a SEPT14 para os genes e SEPT1 a SEPT14 para os correspondentes produtos gênicos, de acordo com a *Humam Genome Organization* (39).

1.3 Membros das septinas e sua evolução

O genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifica sete septinas (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12, Shs1/Sep7, Spr3 e Spr28). As leveduras em processo de divisão também têm sete proteínas (Spn1, Spn2, Spn3, Spn4, Spn5, Spn6 e Spn7). Entretanto, *Candida albicans*, *Eremothecium gossypii*, *aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* codificam diversas septinas (34, 40, 41).

No genoma de algas verdes aquáticas (*Chlamydomonas reinhardtii*) e fitoplâncton marinho (*Nannochloris spp.*) é interessante observar que as septinas codificadas por essas espécies são ortólogas. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos (40, 34).

Entre os metazoários, o nematoide *Caenorhabditis elegans* contém dois genes de septinas (Unc-61, Unc-59) e a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) contém cinco (sep1, sep2, sep4, sep5, e pnut) (40, 42). O genoma humano codifica 14 genes septinas, o camundongo (*Mus musculus*) 13, a galinha (*Gallus gallus*) 10, a rã (*Xenopus laevis*) 9, o peixe-zebra (*Danio rerio*) 17, o ouriço do mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) e o cordado ciona (*Ciona intestinalis*), não vertebrados, codificam 4 cada (27, 34, 40).

Um mapa de evolução detalhado foi proposto para septinas de metazoários focalizando a expansão dos genes nessas moléculas em vertebrados. Este estudo foi útil para entender a abrangência funcional dessas moléculas e sua relação evolucionária, pois a redundância funcional é um desafio para elucidar a função dessas proteínas (34).

A importante descoberta desse trabalho foi mostrar que o aparecimento dos quatro grupos de septinas deve ter ocorrido anteriormente à divergência dos vertebrados e invertebrados. Outro fato interessante foi observar que a expansão dos números de genes de septinas em vertebrados ocorre, principalmente, por duplicação de genes pré-existentes, explicando o mecanismo de formação de um novo grupo de septinas (34). Essa expansão também induziu a uma grande variedade de funções e complexos de septinas. As informações do agrupamento de septinas dos metazoários estão mostradas na tabela 1.2.

Por meio de análise evolucionária, (27, 36, 38) as septinas humanas foram classificadas em quatro grupos SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7. As proteínas SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5 pertencem ao grupo SEPT2. Fazem parte do grupo SEPT3 as proteínas SEPT3, SEPT9, e SEPT12. As proteínas SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14 pertencem ao grupo da SEPT6. No grupo da SEPT7 ocorre a SEPT7 e a SEPT13.

Tabela 1.2 – Informação do agrupamento de septinas dos metazoários. Tabela da referência (38)

Organismo	Grupo SEPT2	Grupo SEPT7	Grupo SEPT6	Grupo SEPT3
<i>Homo sapiens</i>	SEPT2-Hs; SEPT4-Hs; SEPT5-Hs; SEPT1-Hs	SEPT7-Hs; SEPT13-Hs	SEPT6-Hs; SEPT8-Hs; SEPT10-Hs; SEPT11-Hs; SEPT14-Hs	SEPT3-Hs; SEPT9-Hs; SEPT12-Hs
<i>Mus musculus</i>	SEPT2-Mm; SEPT4-Mm; SEPT5-Mm; SEPT1-Mm	SEPT7-Mm	SEPT6-Mm; SEPT8-Mm; SEPT10-Mm; SEPT11-Mm; SEPT14-Mm	SEPT3-Mm; SEPT9-Mm; SEPT12-Mm
<i>Gallus gallus</i>	gi:50752104-Gg; gi:57525156-Gg; gi:71897193-Gg	gi:60302768-Gg	gi:71895629-Gg; gi:118090250-Gg; gi:118097603-Gg; gi:118084362-Gg	gi:118082695-Gg; gi:71897123-Gg
<i>Xenopus laevis</i>	gi:52354788-Xl; gi:111598420-Xl	gi:49256249-Xl	gi:504118014-Xl; gi:51703480-Xl; gi:47683059-Xl; gi:68534806-Xl	gi:71679814-Xl; gi:34784614-Xl
<i>Danio vario</i>	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:47086783-Dr; gi:32822794-Dr; gi:134133316-Dr; gi:62955083-Dr	gi:66773110-Dr; gi:62122803-Dr; gi:38181410-Dr; gi:125812510-Dr
<i>Ciona intestinalis</i>	gi:198428956-Ci	gi:198436549-Ci	gi:198432765-Ci	gi:198417201-Ci
<i>S. purpuratus</i>	gi:115951499-Sp	gi:115720187-Sp	gi:115770370-Sp	gi:115715387-Sp
<i>D.melanogaster</i>	Sep1-Dm Sep4-Dm	Pnut-Dm	Sep2-Dm, Sep5-Dm	
<i>C. elegans</i>	Unc-61	Unc-59		

1.4 Estrutura e domínios das Septinas

As septinas pertencem à superclasse GTPase das P-loop NTPases que inclui quinase, miosina e proteínas Ras, que compartilham ao menos cinco motivos conservados dentro do domínio de ligação GTP, designados por G1 – G5 (2).

Septinas contêm os domínios G1, G3 e G4 (43) mostrado na figura 1.4. O motivo G1 é definido pelo elemento consenso GxxxxGK [ST], sendo que essa região forma um loop flexível que interage com grupo fosfato dos nucleotídeos (4). O motivo G3 contém vários resíduos hidrofóbicos seguidos pelo DxxG, esta região liga Mg^{2+} e pode interagir com os fosfatos β e γ do GTP.

O motivo G4 é caracterizado pelo NKxD, que é importante para especificidade da ligação GTP (2, 34). O motivo G5 não é encontrado em todos os membros da classe GTPase P-loop (2, 34).

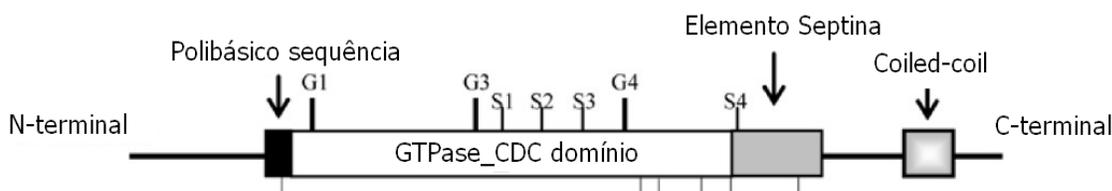


Figura 1.4 – Estrutura típica de septinas com sequências que variam de trezentos a seiscentos aminoácidos aproximadamente. Essa proteína apresenta domínio GTP_CDC conservado com três motivos: G1, GxxxxGK (126 - 135 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p), G3, DxxG (aminoácidos 204 - 209 em *S. cerevisiae* Cdc3p), e G4, xKxD (280 - 289 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p). A região descrita anteriormente como polibásicas (aminoácidos 110 - 120 em *S. cerevisiae* Cdc3p) é mostrada como uma caixa preta e as anteriormente descritas como "único elemento" (360 - 413 aminoácidos em *S. cerevisiae* Cdc3p) são mostradas como uma caixa cinza. S1–S4 marca posições dos novos motivos. Figura da referência (34).

O C-terminal do domínio GTPase é uma região de 54 aminoácidos conservada entre muitas septinas (44). Muitas destas moléculas também contêm uma extensão C-terminal que forma estruturas coiled-coils. Essa região apresenta similaridade sequencial entre as septinas de mamíferos e caracteriza-se pela presença de leucina a cada sete resíduos. Essa estrutura está envolvida em interações entre septinas (40).

Diferindo das demais septinas as septinas SEPT3, SEPT9 e SEPT12 não apresentam o domínio coiled-coil. Alguns autores descrevem o C-terminal como sendo dividido em duas regiões distintas, um elemento característico de septinas (Septin-Unique Element, SUE) e uma região em coiled - coil (44). Investigações estruturais dos filamentos de septinas têm mostrado que o SUE faz parte do domínio GTPase.

O domínio central GTPase é bastante conservado – apresenta mais de 35% de identidade sequencial entre septinas homólogas de levedura e mamíferos –, porém, os domínios N - e C - terminal apresentam grande variação. A identidade sequencial entre os domínios GTPases de septinas da mesma espécie é consideravelmente alta com uma similaridade mínima de 70% (35).

As sequências de septinas de mamíferos apresentam uma região polibásica próxima ao motivo P-loop ((BN)(BN)BNN(BN)(BN)), onde B são aminoácidos básicos e N neutros. Apesar de a função fisiológica desta região polibásica *in vivo* não ser conhecida (31), na SEPT4 esta região pode conferir associação à membrana e também pode ligar-se ao fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P2) (51).

1.5 Complexos de septinas

As septinas agregam-se com outras septinas em complexos lineares hetero-oligoméricos, em forma de bastões. Estes se associam ponta a ponta formando longos polímeros – filamentos altamente ordenados (figura 1.5) (45, 46).

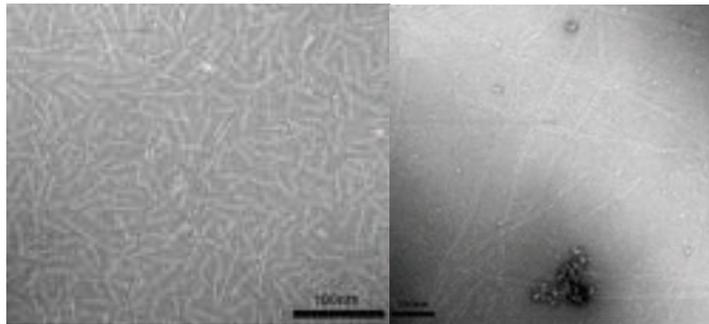


Figura 1.5 - À direita: Formação dos filamentos em *S. Cerevisiae*, mostrando os bastões hetero-oligoméricos altamente ordenados. À esquerda: imagem de alta ampliação mostrando em detalhes os bastões e o alinhamento entre eles. Figura adaptada da referência (45).

Análise de a septinas UNC-59 e UNC-61 são alinhadas em bastões lineares que apresentam quatro densidades. A estrutura central desse complexo é composta do domínio G dessas proteínas na ordem: UNC-59-UNC-61-UNC-61-UNC-59. Esses estudos indicam que os filamentos não devem apresentar polos (45).

Septinas recombinantes em *S. cerevisiae* – Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12 – agregam-se em complexos que formam octâmeros lineares alongados. Estudos de microscopia eletrônica de oligômeros destas proteínas tipo selvagem e mutante mostram a ordem das subunidades dos octâmeros nas leveduras: Cdc11p-Cdc12p-Cdc3p-Cdc10p-Cdc10p-Cdc3p-Cdc12p-Cdc11p (47). A estrutura central da septina nesse organismo é composta pelo domínio G com uma região flexível que se estende ao longo do filamento.

Estudos dos complexos formados pelas septinas em mamíferos indicam que essas proteínas agregam na ordem SEPT3-SEPT5-SEPT7. Este bastão é um hexâmero linear que liga um ao outro formando longos filamentos (48).

Em humanos as unidades hexaméricas, vistas em microscopia eletrônica, são compostas pelas proteínas SEPT 2, SEPT 6, e SEPT 7. Estas formam um bastão na ordem SEPT7– SEPT6– SEPT2–SEPT2– SEPT6– SEPT7– (figura 1.6).

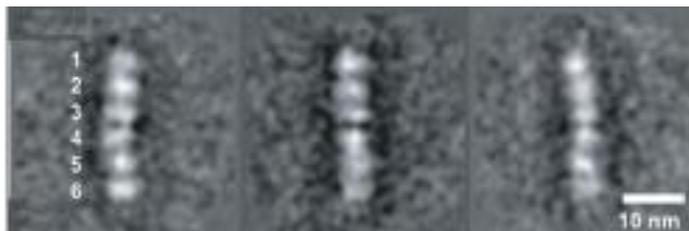


Figura 1.6 - Microscopia eletrônica das unidades hexaméricas formadas pelas septinas SEPT2, SEPT6 e SEPT7, formando o bastão SEPT7– SEPT6– SEPT2– SEPT2– SEPT6– SEPT7. Figura das referências (46, 60).

Inúmeros trabalhos mostram que as septinas de diferentes organismos formam complexos com diferentes números de subunidades como também podem formar filamentos por diferentes interfaces.

1.6 Estruturas cristalográficas

O domínio G da SEPT 2 humana foi cristalizado na presença de GDP e sua estrutura foi resolvida usando método de dispersão anômala (selenometionina) com uma resolução de 3.4 Å. Esse dado revelou um enovelamento GTPase canônico que é similar àquelas proteínas de ligação tipo Ras (46). Estudos dessas proteínas recombinantes mostram uma forma dimérica, alternando as regiões de interface N e C-terminal e G (figura 1.7).

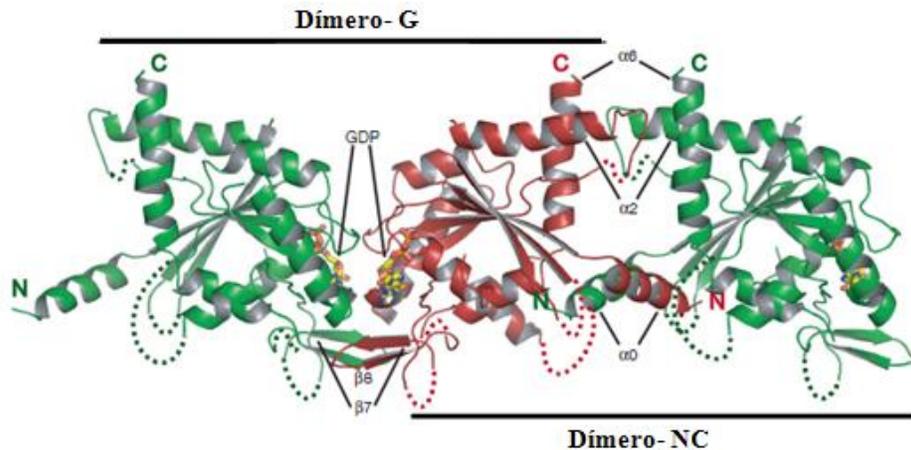


Figura 1.7 - Representação da SEPT 2 mostrando a possibilidade de formar dímeros pela interface G ou NC terminal como indicado pelas linhas. Figura da referência (46).

A estrutura cristalográfica do complexo formado pelas septinas humanas SEPT 2, SEPT 6 e SEPT 7 foi resolvida a uma resolução de 4 Å (figura 1.8) usando o método MIRAS (substituição isomorfa múltipla de substituição de átomo pesado usando espalhamento anômalo).

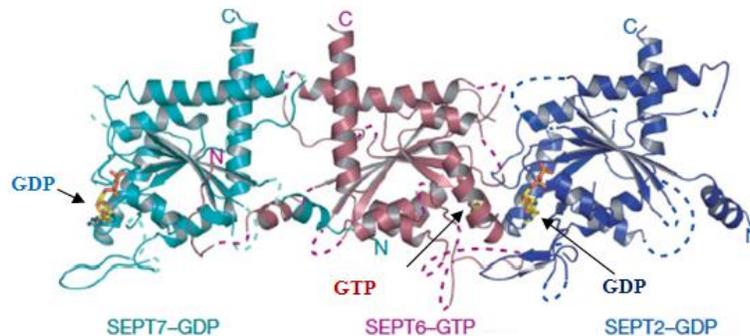


Figura 1.8 – Modelo do complexo trimérico formado pelas septinas humanas que forma o bastão SEPT7–SEPT6–SEPT2, indicado pela seta seus respectivos nucleotídeos. Figura da referência (46).

Esses dados revelaram o mesmo tipo de interação básica que ocorre na superfície do filamento do domínio G da SEPT 2. Esta relação é encontrada em agregações oligoméricas que formam os longos filamentos (46).

Esse estudo cristalográfico revelou que a formação do complexo e do filamento depende do domínio GTPase, ao invés do domínio coiled–coil que foi anteriormente proposto (27). De fato, essa região no complexo aparece flexível e, portanto, desordenando a estrutura cristalina (46).

Com os dados cristalográficos e de densidades da microscopia eletrônica do hexâmero das septinas humanas SEPT 7, SEPT 2 e SEPT 6 foi possível deduzir a ordem das proteínas dos filamentos (figura 1.9) (46)

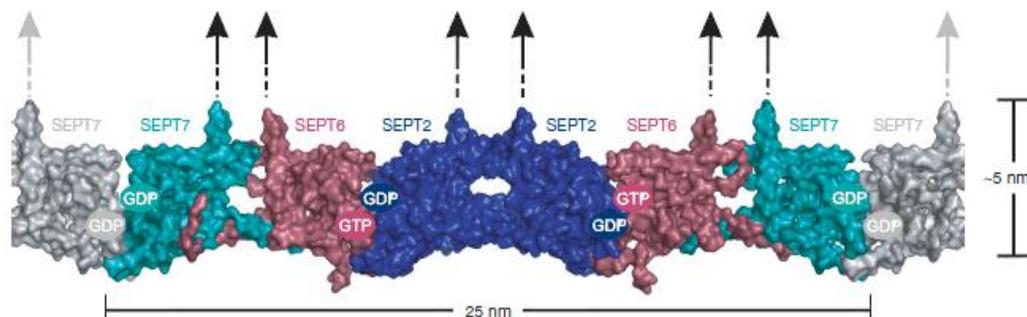


Figura 1.9 – Representação da superfície do heterofilamento formado pelas septinas humanas, mostrando a ordem no bastão hexamérico. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada (GTP ou GDP). A possível orientação do C-terminal predito como coiled coil é mostrada esquematicamente. Figura da referência (46).

Por meio desse estudo foi possível determinar qual proteína interage com qual nucleotídeo, estabelecendo que o GDP está ligado às SEPT 2 e SEPT 7, enquanto o GTP está ligado à SEPT 6 (46). Esse arranjo possibilita dois diferentes estados de nucleotídeos nas duas diferentes interfaces do dímero G: a interface SEPT2–SEPT6 é uma interface GDP–GTP, por outro lado a interação SEPT7–SEPT7 contém duas moléculas de GDP (46).

As observações desses resultados indicam que os nucleotídeos são necessários para a dimerização e que diferentes estados de nucleotídeos estão presentes em duas interfaces distintas do dímero G no filamento.

Foi também observado por microscopia eletrônica que ao menos uma fração do complexo de septinas – o hexâmero humano e o tetrâmero de nematóide – foi dobrada (45, 46). A origem dessa curva em hexâmeros humanos está localizada na interface da SEPT2–SEPT2 no centro do complexo (46). Esta curva pode mediar a curvatura observada em muitas estruturas de septinas altamente ordenadas, tais como: colar de septinas em levedura ou auto agregação das estruturas de septinas (49, 50).

1.7 Funções das septinas

Estudos em levedura sugerem que o colar de septinas que aparece durante o processo de divisão pode servir como uma barreira de difusão e apoio para muitas proteínas envolvidas em diversos processos celulares (42).

A função dessas proteínas durante a divisão varia enormemente de organismo para organismo. Por exemplo: septinas têm um papel essencial na citocinese de *S. cerevisiae*, pois funciona como uma âncora que prende os componentes citocinéticos, tais como aqueles envolvidos na formação da contração do anel de actinmiosina e no septo do processo de brotamento (52). Em contraste, deleção das quatro septinas expressas na fissão da levedura *Schizosaccharomyces pombe* causa apenas leve defeito na separação celular (53, 54), mostrando seu grau de importância nos diferentes organismos.

Estas proteínas estão envolvidas na orientação do fuso em *S. cerevisiae*. Durante a mitose, o envelope nuclear permanece intacto e os corpos polares do fuso mitótico (SPBs) são localizados no envelope nuclear. Depois da replicação do DNA e duplicação dos SPBs, esses corpos tanto na célula-filha como na célula-mãe devem ser corretamente posicionados (8). Septinas estão envolvidas no posicionamento dos componentes do fuso em levedura. Ao alterar a organização dessas proteínas no processo de brotamento, ocorrerá a desorganização do posicionamento correto dos SPBs em leveduras (8).

As septinas também estão envolvidas com os pontos de checagem no ciclo celular em *S. cerevisiae*, monitorando posição dos SPBs assegurando, dessa forma, que as células não saiam da mitose até o núcleo estar corretamente posicionado.

Septinas estão associadas ao ponto de checagem da replicação do DNA pela interação com a Rad35. Esse controle pela quinase Rad35 ocorre mantendo a estabilidade da forquilha de replicação e prevenindo a segregação de cromossomos precoces.

A Rad53 mostra interações genéticas com os componentes da via do anel de septinas e controla o tempo de degradação da proteína quinase Swe1p durante a replicação, junto com outras proteínas de checagem. Esse processo facilita o crescimento adequado das células-filhas (61, 62).

Além das septinas funcionarem na citocinese em leveduras, também funcionam na compartimentalização e em barreiras de difusão. A membrana plasmática de muitos tipos de células mostra domínios com composições e propriedades distintas. Essa polarização permite o transporte vetorial de solutos através do epitélio e propagação unidirecional de sinais por neurônios.

A associação de septinas com fosfolipídios (4) é essencial para a formação e manutenção dos domínios da membrana. Trabalhos recentes têm demonstrado que as septinas compartimentalizam as membranas das células de levedura durante a interfase e a mitose (59, 60).

Durante o crescimento das células-filhas na intérfase, a interrupção do colar de septinas provoca instabilidade na exocitose. Isto resulta na difusão passiva de proteínas - que antes estava restrita a uma célula - entre as células-filhas e células-mães.

Em células tipo selvagem, a divisão do colar de septinas em dois anéis demarca a compartimentalização de membranas distintas no plano da citocinese durante a divisão celular. Assim, as septinas agem como barreiras de difusão para a concentração de fatores corticoides que mediam a contração da actinmiosina, o crescimento da membrana e a excisão da célula-filha (60).

Em contraste com as septinas de leveduras que polimerizam principalmente nos sítios corticais nas células durante o processo de brotamento, em mamíferos, essas proteínas localizam-se não apenas na membrana plasmática, mas também no citoplasma associadas a microtúbulos e citoesqueleto de actina (63).

Os polímeros de septinas – diversos, descontínuos e relativamente estáticos – são adequados para formar um esqueleto discreto. Isso é possível porque essas moléculas podem ser redefinidas como uma estrutura que é condicionalmente unida para comportar como citoesqueleto (63, 41).

Em *Drosophila*, a mutação no gene *pnut* das septinas resulta em um fenótipo letal com células multinucleadas (29). A proteína *Pnut* e *Sep1*, ambas de *Drosophila*, estão associadas ao anel contrátil das células em divisão (29).

Em *C. elegans*, mutações nas septinas UNC-59 e UNC-61 resultam em algumas divisões celulares pós-embrionárias defeituosas. Estudos de imunofluorescência nestes organismos tipo selvagem revelam a localização destas proteínas principalmente nas bordas do sulco de clivagem (64).

Em células de mamíferos em divisão, a septina SEPT 2 é localizada ao longo do sulco de clivagem com actina (65). Durante a citocinese nessas células, estas proteínas são encontradas localizadas com actina nos sulco de clivagem e com microtúbulos nas regiões centrais e medianas do fuso (65, 66, 67). Alterações da expressão desta proteína resultam em células binucleares. A proteína SEPT 2 está associada ao aumento do sulco de clivagem no fuso central das células durante a citocinese.

Estudos de mutações nesses organismos têm mostrado que deleções em septinas resultam em menos cromossomos da metáfase, falta de segregação de cromossomos, crescimento do fuso e citocinese incompleta ao sair no processo mitótico.

Esses dados sugerem que as septinas podem formar um esqueleto no processo mitótico que coordena vários passos-chave para a divisão (68). A proteína SEPT 7 pode se ligar diretamente à CENP-E (kinesinas-7) e estabilizar o cinetócoro. Em células onde essa proteína foi suprimida, a tensão no cinetócoro do cromossomo biorientado foi reduzida e o ponto de checagem do fuso mitótico ativado (69).

As septinas também interagem com os filamentos de miosina II não muscular. A SEPT 2 se liga diretamente a estes filamentos ativando-os na intérfase nas células em divisão. A inibição da interação miosina II-SEPT2 durante esse processo celular causa instabilidade no sulco de clivagem (70).

Em células de mamíferos, danos do DNA foram associados a rearranjos de septinas e actina (70). Verificou-se que o recombinante SEPT2-SEPT6-SEPT7 pode ligar-se diretamente à proteína 4 associada a microtúbulos (MAP4) (71). Essa interação pode inibir a ligação do MAP4 aos microtúbulos e reduzir a instabilidade dessas estruturas. Entretanto, perda de septinas provoca aumento da disponibilidade de MAP4, que causa estabilização inapropriada dos microtúbulos do citoesqueleto (72).

Também tem sido descrito que a SEPT 2 regula a eficiência da vesícula de transporte. Essa proteína associa-se à tubulina facilitando o transporte das vesículas, impedindo a ligação da tubulina ao MAP4 (73).

Filamentos de septinas foram relatados interagindo *in vivo* com actina (65, 50, 74) e tubulina (63, 68, 67,72). A primeira indicação de que septinas podem interagir com microtúbulos foi observada em septinas Pnut, Sept 1 e Sept 2 de drosófilas ligando os microtúbulos *in vitro*. (75).

Em células pós-mitóticas, as septinas de mamíferos estão envolvidas na via secretora, guiando as vesículas ao ponto de exocitose (76). Foi também constatado que a SEPT 3 e a SEPT 5 são altamente expressas nos neurônios. A SEPT 3 é especialmente abundante nos sinaptossomos e nos extratos de membrana periféricas e está envolvida na reciclagem da vesícula sináptica (77, 78).

Septinas humanas podem funcionar como uma possível barreira de difusão nas células neurais (79, 80). Tem sido verificada que essas proteínas encontram-se na base e nas ramificações dendríticas. Tais estudos indicam que essas moléculas podem ser um importante regulador para o crescimento e morfologia dessas estruturas (figura 1.10) (79, 80).

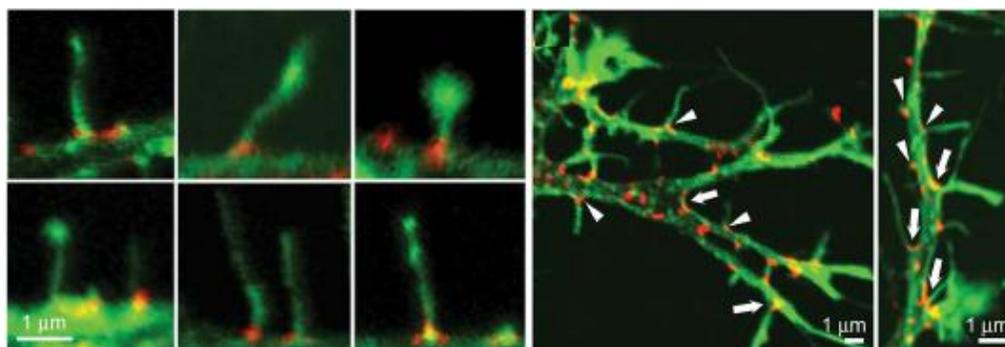


Figura 1.10 – Cultura de neurônios hipocampal (DIV) foi fixada e imunocorada para a septina 7. Imagens de alta ampliação mostrando a localização das septinas 7 na base das saliências individuais (setas em vermelho). Figura adaptada da referência (60).

Enfim, as principais funções das septinas em mamíferos estão associadas às estruturas filamentosas formadas por essas proteínas por toda a célula durante a intérfase. Esses filamentos alinham-se ao longo das fibras de actina e de microtúbulos e são dissipados durante a mitose e que estão associados ao processo de telófase (65, 67, 32).

1.8. Atividade GTPase

Estudos de septinas indicam que essas moléculas ligam e hidrolisam GTP (84). Muitas linhas de evidências sugerem que a ligação ao nucleotídeo de guanina por essas proteínas é necessária para sua polimerização. Entretanto, a baixa troca de nucleotídeos e hidrólise *in vitro* têm conduzido a questões sobre a real importância da atividade GTPase.

Dados do trabalho de Pan 2007 (34) mostraram a importância da ligação do nucleotídeo para a função das septinas. Esses resultados indicam que o motivo GTPase G1 (forma o loop que interage com grupo fosfato do nucleotídeo) e o motivo G4 (que é importante para a especificidade da ligação GTP) são altamente conservados, com uma região de consenso de 95% entre essas proteínas. Em contraste com o motivo G3 que liga íon Mg^{2+} e apresenta consenso de 83%.

Tem sido também demonstrado que a hidrólise GTP influencia a arquitetura do complexo, direcionando moléculas efetoras em um determinado padrão espacial. Assim, a ligação GTP apresenta uma função estrutural ao invés de um papel na biologia da septina (87).

Em muitas septinas de levedura e de animais tem sido demonstrada sua ligação e hidrólise de GTP, exceto para as proteínas de leveduras Cdc3 e Cdc11, e Sept2 de drosófila (81, 82, 83, 84). Recentemente, estudos mostram que todas as septinas (Cdc10p, Cdc11p e Cdc3p Cdc12p) necessárias à formação do anel que auxilia o processo de divisão celular em levedura estão ligadas à GTP (71).

Em muitos organismos, mutações em resíduos de septina que contribuem para a ligação ao nucleotídeo podem afetar a formação, estrutura, forma, localização e função dos filamentos de septinas (65, 4, 86). Mutações no motivo G4 e no P-loop nestas proteínas afetam a ligação do nucleotídeo e resultam em defeitos de função e localização nessa proteína.

A ligação do nucleotídeo às Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p e Cdc12p é importante para a interação septina – septina e formação do complexo (71). Na ausência do complexo inteiro, essas proteínas não se estabelecem no córtex, sugerindo que fatores de localização de septinas interagem apenas com a forma completa. Entretanto, não há evidências que demonstrem que a ligação do nucleotídeo esteja especificamente envolvida na interação de proteínas com esses complexos.

A ligação de GTP também foi observada nos filamentos de cristais que formam o complexo SEPT2–SEPT6–SEPT7. Tem sido demonstrado que os polímeros de septinas de mamíferos têm pouca ou nenhuma atividade GTPase em *in vitro* (50, 83).

Muito progresso tem sido atingido na elucidação das septinas e de sua estrutura. Estudos de microscopia eletrônica têm revelado a ordem das subunidades no complexo de septinas em *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos envolvendo essa técnica e a cristalografia têm determinado a ordem das septinas nos filamentos formados em células humanas.

Recentes trabalhos sobre septinas humanas vêm sendo feitos para elucidar os diversos processos fisiológicos e patológicos que essas moléculas estão relacionadas como: tráfego de vesículas, apoptose, remodelamento de citoesqueleto, infecção, neurodegeneração e neoplasias. As informações a respeito da estrutura e da atividade GTPase das septinas investigadas nesse trabalho irão acrescentar novas informações à literatura sobre os processos acima citados, auxiliando, portanto, na elucidação dos mecanismos moleculares que essas proteínas estão envolvidas.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Septinas constituem uma importante família de proteínas envolvidas em vários processos celulares essenciais, tais como: citocinese, ciclo celular, formação de barreiras de difusão, alinhamento de fuso e exocitose, mas também estão associadas a tumores de mama, ovário, cérebro e outros. Os mecanismos moleculares e bioquímicos pelos quais essas moléculas em mamíferos exercem suas funções são pouco conhecidos.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para compreender os diversos processos fisiológicos e patológicos em que as septinas estão relacionadas como: atividade GTPase, formação de filamentos e associação com membranas, tráfego de vesículas, apoptose, remodelamento de citoesqueleto, infecção, neurodegeneração e neoplasias. Em nosso grupo, uma iniciativa coordenada pelo Prof. Dr. Richard C. Garratt se dedica ao estudo bioquímico e estrutural das proteínas dessa família. Este esforço recebeu o nome de “Septinoma”.

Dentro da proposta do “Septinoma” este trabalho tem como objetivo obter informações estruturais e bioquímicas da septina 7 humana (SEPT 7) e de seu domínio GTPase (SEPT 7G), mas também dos domínios da septina 9 humana, domínios GTPase e C-terminal (SEPT 9GC) e GTPase apenas (SEPT 9G) (Figura 1.3), a fim de auxiliar na elucidação da função biológica destas proteínas, pois a estrutura molecular e a formação de filamentos destas moléculas estão intimamente relacionadas aos processos bioquímicos nos quais estão envolvidas.

As informações a respeito da estrutura e da atividade GTPase das septinas estudadas nesse trabalho de doutorado irão acrescentar informações na literatura sobre os processos acima citados. Este projeto está vinculado a uma linha de foco do CEPID do Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME) realizado em conjunto com outros laboratórios.

2.1 Objetivos específicos deste trabalho

Considerando todos os pontos abordados, os objetivos específicos foram:

I. Clonar e subclonar a septina 7 humana (SEPT 7) e o seu domínio GTPase (SEPT 7G) e os domínios da septina 9 humana (SEPT 9GC e SEPT 9G);

- II. Expressar todas as construções (SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G) e purificar o produto recombinante;
- III. Realizar os estudos da estabilidade estrutural das septinas por meio de espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, em função de diferentes condições físico-químicas;
- IV. Determinar a existência de atividade GTPase das septinas estudadas;
- V. Analisar a tendência dos recombinantes à formação de agregados amorfos e/ou amiloides através da utilização da sonda fluorescente ThT;
- VI. Realizar ensaios de cristalização para obtenção de cristais da septina humana e subsequente determinação de sua estrutura tridimensional;
- VII. Realizar modelagem molecular na estrutura tridimensional obtida.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construções do DNA Recombinante

3.1.1 Amplificação do fragmento de DNA da septina 7 humana (SEPT 7) e do seu domínio GTPase (SEPT 7G)

Para obter os fragmentos de DNA codificante da septina 7 humana (SEPT 7) de 1200 bp e do seu domínio GTPase (SEPT 7G) de 800 bp foram construídos oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers) – com base na sequência depositada no GenBank com o número de acesso NM 001788 – mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Oligonucleotídeos sintetizados para as ampliações das SEPT 7 e SEPT 7G. A tabela mostra os sentidos de cada primer e seus respectivos sítios para a enzima de restrição destacados em vermelho.

Oligonucleotídeos	
SEPT 7	<i>Forward (NdeI) 5' CGCATATGGTAGCTCAACAGAAGAACCTTGAAGGC-3'</i> <i>Reverse (XhoI) 5'-CCCTCGAGTAAAAGATCTTCCCTTTCTTCTTGTTCCTTTTC-3'</i>
SEPT 7G	<i>Forward (NdeI) 5'-CCCATATGGGTTTTGAATTCACGCTTATGGTAGTGGG-3'</i> <i>Reverse (XhoI) 5'-CCCTCGAGTCATTAAGTCACAGCTGCAAGTTTTCTGCTTC-3'</i>
SEPT 9G	<i>Forward (NdeI) 5'-CCCATATGGGCTTCGAGTTCAACATCATGGTGGTTCG-3'</i> <i>Reverse (XhoI) 5'-CCCTCGAGTCATTACTACATCTCCGGGGCTTCTGGC-3'</i>
SEPT 9GC	<i>Forward (NdeI) 5'-CCCATATGGGCTTCGAGTTCAACATCATGGTGGTTCG-3'</i> <i>Reverse (XhoI) 5'CCCTCGAGTCATTAGCCCTCGTTGAGGCGCTTCACACGG-3'</i>

Em todos os oligonucleotídeos *Forward* foram introduzidos os sítios de restrição para a endonuclease *NdeI* e para os *Reverse* foram adicionados os sítios para a *XhoI*.

Os fragmentos de DNA da SEPT 7 e de seu domínio GTPase foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano por meio da reação mostrada na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Reações de amplificação para a PCR das SEPT 7 e SEPT 7G. A tabela mostra os reagentes e as suas respectivas quantidades utilizadas.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Tampão PCR 10X (High Fidelity) + MgCl ₂	1X
Oligonucleotídeo forward	50 pmol
Oligonucleotídeo reverse	50 pmol
dNTPs	2 mM
DNA molde	100ng
Taq DNA polimerase (High Fidelity)	1,0 U
H ₂ O	X*
	Volume final= 50 µL

*Quantidade suficiente para completar o volume final

Para essa reação de PCR utilizou-se o termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer), com as condições de temperatura e tempo mostrada da tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Ciclo de PCR para amplificação do DNA SEPT 7 e de SEPT 7G. O ciclo foi o mesmo para ambas as amostras, com alteração apenas da temperatura de anelamento mostrada em destaque.

Ciclo	1X	35X			1X
T°C (SEPT 7)	94	94	58	68	68
T°C (SEPT 7G)	94	94	62	68	68
Tempo	2 min.	1min.	30s	1min.	7min.

Os produtos gênicos do PCR após a amplificação foram monitorados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) sob iluminação UV. Os fragmentos amplificados foram purificados por meio do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

3.1.2 Amplificação dos fragmentos de DNA da septina 9 humana (SEPT 9GC) e o do seu domínio GTPase (SEPT 9G)

Para amplificação do fragmento da septina 9 humana (SEPT 9GC) de 2460 bp – domínio GTPase acrescida do C-terminal – e do fragmento desta mesma molécula contendo apenas seu domínio GTPase (SEPT 9G) de 1440 bp foram construídos oligonucleotídeos iniciadores específicos mostrados na tabela 3.1. Os primers sintetizados foram baseados na sequência depositada no GenBank com o número de acesso NM 001788.

Os fragmentos gênicos da SEPT 9GC e SEPT 9G foram amplificados a partir do cDNA de cérebro fetal humano no termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer). Os ciclos de amplificação são mostrados na tabela 3.4.

A reação de amplificação e o método de visualização foram os mesmos usados nas amostras da SEPT 7.

Tabela 3.4 – Ciclo de PCR da região que codifica os fragmentos de DNA SEPT 9GC e de SEPT 9G. O ciclo foi o mesmo para ambas as amostras, com a alteração da temperatura de anelamento mostrada em destaque.

Ciclo	1X	35X			1X
T ⁰ C (SEPT 9GC)	94	94	60	68	68
T ⁰ C (SEPT 9G)	94	94	62	68	68
Tempo	2 min.	1min.	30s	1min.	7min.

3.1.3 Adição da cauda poli (A)

Para poder usar o plasmídeo pGEM-T na clonagem, todos os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma reação de poliadenilação: adição de uma cauda poliadenina que permite uma aderência a esse vetor de propagação.

Para essa reação foram adicionados: 5,0 µl do produto da reação de polimerização em cadeia; 1,0 µl de dATP em uma concentração de 10 mM; 1,0 µl de MgCl₂ em uma concentração de 50 mM e a enzima Taq DNA polimerase (0,3 µl) e seu tampão 1,0 µl (New England BioLabs). Em seguida, adicionou-se 1,0 µl de água autoclavada para completar o volume final de 10 µl.

Essa reação foi incubada por 15 minutos mantendo uma temperatura constante de 70°C no termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer).

3.1.4 Preparo dos vetores de propagação

Para clonagem de todos os produtos gênicos amplificados e poliadenilados foram utilizados o vetor de propagação pGEM-T easy (Promega), que permite sua ligação direta (“clonagem T-A”) aos produtos de PCR, facilitando a reação de ligação.

Para essa reação foram utilizados 3,0 µl da amostra poliadenilada; 1,0 µl do vetor; 1,0 µl da enzima T4 DNA-ligase e 5,0 µl do seu tampão (Rapid Ligation Buffer 2x). Em seguida, a incubação foi realizada durante a noite (*overnight*) a 4°C.

3.1.5 Transformação de células competentes

Os recombinantes resultantes da reação de ligação dos fragmentos da SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G ao vetor de propagação (pGEM-T easy) foram transformados em *E. coli* DH5α competente por tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂).

Para a reação de transformação, 100 µL de suspensão bacteriana foram adicionados à reação de ligação e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi submetida à incubação em banho-maria a 42 °C por um período de 2 minutos e banho de gelo (choque térmico). Cerca de 1 mL do meio LB (Luria-Bertani) líquido foi adicionado à mistura que foi incubada durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 60 segundos e o sedimento foi ressuspendido em 100 µL de LB líquido.

A mistura foi plaqueada em meio seletivo (Agar LB suplementado com canamicina 100 µg/mL) e incubada a 37 °C por 24 horas. O controle foi realizado utilizando X-Gal, uma vez que o vetor pGEM-T easy possui uma região codificante da proteína β-galactosidase que utiliza esse substrato resultando em uma substância que deixa a colônia azulada, caso o fragmento de DNA não tenha sido inserido no vetor.

As colônias positivas foram pré-inoculadas em meio LB seletivo, após atingirem DO₆₀₀ de 0,6 (Densidade Óptica no comprimento de onda 600nm). Essas amostras foram armazenadas em solução 10% de glicerol a uma temperatura de -80°C.

3.1.6 Extração e clivagem dos DNAs plasmidiais

Amostras de *E. coli* transformadas com os plasmídeos pGEM-T são inoculadas em meio LB seletivo. Após o meio atingir DO₆₀₀ de 0,6, a cultura é submetida a uma reação de clivagem e extração dos DNAs plasmidiais. Para esse procedimento, foi utilizado o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

A eficiência da clonagem e extração do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio em tampão TAE [1X] (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA, pH 8,0).

Em seguida, as amostras foram purificadas com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante e desidratadas no SpeedVac.

3.1.7 Subclonagem no vetor de expressão pET-TEV

O sistema de vetores pET foi escolhido porque apresenta características que otimizam a expressão e a purificação tais como: marcadores seletivos de resistência a antibióticos, origem de replicação, sítio de clonagem múltipla e diferentes sequências adjacentes que codificam uma variedade de peptídeos acessórios que podem ser usados na detecção da proteína alvo.

Esses plasmídeos foram construídos para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresentam alto grau de eficiência. Os genes recombinantes formados pelos plasmídeos do sistema pET são fortemente regulados por sinas de transcrição do fago T7. Portanto, a enzima T7 controla a expressão proteica nesses clones.

O vetor pET-TV expressa a proteína alvo com uma cauda N-terminal que possui seis resíduos de histidina (6xHis), possibilitando sua purificação em colunas cromatográficas contendo íons metálicos como Ni_2^+ ou Co_2^+ .

Para a subclonagem no vetor de expressão, o DNA recombinante da SEPT 7, SETP 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G no vetor pGEM-T foi submetido à reação de digestão com as endonucleases NdeI e XhoI (New England BioLabs) em tampão de digestão 1X mais 1ug de BSA.

As amostras foram incubadas a 37°C por 4 horas, após esse período foram purificadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo utilizando o kit Winzar SV gel PCR Clean-UP System (Promega).

Os fragmentos purificados e digeridos foram quantificados para proceder à ligação com o vetor de expressão. Para esse procedimento utilizou-se o vetor de pET-TEV que foi linearizado por meio da clivagem com mesmas enzimas de restrição a 37°C por 6 horas.

Após a digestão, as enzimas de restrição foram desnaturadas pelo calor e o DNA foi precipitado com etanol absoluto, seguido de duas lavagens com etanol 70%. O DNA foi desidratado a vácuo e dissolvido em 30 μ L de H₂O mili-Q autoclavada.

Os DNAs recombinantes pET-TVSEPT 7, pET-TVSEPT 7G, pET-TVSEPT 9GC e pET-TVSEPT 9G foram obtidos a partir da reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Para essa reação utilizou-se 1ul de T4 [1U], 150 ng dos fragmentos de interesse, 50 ng do DNA plasmidial linearizado, tampão de ligação com concentração final de 1x e água Mili-Q com volume final de 10 ul.

As amostras foram incubadas a 4°C por 12 horas. Após esse período, foi realizado o processo de transformação em células de *E. coli* BL-21 (DE3) por tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂). O método de transformação foi o mesmo usado nas células de *E. coli* DH5 α .

3.1.8 Análises dos plasmídeos recombinantes (pET TV)

Para a análise dos possíveis clones foi elaborado um protocolo de isolamento de DNA plasmidial em que é possível analisar rapidamente um grande número de colônias sem a necessidade de digestão com enzimas de restrição. Neste caso, a presença do gene no vetor é identificada pela migração mais lenta no gel de agarose do plasmídeo recombinante em relação ao plasmídeo sem inserto (controle negativo).

Após a extração e clivagem dos DNAs plasmidiais por meio do mesmo método descrito anteriormente, as amostras são submetidas à eletroforese. Os perfis eletroforéticos das amostras foram visualizados após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Depois de uma análise inicial em gel de agarose, os prováveis clones foram selecionados e analisados para a presença do seu fragmento de DNA por meio da digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, utilizando 1,0 µl de ambas juntamente com 4,0 µl do tampão e 30 µl do DNA e o volume foi completado para 40 µl com água autoclavada, deixando incubar 3 horas a 37°C.

As amostras que validaram a construção do recombinante (pET-TVSEPT 7, pET-TVSEPT 7G, pET-TVSEPT 9GC e pET-TVSEPT 9G) foram submetidos a sequenciamento para confirmar a matriz de leitura das proteínas de interesse. Após essa etapa as amostras positivas foram armazenadas em meio LB seletivo contendo 10% de glicerol a temperatura de -80°C.

3.2 Expressão da proteína recombinante

3.2.1 Indução da proteína recombinante SEPT 7 e SEPT 7G

Alíquotas de amostras contendo o recombinante pET-TVSEPT 7 e pET-TVSEPT 7G foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo canamicina 30 µg/mL. Estas culturas foram incubadas a 37°C overnight sob constante agitação (250 rpm).

O volume correspondente a 1,0 mL destas culturas foi transferido para 3 L do mesmo meio de cultura seletivo. Após um período de 5 horas de incubação a 37°C sob constante agitação ($DO_{600} = 0,7$), as células foram incubadas a 18°C sob agitação constante por 30 minutos. Em seguida, o indutor IPTG (isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo) foi adicionado à cultura em concentração final de 0,1 mM e a incubação prosseguiu por mais 18 horas nas mesmas condições para promover a expressão.

Após o período de indução, foi obtido o extrato bruto centrifugando as amostras induzidas por 15 minutos a 6000 rpm e 4°C. Após a precipitação, ressuspenderam-se as células com 80 ml do tampão de lise Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e 100 μ M de GDP (guanina di-fosfato) e se iniciou o processo de lise celular com a utilização de lisozima, que age sob a parede celular da bactéria desestruturando-a, com uma concentração final de 0,416 mg/ml, seguida de incubação em gelo por 30 minutos.

O processo de lise continuou com pulsos de ultrassom (sonicação) para romper definitivamente as células. Essa etapa foi realizada em ciclos de 20 segundos durante 16 minutos e posterior centrifugação por 30 minutos em 12500 rpm a 4°C. Após a separação das amostras o sobrenadante foi separado do precipitado formado.

Alíquotas dos extratos brutos obtidos foram desnaturadas por aquecimento a 96°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). A migração no gel foi monitorada com uso de marcador de massa molecular (BenchMark, Invitrogen). Os marcadores utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e citocromo c (12,4 kDa).

3.2.2 Indução da proteína recombinante SEPT 9G e SEPT 9GC

As colônias selecionadas contendo o recombinante pET-TVSEPT 9GC e pET-TVSEPT 9G foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo canamicina 30 μ g/mL. Estas culturas foram incubadas a 37°C overnight sob constante agitação (250 rpm).

Após esse período de pré-inoculo 1,0 mL das culturas foi transferido para 3 L do meio LB seletivo. Quando a cultura atingiu $DO_{600} = 0,7$, as células foram incubadas a 18°C sob agitação constante por 30 minutos para estabelecer o equilíbrio antes da indução. A cultura foi então induzida com concentração final de 0,2 mM de IPTG e novamente incubada nas mesmas condições de temperatura por 18 horas.

Em seguida, os 3 L de cultura foram centrifugados por 15 minutos a 6000 rpm e 4°C , para obter o extrato bruto. Após a precipitação a amostra foi suspensa novamente em 80ml do tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e $100\mu\text{M}$ de GDP (guanina difosfato) e se iniciou o processo de lise celular com a utilização de lisozima a uma concentração final de 0,416 mg/ml seguida de incubação em gelo por 30 minutos.

Para otimizar o processo de lise as amostras foram submetidas ao ultrassom com pulsos de 20 segundos durante 16 minutos e posterior centrifugação por 30 minutos em 12500 rpm a 4°C .

Para avaliar a expressão proteica, alíquotas do extrato bruto foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) (Sambrook e Russel, 2001). A corrida foi acompanhada com os mesmos marcadores de massa molecular citados anteriormente.

3.3 Purificações da proteína

3.3.1 Precipitação

Inúmeros testes de purificação demonstraram que precipitação salina (salting out) do extrato bruto apresenta melhor rendimento para a proteína SEPT 7. Assim, a amostra foi submetida à precipitação pela adição de sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ em diferentes concentrações e, após refinamento das condições, a solução 10% salina foi a que apresentou melhor resultado.

O sulfato de amônio promove maior interação proteína-proteína, diminuição da solubilidade em meio aquoso e, conseqüentemente, precipitação da proteína. A esse fenômeno de insolubilização da proteína em decorrência de um considerável aumento da força iônica do meio dá-se o nome de "salting-out".

Cada proteína apresenta a concentração salina ótima para precipitar, assim após determinar a concentração adequada para a precipitação da molécula de interesse, foi possível realizar a purificação da amostra que estava solubilizada à solução proteica total.

A molécula precipitada no sulfato de amônio foi ressuspensa no tampão (Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e 100 μ M de GDP), obtendo-se assim, a proteína em solução de forma parcialmente pura. O próximo passo de purificação foi por meio de cromatografia de exclusão molecular.

Todas as etapas da reação de precipitação foram realizadas com controle térmico a 10°C e monitoradas pela eletroforese SDS – PAGE como descrito anteriormente.

3.3.2 Cromatografia de afinidade

Para o domínio GTPase da proteína septina 7 humana (SEPT 7G), os testes de purificação mostraram que o primeiro passo de purificação que apresenta melhor rendimento da molécula foi a cromatografia de afinidade.

Assim, ao extrato bruto resultante do processo de lise, foi adicionada uma concentração final de 800 mM de cloreto de sódio (NaCl), método adaptado do artigo descrito da literatura (46). Essa amostra foi submetida à cromatografia de afinidade, com uma coluna contendo 3,0 ml de resina de íons cobalto (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão utilizado na lise celular.

As amostras, aplicadas na coluna de cobalto, são primeiramente centrifugadas a 6000 rpm para remover precipitados de proteínas. A solução das proteínas totais é eluída na coluna e a macromolécula de interesse interage fortemente com sua matriz ligante ficando retida nesta. As demais moléculas não ligam ou interagem fracamente com a coluna, sendo removidas por lavagem subsequentes.

Para a lavagem da coluna foram utilizadas soluções em gradiente crescente do tampão de ressuspensão e imidazol (molécula que compete pelos íons cobalto com a cauda poli-histidina) nas concentrações de 5 mM, 10 mM e 20 mM. O volume de lavagem de cada tampão corresponde a 5 vezes mais o utilizado na resina.

A eluição da proteína SEPT 7G ocorre à concentração de 100mM de imidazol no tampão e um volume de 2 vezes o utilizado de resina. Foram realizadas lavagens posteriores com concentrações de 250 mM e 300 mM para a limpeza da resina. Todas as etapas cromatográficas ocorreram com controle térmico a 10°C e alíquotas de todas as frações eluídas foram preparadas para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%).

3.3.3 Cromatografia de exclusão molecular

Cromatografia de exclusão molecular, conhecida também como filtração em gel, efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. É composta em sua fase estacionária por um polímero com poros de tamanho variado.

A velocidade de deslocamento das moléculas pequenas é menor, pois estas precisam passar através desses poros. No entanto, as moléculas grandes apresentam uma maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, eluindo mais rapidamente o que possibilita a separação dos componentes de acordo com o peso molecular.

Alíquotas de 1 mL de amostras eluídas no processo de cromatografia de afinidade foram purificadas por meio de uma coluna Superdex 200 (16/60cm) acoplada a um sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare), com o controle térmico a 10°C.

Após equilibrar a coluna com 120 ml do tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e 800 mM de cloreto de sódio, a solução proteica foi injetada pelo sistema ÄKTA. A eluição da proteína foi realizada com o dobro do volume da coluna, sob um fluxo de 1,0 ml/min. com o mesmo tampão, monitorada pela absorvância com comprimento de onda em 280 nm.

A coluna foi calibrada com padrões BSA (albumina de soro bovino), 66 kDa, ACB (anidrase carbônica bovina), 29 kDa e CitC (citocromo C), 12,4 kDa, usando o mesmo tampão de eluição.

Os picos de maior absorvância foram coletados e concentrados por dialofiltração usando Centriprep 3 (Amicon) a uma concentração de 8 mg/ml. Amostras destas moléculas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e eletroforese gel nativa antes de prosseguir com os estudos espectroscópicos.

3.3.4 Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que as moléculas com cargas de sinais contrários a estas são seletivamente adsorvidas da fase móvel.

As proteínas adsorvidas são subsequentemente eluídas por deslocamento com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

Após a precipitação salina, a amostra da SEPT7 foi ressuspendida, dializada e submetida à cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna DEAE Sepharose acoplada ao sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare), com controle térmico a 10°C.

A coluna foi equilibrada com 120 ml do tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 20% de glicerol, antes de o sistema injetar a amostra. Para a eluição da proteína foi usado método de “steeps” com gradiente de cloreto de sódio. O pico de maior absorvância da molécula de interesse foi observado com cerca de 750 mM de cloreto de sódio.

Alíquotas das amostras eluídas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e eletroforese gel nativa, antes de prosseguir com os estudos espectroscópicos.

3.3.5 Purificação das proteínas SEPT9G e SEPT 9GC

O primeiro passo para a purificação da septinas 9 humana foi por meio de cromatografia de afinidade, usando uma coluna de cobalto com 2ml (Qiagen), pois a molécula recombinante SEPT 9G foi produzida como proteína de fusão a um hexapeptídeo de histidina na porção N-terminal, que apresenta afinidade pelo íons metálicos.

A coluna foi equilibrada com 10 vezes o seu volume do tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol, aplicando, em seguida, a fração solúvel do extrato celular contendo a SEPT 9G. A proteína de interesse interage fortemente com a matriz ligante ficando retida nesta. As demais moléculas não ligam ou interagem fracamente com a matriz, sendo removidas por lavagem subsequentes.

A coluna foi então lavada com 10, 5, 3 vezes o seu volume com o mesmo tampão usado para equilibrar-la contendo 5 mM, 10 mM e 20mM imidazol respectivamente para retirar contaminantes ligados com baixa afinidade. Após retirar os contaminantes, a proteína de interesse foi eluída em 300 mM de imidazol.

O eluato da etapa anterior foi concentrado e aplicado numa coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 (Amersham-Pharmacia), previamente equilibrada com o Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5%. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, monitorado pela absorbância em 280 nm e o material eluído foi coletado em frações de 1 mL. Alíquotas da amostra foram retiradas e então submetidas à SDS-PAGE 15% antes de prosseguir com os estudos espectroscópicos

3.4 Técnicas espectroscópicas

3.4.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) antes de iniciar os estudos de cristalização de macromoléculas. Esse método permitiu avaliar o grau de dispersão da proteína em solução.

Macromoléculas que são monodispersas e homogêneas em solução – possuem apenas moléculas do mesmo tamanho – cristalizam com maior facilidade, enquanto agregados aleatórios ou sistemas polidispersos dificilmente cristalizam. Portanto, torna-se importante avaliar o grau de dispersão das moléculas.

Para as análises de espalhamento de luz foram utilizados cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medidas foram realizadas em um fluorímetro K2 ISS equipado com um sistema de controle de temperatura. O comprimento de onda incidido nas amostras foi de $\lambda = 350$ nm, e a variação da intensidade espalhada foi coletado num ângulo de 90° . As análises de DLS foram realizadas em um equipamento DynaPro Molecular Sizing instrument (DYNAMICS versão 5, Proteins Solutions, Inc.).

As medidas foram realizadas em diferentes temperaturas para avaliar a estabilidade das proteínas. Em todas as análises a concentração da amostra utilizada foi de aproximadamente 1,0 mg/mL.

3.4.2 Ensaio de cristalização das SEPT 7G e SEPT 7

Por meio da difração de raio X é possível obter a estrutura tridimensional de proteínas, em alta resolução. Tal análise estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos.

A formação de cristais de proteínas é um dos passos mais críticos da resolução da estrutura tridimensional das moléculas. Isso ocorre porque a cristalização de uma determinada proteína é um processo que envolve inúmeras etapas.

Os estudos das proteínas através da difração de raios X dependem, necessariamente, da obtenção de monocristais que apresentem um padrão de difração adequado. Para conseguir essa amostra é necessário a realização de teste de varredura alternando as condições de temperatura, pH e soluções químicas, entre outros parâmetros.

A homogeneidade estrutural e pureza química são requerimentos indispensáveis para a formação do cristal, além do que a energia associada a esse arranjo deve ser menor do que aquela associada ao estado amorfo.

A cristalização de proteínas envolve três etapas clássicas: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. Os cristais de macromoléculas são estabilizados por inúmeras interações tais como: ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações de van der Waals e interações entre dipolos nas regiões de contato.

O método mais utilizado para os estudos de cristalização é a difusão de vapor pela gota suspensa. Nessa técnica, à proporção que o volume da gota diminui, aumenta a concentração da proteína e do agente precipitante. O estado cristalino é obtido quando a concentração da proteína em solução é maior do que seu limite de solubilidade, ou seja, a proteína se encontra no estado de supersaturação, que pode levar à formação dos primeiros núcleos cristalinos.

Os experimentos foram realizados em caixas de cristalização contendo cada uma 28 câmaras de troca de vapor e em ambientes isolados com temperatura constante de 18°C. Para os primeiros testes foram utilizados os fatoriais Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research) .

Em ensaios de cristalização, uma pequena gota de 1,0 µL de proteína é montada sobre uma lamínula siliconizada. O mesmo volume de solução do agente precipitante é adicionado a essa amostra que é colocada num recipiente vedado contendo 500 µL da mesma solução.

Depois de montadas, as câmaras de troca de vapor foram deixadas em repouso e, sempre depois de transcorridos dez dias, eram analisadas. Após os resultados iniciais, a condição que apresentou o melhor resultado foi refinada em diferentes outras condições de cristalização com pequenas alterações.

3.4.3 Coleta de dados de difração de raios X

Nas câmaras de troca de vapor que apresentaram estruturas cristalinas, um monocristal foi selecionado utilizando um loop de nylon. Esse foi transferido para uma solução criogênica contendo 5% de etileno glicol; 28% de PEG 6000 e 100 mM Hepes pH 7,6 e congelado em nitrogênio líquido a 100K para evitar danos causados pela radiação.

Os dados de difração foram coletados primeiramente no Instituto de Física da USP/São Carlos, por meio de um gerador de ânodo rotatório com placa de imagem Mar345dtb acoplada ao gerador de ânodo rotatório Rigaku Ultra X18, equipado com ânodo de cobre e espelho de focalização Blue Confocal.

Outras coletas de dados foram realizadas na estação MX02 de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas. Os dados foram processados com o pacote de programas HKL e MOSFLM.

O método de substituição molecular foi empregado para resolução da estrutura cristalográfica, usando os programas AMORE/MOLREP e as coordenadas atômicas disponíveis no PDB. O refinamento estrutural do modelo gerado foi obtido com a utilização de programas REFMAC e CNS e com o programa X foi realizado os ajustes manuais da densidade eletrônica.

As análises estereoquímicas foram feitas com o programa PROCHECK que demonstra a qualidade do refinamento final. Por meio de sobreposições feitas com o programa WHATIF foi possível analisar as similaridades estruturais com outras estruturas. Para essa análise usou os carbonos alfa, e as imagens foram geradas utilizando o programa Pymol [Delano, 2002].

3.4.4 Dicroísmo circular (CD)

A análise dos espectros de CD do UV distante de proteínas, baseada em moléculas de referência que tenham conformação conhecida, permite estimar as frações de suas estruturas secundárias. Existem vários métodos empíricos para estas análises e todos estes partem de determinadas suposições.

Em geral, estes métodos assumem que as proteínas são combinações lineares de hélices- α , folhas- β , voltas- β e estruturas desordenadas. Os cálculos para as análises estruturais destas moléculas dependem da escolha das proteínas de referência em concordância com a proteína em estudo e dos tratamentos matemáticos utilizados para a desconvolução do espectro de CD. Os principais programas utilizados para este tratamento são: Selcon 3, Coltin e CDSSTR [Sreerama & Woody, 2000].

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas de 1 mm de caminho óptico. As amostras das proteínas utilizadas nestes experimentos estavam concentradas em 0,2mg/mL.

Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda de 195 a 250 nm, com uma média de 16 varreduras com resolução de 1nm. As contribuições dos tampões foram subtraídas dos seus respectivos espectros e os resultados foram expressos em elipticidade molar ($[\theta]$).

Os espectros de CD foram medidos em temperatura de 18°C, com o objetivo de se investigar o enovelamento da proteína. Os mesmos espectros foram utilizados para calcular as frações de estrutura secundária utilizando os programas Selcon 3, Coltin e CDSSR. As desconvoluções foram feitas utilizando uma base de dados com 48 proteínas.

Para analisar a estabilidade das proteínas sobre diferentes condições físico-químicas, os espectros de CD foram medidos com a amostra em diferentes temperaturas, variando de 10°C a 80°C, além de variações de concentração salina (indo de 10mM a 150mM de Guanidina) e variações de pH (entre 3,0 e 11,0).

3.4.5 Fluorescência Intrínseca

Espectroscopia de fluorescência é uma importante técnica analítica que envolve dois processos: absorção e emissão. Moléculas são excitadas por absorção de uma radiação eletromagnética e emitem luz em menor frequência do que a da luz incidente. Portanto, a fluorescência pode ser definida como a emissão que resulta do decaimento de um elétron do estado excitado singlete (S_1) para o estado singlete fundamental (S_0) [Laskowics, 1983].

A espectroscopia de fluorescência é muito utilizada no estudo de proteínas devido, principalmente, à presença de três fluoróforos naturais: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina.

A fluorescência é muito sensível ao ambiente ao redor do fluoróforo. Esta sensibilidade é causada pelo longo tempo em que a molécula permanece no seu estado excitado singlete até iniciar os processos de decaimento. Durante o tempo em que o estado permanece excitado, vários processos podem ocorrer. Estes processos podem alterar os parâmetros da espectroscopia de fluorescência tais como: máximo comprimento de onda de emissão (λ_{\max}), rendimento quântico (Φ_F) e tempo de vida do estado excitado (τ_0).

Espectroscopia de fluorescência é um dos mais versáteis e sensíveis métodos para estudos físicos de sistemas proteicos. Medidas de fluorescência nestes sistemas podem ser realizadas em condições diversas tais como: temperatura, viscosidade do solvente, constante dielétrica, associação com outras moléculas e pH.

As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro K2 (ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation – Illinois/USA) em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Amostras da SEPT 7 G em Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e 100 μ M GDP foram excitadas em 280 e 295nm e a emissão monitorada de 295 a 450nm e 305 a 450nm, respectivamente.

Medidas de emissão de fluorescência das amostras em tampões com diferentes pHs – na faixa de 2,0 a 11,0 – foram excitadas a 295nm e a emissão monitorada de 305 a 450nm. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas com as mesmas amostras utilizadas nas medidas de dicroísmo circular, porém, apropriadamente preparadas para esta técnica, isto é, foram diluídas ao redor de 0,1mg/mL.

Os espectros de fluorescência dos tampões foram subtraídos de cada amostra correspondente para minimizar o efeito de espalhamento Raman.

3.4.6 Experimento de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS) é uma poderosa ferramenta para análise de proteínas, pois permite obter informações estruturais da molécula em solução a partir de uma curva unidimensional de espalhamento. A técnica permite também estudos dinâmicos e possibilita observação das moléculas em condições fisiológicas.

Em uma solução ou dispersão coloidal submetida a um feixe de luz, parte da luz poderá ser absorvida, parte sofre espalhamento e o restante é transmitido através da solução. O tamanho e forma das partículas na solução, como também as interações entre as partículas e a diferença entre os índices de refração das partículas e do meio influenciam a intensidade, polarização e distribuição angular da luz espalhada por essa solução.

Portanto, as medidas de espalhamento de luz são de grande importância para determinar tamanho, forma e interações de partículas em solução.

Amostras do domínio GTPase da proteína septina 7 (SEPT 7G) com a concentração de 1,0 e 7,0 mg/mL foram preparadas em tampão Tris Hcl 25mM, pH 7,8, 5% Glicerol e 100 μ M GDP e submetidas a técnica de SAXS.

O experimento foi realizado na linha de SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1.488 \text{ \AA}$, detector unidimensional (1D) sensível à posição e distância amostra-detector de 1149.4 mm. Desta maneira, foi possível cobrir um momento de transferência entre $0.32 \text{ nm}^{-1} < q < 1.48 \text{ nm}^{-1}$ ($q=4\pi\text{sen}\theta/\lambda$, onde 2θ é o ângulo entre o feixe incidente e espalhado).

As curvas unidimensionais de espalhamento da solução de proteína e do tampão (mesma solução contendo todos os componentes, exceto a proteína), foram coletadas em 20 etapas de 100 segundos.

A análise sistemática dos dados foi realizada normalizando-os pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína e a diferença foi normalizada pela concentração proteica e pela resposta não homogênea do detector.

A função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o raio de giro R_g da amostra foi obtida por meio do programa GNOM que utiliza o método de Transformada Inversa de Fourier. O efeito de “*smearing*”, referente à altura de 8 mm da janela de entrada do detector, também foi corrigido utilizando o mesmo programa.

Por meio do programa Gasbor foi gerado um modelo de baixa resolução usando procedimento *ab initio*. O programa simula a estrutura interna da proteína, assim não é necessário subtrair o valor de intensidade da constante de Prod.

Com o mesmo programa foi construído um modelo de resíduos *dummy* com uma cadeia aleatória de Ca e enovelado de forma a minimizar a discrepância entre a $p(r)$ calculada do modelo e a $p(r)$ dos dados experimentais.

Os valores de R_g , D_{max} e a curva de espalhamento simulado das coordenadas atômicas da proteína resolvida através da cristalografia foram calculados utilizando o programa Crysol.

As discrepâncias entre o modelo cristalográfico e os dados experimentais foram calculadas também por este programa. O programa Supcomb foi usado para sobrepor o modelo *ab initio* de baixa resolução com a estrutura cristalográfica do modelo.

3.4.7 Espalhamento de luz a ângulo fixo

Para os estudos de espalhamento de luz a ângulo fixo, 5 μM dos recombinantes SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G foram centrifugados a 16,000 g por 10 minutos a 4°C. As medias foram realizadas em um espectrofluorímetro modelo K2 ISS, equipado com um circulador refrigerado, usando cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico.

As moléculas foram iluminadas com luz de comprimento de onda de 350 nm e a intensidade do espalhamento foi coletada no mesmo comprimento de onda, em um ângulo fixo de 90°.

Para avaliar a agregação das proteínas em função da temperatura as amostras foram incubadas em 15°C, 37°C, 45°C e 60°C. Todas as medidas de intensidade foram dadas em unidades arbitrárias após subtração da luz espalhada pelo tampão.

3.5 Testes de atividade biológica

3.5.1 Ensaio de hidrólise de GTP

Atividades de ligação e hidrólise do GTP têm sido demonstradas *in vitro* a partir de septinas recombinantes purificadas por diferentes métodos. Com o objetivo de validar a atividade da proteína recombinante, usando um método alternativo ao radioativo, foi usada uma técnica de desnaturação química.

O método baseia-se na liberação do nucleotídeo por desnaturação química com ácido perclórico. Tal procedimento foi modificado e aprimorado segundo o método proposto por Seckler e colaboradores (52).

Para isso, amostras das proteínas foram incubadas com ácido perclórico gelado (concentração final 0,5 M) por 10 minutos a 0°C, a proteína desnaturada foi removida por centrifugação por 10 minutos a 4°C por 14000xg. Uma alíquota do sobrenadante foi neutralizada com a adição de 1/6 do volume de 1 M K₂HPO₄, 0,5 M de ácido acético e 1/6 do volume de 3 M de KOH a 0°C.

Após essa etapa, ocorreu a formação de um precipitado e a amostra foi novamente centrifugada (10 min., 14000xg, 4°C) para a retirada deste. O sobrenadante foi removido e armazenado a 20°C por 1h. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente.

Em seguida, a amostra foi medida espectrofotometricamente ($\lambda = 254$ nm) e os nucleotídeos (GDP ou GTP) liberados foram determinados utilizando uma coluna de troca aniônica Protein Pak DEAE 5 PW (*Waters*) e analisados em um cromatógrafo Alliance 2695 (*Waters*). Para o controle foi usado GTP (10 μ M), GDP (10 μ M), uma mistura de GTP/GDP (10 μ M) e ácido perclórico (0,5 M).

3.6 Estudos Teóricos

3.6.1 Análise bioinformática

Com o objetivo de acrescentar informações estruturais e químicas das proteínas e confrontar os resultados teóricos com os experimentais, técnicas online de bioinformática foram utilizadas. Um conjunto de programas encontrados no Expasy (Expert Protein Analysis System, <http://ca.expasy.org>) foi usado para determinar o coeficiente de extinção molar e outras características da molécula como a massa e o ponto isoelétrico.

3.6.2 Modelagem por Homologia

A modelagem estrutural por homologia baseia-se no princípio que durante o processo evolutivo a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos. Assim, pequenas mudanças nesta seqüência provocam sutis modificações na estrutura tridimensional da molécula (99).

Durante o processo evolutivo, as estruturas tridimensionais das proteínas homólogas são conservadas, principalmente os resíduos funcionais, que são cruciais para desempenho na atividade proteica. Alterações estruturais nestas moléculas ocorrem em regiões próximas da superfície e em regiões sem função conservada. Logo, os resíduos dos domínios funcionais e as principais estruturas secundárias permanecem mais conservados em uma família de proteínas homólogas.

A modelagem estrutural por homologia foi realizada por meio do software modeller (95). Esse se utiliza de estruturas-molde para construir modelos tridimensionais da seqüência-alvo, baseado em alinhamentos de sequencia e estrutura.

O alinhamento sequencial múltiplo entre a seqüência alvo e as seqüências protéicas do modelo é o ponto inicial para esse programa (96). A partir desse alinhamento é gerado um conjunto de restrições – baseadas em análises estatísticas entre estruturas protéicas homólogas - que são aplicadas à seqüência a ser modelada.

As principais restrições envolvem a imposição no modelo de limites entre: a distância de dois resíduos, os ângulos de três átomos e de quatro átomos (ângulos diedrais). Além destas restrições, um campo de força controla as propriedades estereo-químicas entre os átomos, aplicando restrições químicas (97).

Todas as restrições químicas e espaciais aplicadas ao modelo são combinadas em uma função chamada de função objetivo, que é otimizada durante o processo de construção do modelo.

3.6.3 Validação dos modelos gerados

Foram feitas as validações dos modelos gerados por meio do programa procheck (98), pois é necessário identificar possíveis erros relacionados à escolha das estruturas de referência e ao alinhamento entre seqüência-alvo e o molde.

Nesta análise são avaliadas as qualidades dos modelos, principalmente se houver diferentes orientações referentes aos resíduos do sítio ligante. Os principais parâmetros verificados são: exatidão estereo-química, qualidade do empacotamento e confiabilidade do enovelamento. O programa gera um gráfico de Ramachandran, em que mostra as regiões mais favoráveis e as menos favoráveis (figura 3.1).

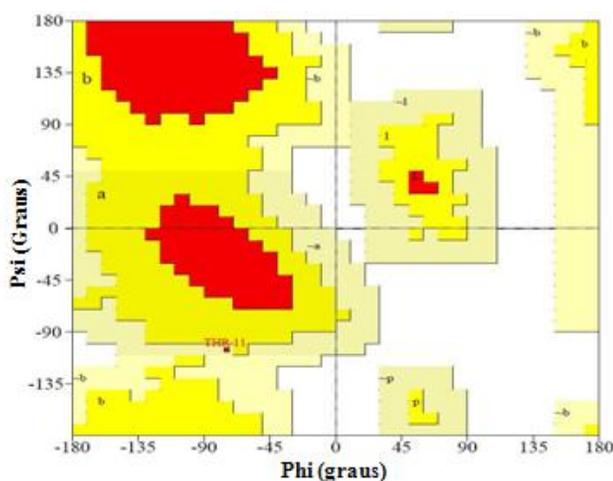


Figura 3.1 – Gráfico de Ramachandran gerado pelo Procheck. As regiões representadas em vermelho são as mais favoráveis, as representadas em amarelo, são as favoráveis, as representadas em bege, são as menos favoráveis e as regiões brancas, são as desfavoráveis.

As estruturas geradas pelos softwares de modelagem molecular são empregadas pelo programa procheck, e esse gera os diagramas de Ramachandran com as informações dos ângulos torcionais de cada resíduo.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dificuldade em trabalhar com as septinas para obter informações biofísicas e funcionais é expressa-las de forma solúvel, estável e biologicamente ativa em quantidade suficiente para estudos. Pois, essas moléculas têm baixa estabilidade e tendência em agregar-se. Essa limitação reflete na pouca informação estrutural descrita na literatura (38).

Portanto, o passo essencial para investigar a estrutura e a função das septinas é desenvolver um sistema de expressão, o qual produza uma proteína recombinante ativa de forma homogênea e em quantidades suficientes para realizar os ensaios.

Trabalhos anteriores (83, 32) descreveram que a SEPT 7 se expressa de forma insolúvel em sistemas bacterianos e eucariontes. Assim, para produzi-la de forma solúvel e estável é necessário co-expressar essa proteína com outras septinas.

Neste trabalho para obter um sistema de expressão eficiente em bactérias, inúmeros testes foram realizados em diferentes concentrações de indutores, alterando-se o tempo e a temperatura de indução.

O protocolo estabelecido para a proteína SEPT 7 do referido sistema mostrou que a molécula recombinante expressa-se de forma solúvel, homogênea e em quantidade suficiente para a caracterização biofísica e ensaios de cristalização. Entretanto, a estabilidade na molécula é baixa e se mantém estável por poucas horas – aproximadamente 48 horas –, após esse período a proteína começa a degradar.

Para a proteína SEPT 9G, o protocolo que foi determinado para expressão e purificação também foi eficiente, embora a proteína recombinante produzida e purificada tenha apresentado baixo rendimento, mas o suficiente para realizar as medidas espectroscópicas. Entretanto, não foi possível fazer testes de cristalização que requerem altas concentrações de proteína solúvel.

4.1 Amplificação e clonagem

4.1.1 Amplificação e clonagem da SEPT 7 e SEPT 7G

Por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), os fragmentos das septinas humanas 7 foram amplificados a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, usando primers sintéticos.

Os fragmentos que codificam a SEPT 7 e o seu domínio GTPase (SEPT 7G) foram obtidos com temperatura de anelamento de 62°C e 58 °C, respectivamente. A análise dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídeo (figura 4.1).

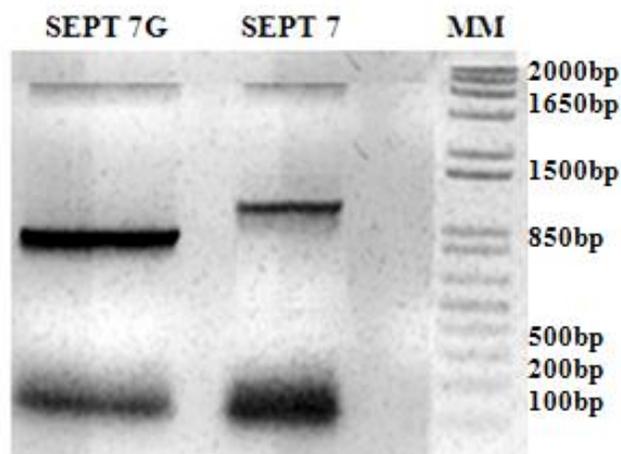


Figura 4.1 – Mostra o produto da PCR dos fragmentos que codificam a SEPT 7 e o seu domínio GTPase - SEPT 7G . Análise da reação foi realizada em gel de agarose (1% TAE) corado com brometo de etídeo. Marcador de pares de base MM (1 Kb DNA Ladder).

A reação foi realizada com sucesso apresentando o tamanho esperado baseado na sequência depositada no GenBank número de acesso NM_001788. A SEPT 7 com aproximadamente 1200 pb e o seu domínio GTPase (SEPT 7G) em torno de 800pb.

Produtos da PCR também foram obtidos com êxito para as septinas humanas 9 de acordo com sequência depositada no GenBank número de acesso NM_006640.

A SEPT 9 G contém aproximadamente 820 bp e temperatura de anelamento de 60°C, sendo formada pelo domínio GTPase da proteína, enquanto que a SEPT 9GC possui em torno de 880 bp, temperatura de anelamento de 62°C e domínio GTPase com o C-terminal. Esses fragmentos foram visualizados por meio de gel de agarose (figura 4.2). Não foram desenhados primers para amplificação da proteína SEPT 9 completa, pois sua longa cauda N-terminal dificulta a expressão da molécula de forma estável e homogênea.

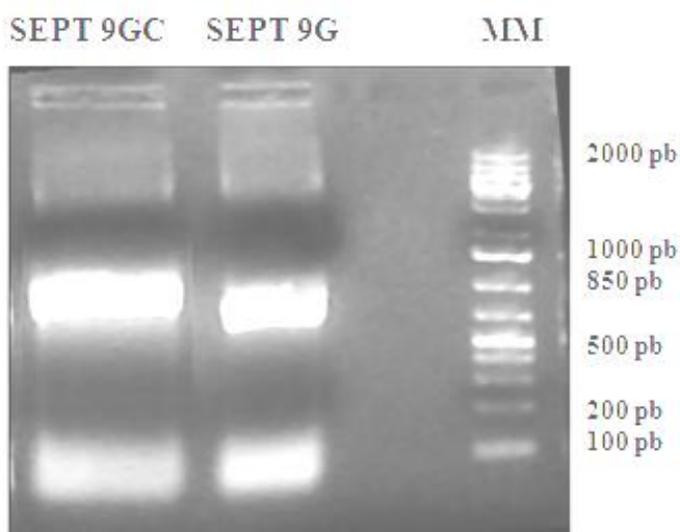


Figura 4.2 – Resultado da amplificação dos fragmentos que codificam a SEPT 9G e SEPT 9GC. Análise realizada em gel de agarose 1% TAE (1X). Marcador em pares de bases MM (1Kb DNA Ladder - Fermentas).

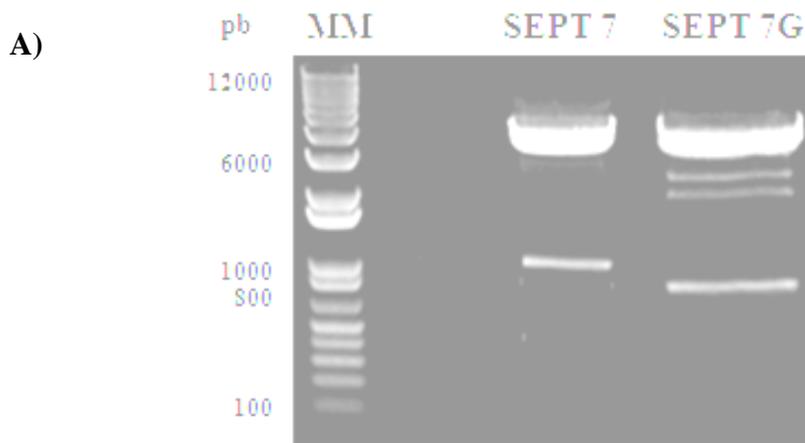
O resultado de todos os produtos da PCR das proteínas foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. Essa análise indicou que o tamanho dos fragmentos estão de acordo com o número de pares de bases esperado para cada reação, baseado na sequência depositada no GenBank. Os fragmentos observados foram extraídos do gel utilizando o procedimento do Kit MiniPrep (Invitrogen) e, em seguida, precipitados com etanol 80%.

Os produtos de PCR de todas as septinas (SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G) foram clonados no vetor de propagação pGEM-T easy (Promega), e transformados em *E. coli* DH5 α . Cada recombinante foi inoculado em placa de cultura contendo meio seletivo LB (Luria-Bertani) suplementado com canamicina.

Após incubação de 24 horas, todas as placas foram observadas contendo colônias brancas e azuis na proporção indicada pelo fabricante do vetor, indicando que a clonagem nestes vetores foi realizada com sucesso para todas as proteínas.

Para confirmar esse resultado e realizar a subclonagem no vetor de expressão pET-TV, as colônias brancas – formadas pelas células transformadas que contêm os recombinantes de cada septina – foram pré-inoculados em meio LB a 37°C por 24 horas. Ao término desse período de incubação, os vetores foram extraídos e submetidos à reação de digestão com as endonucleases NdeI e XhoI .

Após essa reação, os fragmentos observados em gel de agarose (figura 4.3) confirmaram a clonagem das SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G no vetor de propagação. Essa etapa também criou os sítios de restrição para a subclonagem no vetor pET.



*Continua

*Continuação

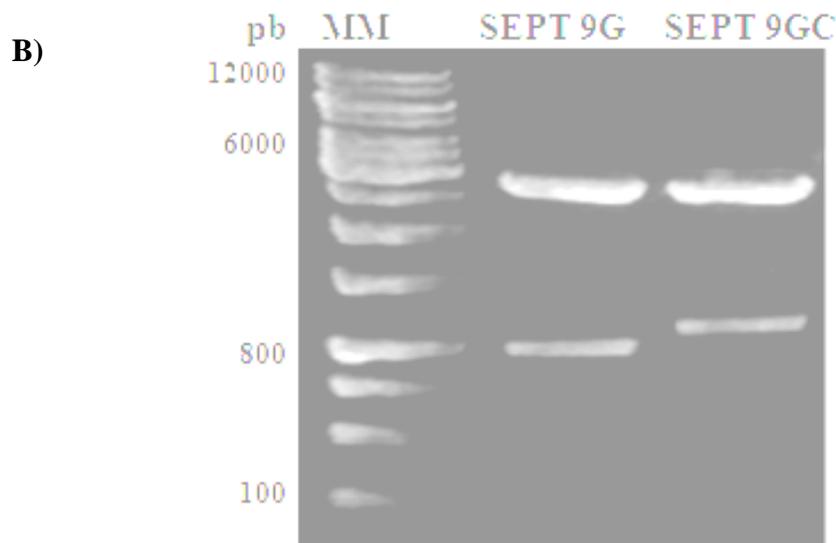


Figura 4.3 – Padrão de restrição do DNA plasmidial digeridos pelas enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* das septinas humanas. A) Mostra os fragmentos digeridos das septinas 7 e do seu domínio GTPase. B) Mostra os fragmentos das septinas 9 humanas - SEPT 9GC e o SEPT 9G. Análise realizada em gel de agarose 1% e TAE (1X). Marcador em pares de bases MM (1Kb DNA Ladder - Fermentas).

Os fragmentos das septinas digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação com o vetor pET linearizados com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Após essa reação, os recombinantes formados pelas proteínas de interesse unidas com o vetor pET-TV foram transformados em células de *E. coli* BL-21 (DE3). Essas células foram pré-inoculadas em meio LB e estocadas em -80°C .

Para confirmar a subclonagem no vetor de expressão, o DNA plasmidial extraído dos diferentes clones (pET TV-SEPT 7, pET TV-SEPT 7G, pET TV-SEPT 9GC e pET TV-SEPT 9GC) foi submetido à reação de digestão pelas enzimas de restrição descritas acima.

As amostras positivas em relação às construções foram sequenciadas para confirmar a matriz de leitura de cada proteína. Após essa confirmação os clones de interesse foram submetidos ao protocolo de indução de proteínas.

4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

4.2.1 Expressão das proteínas recombinantes SEPT 7 e SEPT 7G

Inicialmente foram realizados testes de expressão com a proteína SEPT 7 e SEPT 7G. Inúmeros ensaios foram realizados alterando a concentração de indutor, a temperatura e o tempo de incubação. A indução também foi realizada na presença ou ausência de GDP ou GTP, pois os trabalhos de Ding X. M. *et al.*, (88) e Sirajuddin M. *et al.*, (46) têm demonstrado que os nucleotídeos são necessários para estabilizar septinas humanas.

Os testes iniciais de expressão a 37°C utilizando várias concentrações de IPTG levaram à totalidade da proteína produzida para a fração insolúvel. Entretanto, testes de expressão da proteína recombinante a 18°C levaram parte da proteína produzida para a fração solúvel.

A análise da fração solúvel do extrato bruto da expressão das proteínas recombinantes SEPT7 G e SEPT 7 foi realizada em SDS-PAGE 15%, como mostrado na figura 4.4, na qual é possível observar a expressão das moléculas após a indução com IPTG.

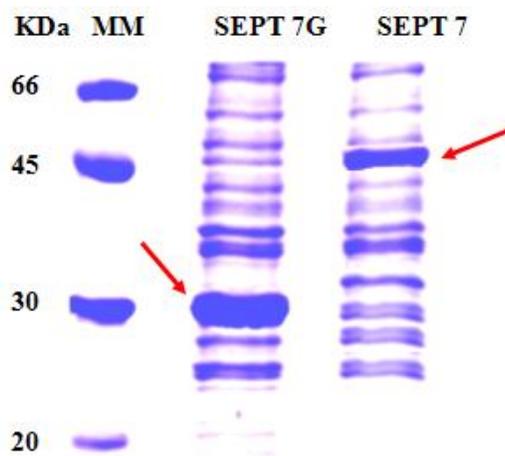


Figura 4.4–SDS-PAGE 15% mostrando o padrão de expressão em *E. coli* da SEPT 7 e SEPT 7G após a indução. As setas indicam as proteínas recombinantes. Marcador de massa molecular (MM) em KDa.

Esses testes mostraram que ocorre a expressão do domínio GTPase em maior concentração que a outra construção (SEPT 7). Foi possível verificar também por meio desses ensaios que na ausência de GDP ou GTP as duas septinas são expressas de forma insolúvel.

Essa análise demonstrou que os protocolos estabelecidos para induzir a expressão de ambas as moléculas foram eficientes, indicando uma massa molecular de aproximadamente 30 KDa e 46 KDa, respectivamente. Também confirmou a necessidade da presença de nucleotídeos para expressar essas septinas na forma solúvel, sugerindo que GTP ou GDP evitam a precipitação das proteínas.

4.2.2 Purificação das proteínas recombinantes SEPT 7 e SEPT 7G

Testes iniciais mostraram que a purificação da SEPT 7 em coluna de afinidade não foi satisfatória, sugerindo que a cauda de histidina está no interior dessa molécula, não estando disponível para interagir com os íons da coluna.

Assim, a primeira etapa para isolar essa proteína foi mais eficiente por meio de precipitação salina (salting-out), com uma solução de sulfato de amônio 10% – relação massa por volume de extrato bruto celular. Após o período de precipitação, o sobrenadante é descartado, e a amostra é ressuspendida em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 5% de glicerol e 100 μ M de GDP.

O sal foi removido da amostra por meio de uma coluna de salting out (Pharmacia) antes de a amostra ser submetida à próxima etapa de purificação.

Após a dessalinização, a proteína foi submetida à cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna SP FF Sepharose, com controle térmico a 10°C. Nessa etapa, a septina foi eluída por meio de gradiente linear de cloreto de sódio, variando de 0 a 1M. O pico de maior absorvância da molécula de interesse foi observado com cerca de 650 mM de cloreto de sódio (figura 4.5).

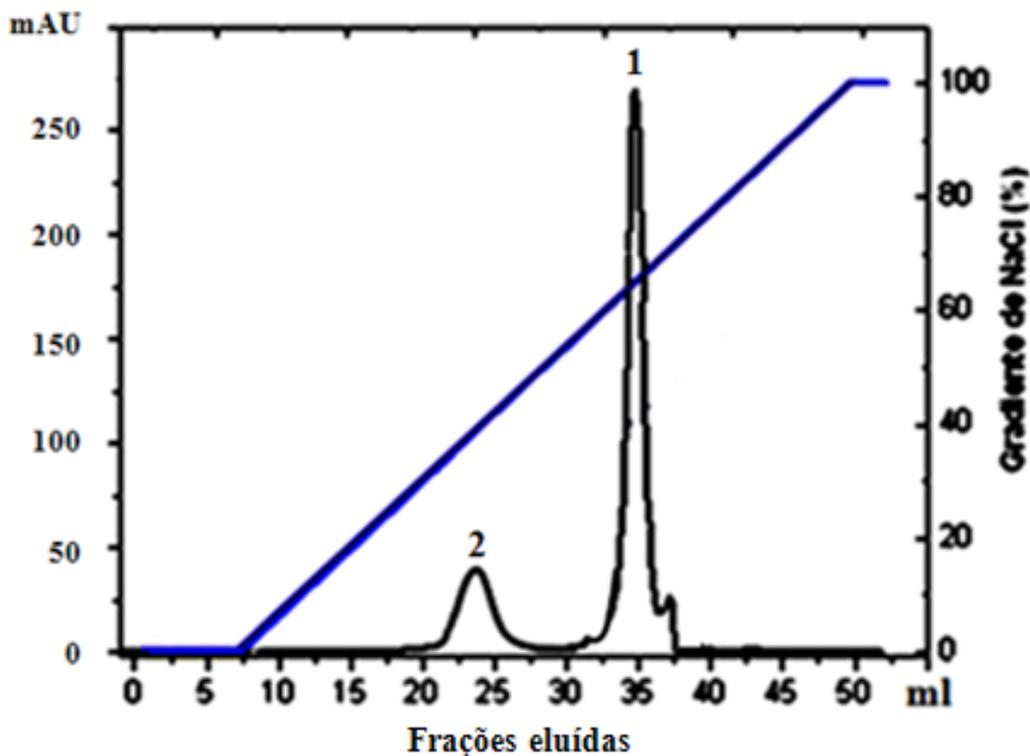


Figura 4.5 – Perfil cromatográfico da amostra submetida à coluna de troca iônica DEAE Sepharose. (1) amostra de interesse - SEPT 7, (2) contaminante. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 contendo 100 μ M e frações de 1,0 mL foram coletadas com um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 – 1M.

O perfil cromatográfico dessa etapa mostra que o primeiro passo de purificação foi eficiente, pois há poucos contaminantes e a amostra foi eluída de forma solúvel, não ocorrendo perdas significadas da proteína nem formação de precipitados.

O último passo da purificação foi a cromatografia de exclusão molecular. A fração 35 do passo cromatográfico anterior foi reunida, concentrada e submetida à recromatografia na coluna Superdex 200 sob controle térmico. A figura 4.6 mostra o perfil da purificação da SEPT 7 que foi monitorada a 280nm.

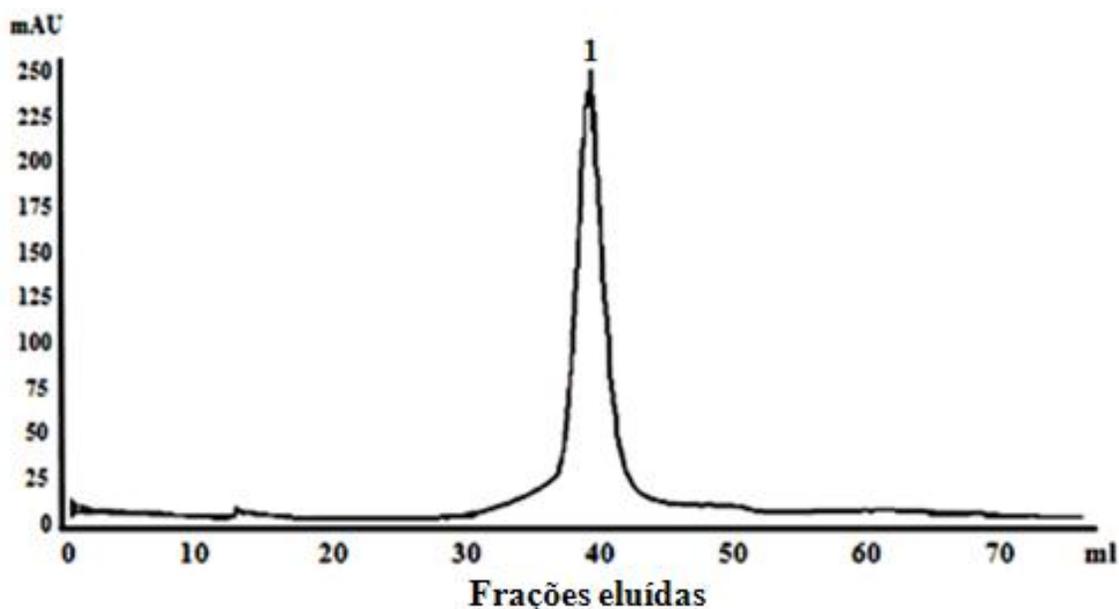


Figura 4.6 – Padrão cromatográfico da fração 35 eluída da coluna de troca iônica submetida à coluna de exclusão molecular (1) no tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 e 100 μ M de GDP. Esse perfil evidencia a possível forma dimérica da molécula.

O perfil de eluição de SEPT 7 mostrou um pico correspondente à massa molecular aparente de aproximadamente 92 kDa, de acordo com a curva de calibração. Este valor obtido equivale, aproximadamente, ao dobro do esperado para o monômero (46 kDa), indicando que essa proteína é homodimérica em solução, nas condições analisadas. Esse resultado está de acordo com os trabalhos de Sirajuddin, M. *et al* (46) e Garcia, W. *et al* (86) que mostram, respectivamente, que septinas humanas recombinantes 2 e 4 são expressas e purificadas em sua forma homodimérica.

Antes de prosseguir com os estudos espectroscópicos, a pureza da proteína e a presença de isoformas foram verificadas, respectivamente, por meio de eletroforese SDS-PAGE e gel nativo (figura 4.7).

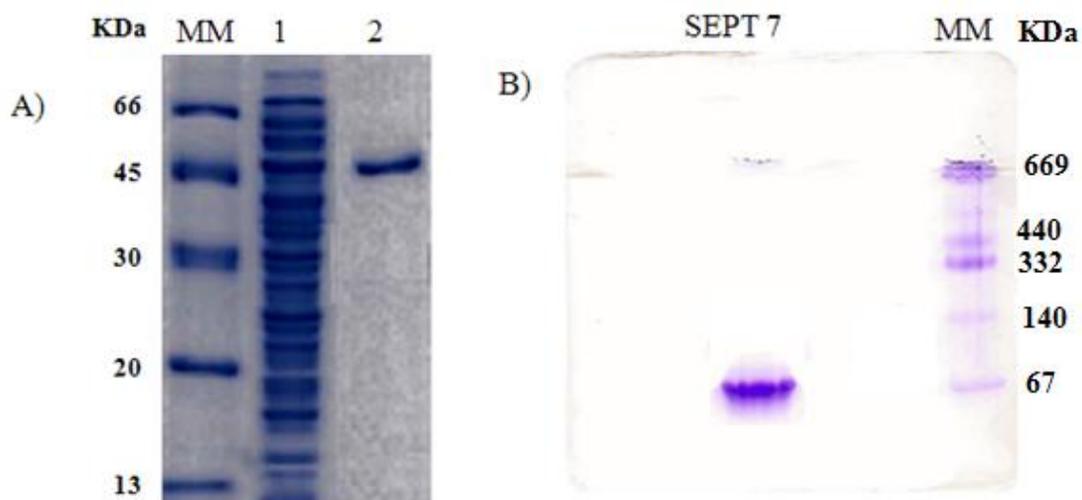


Figura 4.7 – A) Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, (1) Extrato bruto de BI21(DE3), (2) Fração 40 eluída da coluna de exclusão molecular, (MM) marcador de massa molecular. B) Gel nativo da amostra de Septina 7 eluída da coluna de exclusão molecular, (MM) marcador de massa molecular.

Essas análises mostram que a purificação da septina SEPT 7 foi realizada com sucesso, isolando a proteína em sua forma dimérica solúvel e não ocorrendo isoformas. O rendimento da purificação para SEPT 7 foi de aproximadamente 0,5 mg de proteína por litro de cultura.

Após a purificação, alíquotas da amostra foram concentradas em um centríped nas concentrações adequadas para os testes espectroscópicos e ensaios de cristalização.

As etapas do procedimento de purificação da proteína SEPT 7G envolveram: cromatografia de afinidade sobre uma coluna contendo 3,0 ml de resina de íons cobalto, seguido de cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 (16/60cm) acoplada a um sistema ÄKTA .

A figura 4.8 mostra a análise em gel de poliacrilamida da amostra eluída da coluna de afinidade em diferentes concentrações de imidazol.

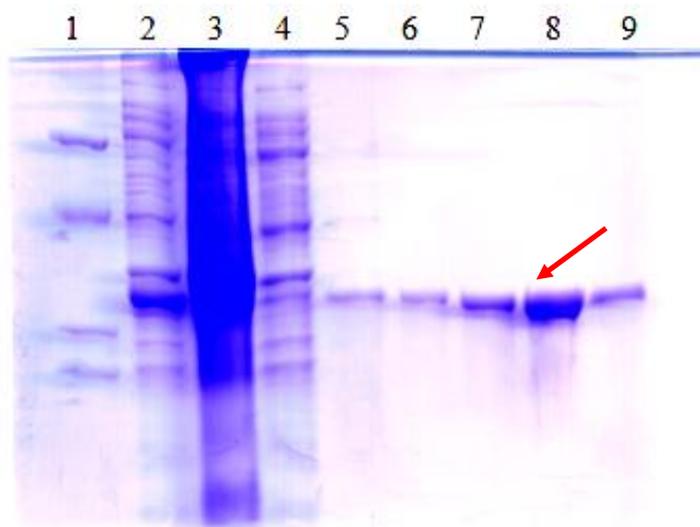


Figura 4.8 – Gel de poli-acrilamida 15% da purificação da Septina 7 GTPase. (1) Marcador; (2) sobrenadante; (3) precipitado; (4) void, eluição com (5) 5mM, (6) 10mM, (7) 20mM, (8) 100mM e (9) 250mM de imidazol.

Esse resultado indica que essa etapa de purificação foi realizada com eficiência, pois os inúmeros contaminantes que são vistos no sobrenadante (indicado pelo número 2 no gel) foram eluídos, no entanto, a SEPT 7G ficou retida na coluna. A septina interage fortemente com os íons metálicos Co_2^+ da coluna, porque foi expressa com uma cauda N-terminal que possui seis resíduos de histidina (6xHis).

Diferentes concentrações de imidazol, que diminui a interação da proteína com os íons, foram testadas para eluir a molécula. Os melhores resultados de purificação foram obtidos com 100 mM de imidazol (indicado pelo número 8 no gel).

Após essa etapa, amostras de SEPT 7G foram injetadas em uma coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico é mostrado da figura 4.9.

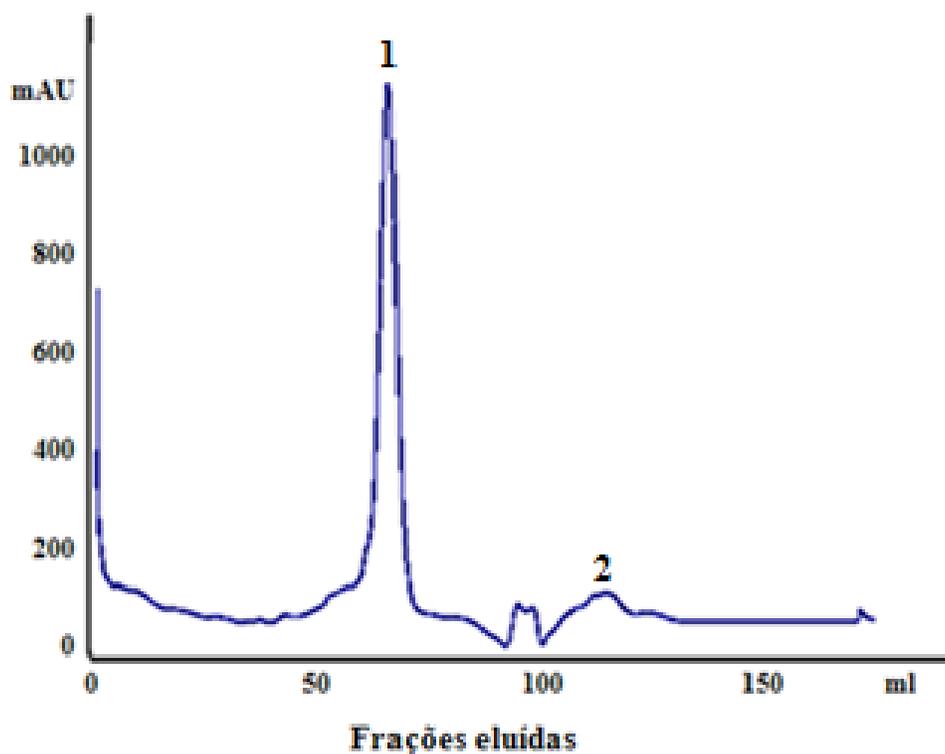


Figura 4.9 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular do domínio SEPT 7G na coluna Superdex-200. O pico 1 é referente à SEPT 7G, de massa molecular aparente de aproximadamente 60kDa. O pico 2 é referente ao imidazol.

A pureza da amostra após as etapas de purificação e a presença de isoformas foram analisadas, respectivamente, por meio das eletroforeses SDS-PAGE e gel nativo (figura 4.10).

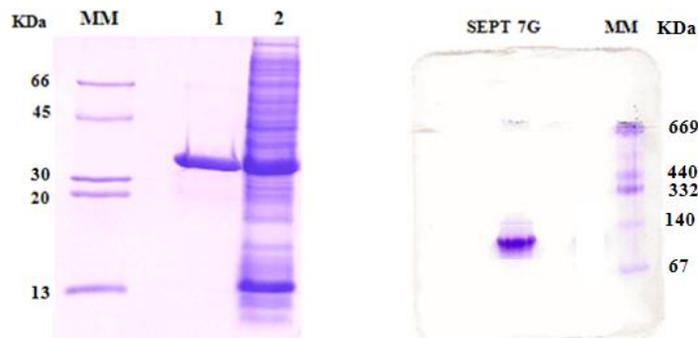


Figura 4.10 – Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, mostrando a septina 7 GTPase depois das etapas de purificação, (1) SEPT 7G, (2) extrato bruto de B121(DE3), (MM) padrão de peso molecular. B) Gel nativo mostrando uma única isoforma para a Septina 7 GTPase e marcador (MM).

De acordo com a curva de calibração, o perfil de eluição de SEPT 7G mostrou um pico correspondente a massa molecular de aproximadamente 60 kDa, este valor corresponde ao dobro do esperado para a forma monomérica (30 kDa). Este resultado mostra que o domínio GTPase da septina 7 humana também é homodimérico em solução, como ocorre com a SEPT 7.

Esses resultados indicam que a proteína foi purificada em forma solúvel e homogênea, pois isoformas não foram visualizadas no gel nativo e que o rendimento da purificação da SEPT 7G foi de aproximadamente 2,0 mg de proteína por litro de cultura. Amostras da SEPT 7G eluídas na cromatografia de exclusão molecular foram concentradas em um centripep nas concentrações adequadas para os testes espectroscópicos e ensaios de cristalização.

4.2.3 Expressão da proteína recombinante SEPT 9GC e SEPT 9G

Os mesmos testes iniciais de expressão com a septina 7 humana foram realizados com a SEPT 9G e SEPT 9GC. Assim, foi possível expressar o domínio GTPase na forma solúvel. Entretanto, não foi possível estabelecer um protocolo para expressar e purificar a proteína recombinante SEPT 9GC, pois esta molécula é expressa na fração insolúvel no extrato bruto após a indução.

A análise da fração solúvel do extrato bruto da expressão da proteína recombinante SEPT 9G foi realizada em SDS-PAGE 15%, como mostrado na figura 4.11, na qual é possível observar a expressão da molécula após a indução com IPTG.

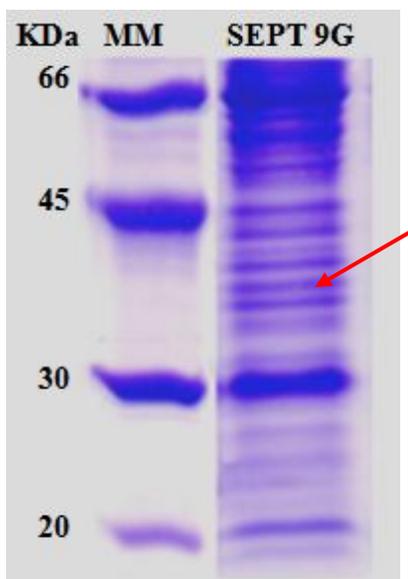


Figura 4.11 – SDS-PAGE 15% mostrando o padrão da expressão em *E. coli* da SEPT 9G após a indução. A seta indica a proteína recombinante. Marcador de massa molecular (MM) em KDa.

4.2.4 Purificação das proteínas recombinantes SEPT 9GC e SEPT 9G

O extrato bruto da proteína recombinante SEPT 9G foi submetido a dois passos cromatográficos: coluna de afinidade sobre uma coluna de cobalto seguido de cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 (16/60cm) acoplada a um sistema ÄKTA.

A figura 4.12 mostra a análise em gel de poliacrilamida da amostra eluída da coluna de afinidade em diferentes concentrações de imidazol.

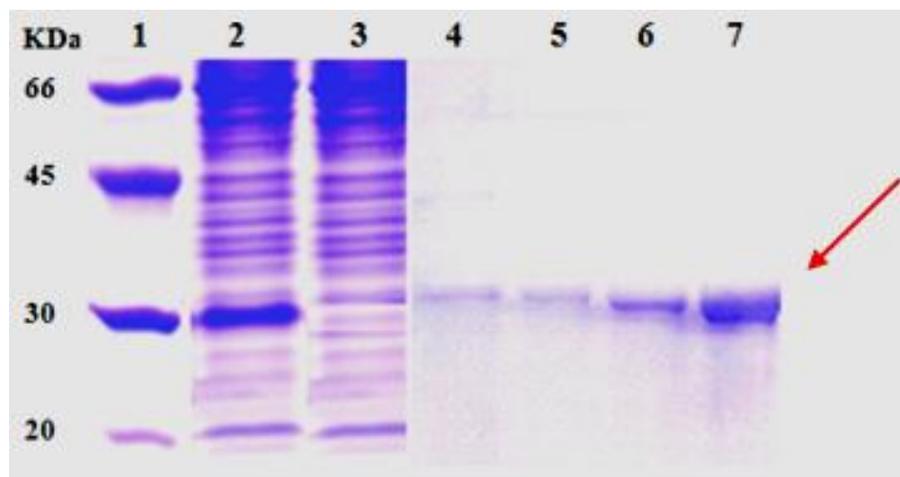


Figura 4.12 – Gel de poliacrilamida 15% da purificação da septina 9 GTPase. (1) Marcador; (2) sobrenadante; (3) void, eluição com (4) 5mM, (5) 10mM, (6) 20mM, (7) 100mM.

A análise do gel indica que essa etapa de purificação foi realizada com eficiência, pois os inúmeros contaminantes que são vistos no sobredanante foram eluídos, no entanto a SEPT 9G ficou retida na coluna. Diferentes concentrações de imidazol foram usadas para lavar a coluna, eluindo os contaminantes. O melhor resultado de purificação foi obtido com 100 mM de imidazol – indicado pela seta no gel.

Após essa etapa, amostras de SEPT 9G foram injetadas em uma coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico desta etapa de purificação é mostrado na figura 4.13.

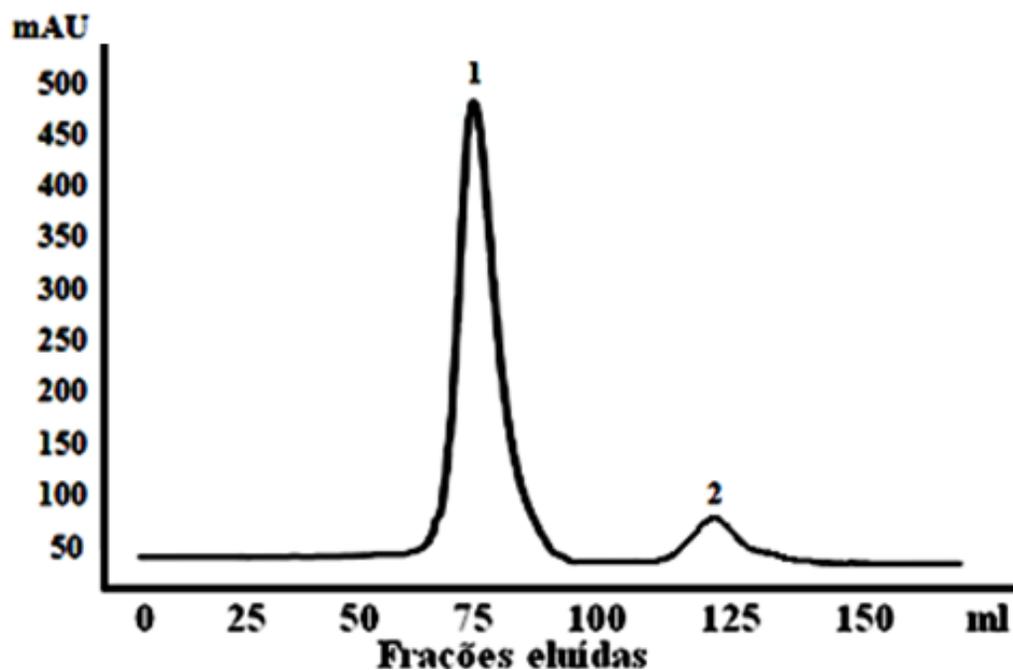


Figura 4.13 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular do domínio GTPase na coluna Superdex-200. O pico 1 é referente à SEPT 9G, de massa molecular aparente de aproximadamente 60kDa. O pico 2 é referente ao imidazol.

A pureza da amostra após as etapas de purificação foi analisada por eletroforese SDS-PAGE como mostra a figura 4.14.

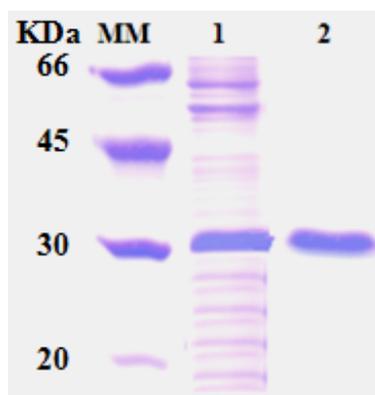


Figura 4.14 – Gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corado com Coomassie blue, mostrando a septina 9 G depois das etapas de purificação, (1) extrato bruto de B121(DE3), (2) SEPT 9G, (MM) padrão de peso molecular.

O perfil de eluição da SEPT 9G mostrou um pico correspondente à massa molecular de aproximadamente 60 kDa – de acordo com a curva de calibração. Este valor corresponde ao dobro do esperado para a forma monomérica (30 kDa). Este dados indicam que o domínio GTPase da septina 9 humana também é homodimérico em solução, como ocorre com as septinas 7 humanas.

Os resultados mostram que a proteína foi purificada em forma solúvel e que o rendimento da purificação da SEPT 9G foi de aproximadamente 0,5 mg de proteína por litro de cultura. Amostras da SEPT 9G eluídas na cromatografia de exclusão molecular foram concentradas em um centripep nas concentrações adequadas para os testes espectroscópicos.

4.3 Teste de atividade GTPase e análise do conteúdo de nucleotídeo liberado

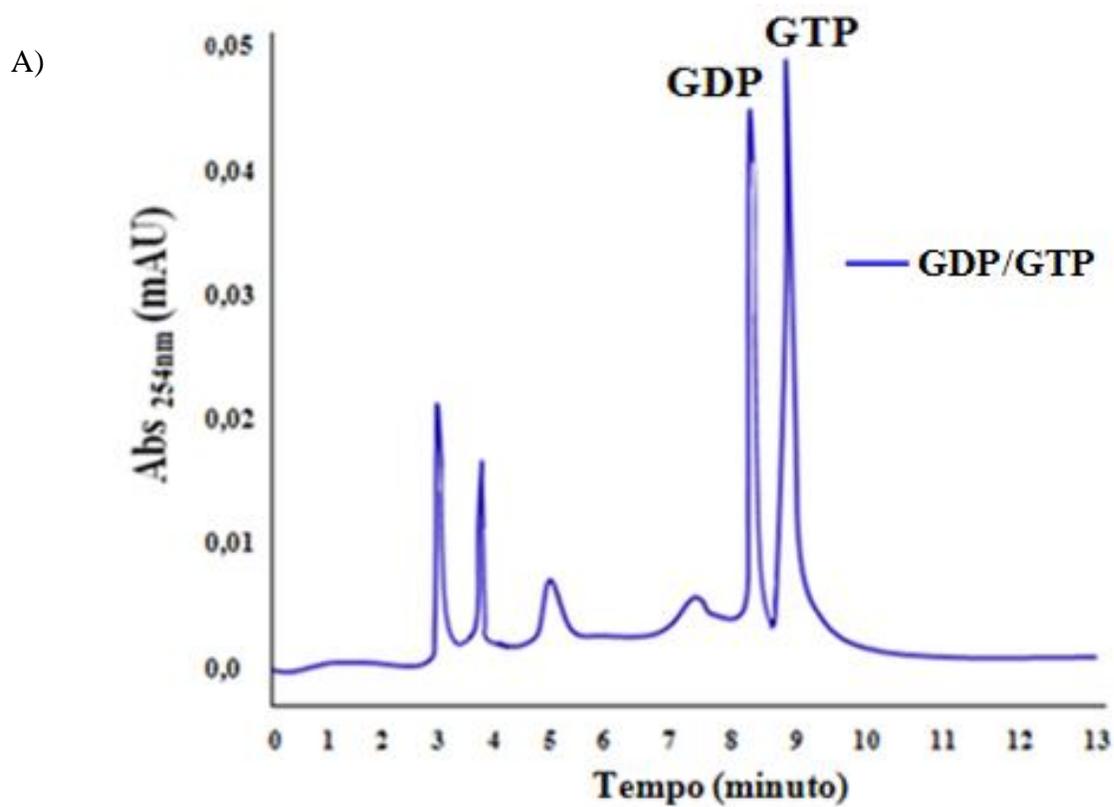
Uma das grandes dificuldades a respeito dos estudos de septinas é medir a atividade GTPase dessas proteínas. O método descrito neste trabalho permitiu avaliar o conteúdo de nucleotídeo liberado (GDP ou GTP) da molécula por meio da desnaturação química por ácido perclórico.

Antes das reações, as moléculas de GTP e GDP foram testadas separadamente permitindo assim identificá-las no perfil cromatográfico que contém a mistura. Para isso, a posição dos nucleotídeos foi identificada por meio dos tempos de migração na coluna, em comparação com as amostras controle. Essas reações foram tratadas nas mesmas condições que as proteínas SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G pelo método de desnaturação química.

Para analisar a atividade GTPase das proteínas, essas são desnaturadas pelo ácido e o seu conteúdo de nucleotídeo liberado foi determinado utilizando uma coluna de troca aniônica (Protein Pak DEAE 5 PW), acoplada ao cromatógrafo Alliance 2695 (*Waters*). Os ensaios foram monitorados em 254nm, que representa pico de absorção máxima das moléculas de GDP e GTP.

A figura 4.15 (A) mostra o perfil cromatográfico dos nucleotídeos GTP e GDP após a desnaturação química. Esse perfil indica que houve a separação dos nucleotídeos, sendo que em aproximadamente 8 minutos ocorreu o pico correspondente à GDP e em 9 minutos à GTP. Para essas reações de desnaturação química foram usados uma mistura de 10 μ M de cada nucleotídeo.

O perfil cromatográfico do ácido perclórico em 254nm é mostrado da figura 4.15 (B). Este indica que os picos correspondentes ao ácido são observados na faixa que corresponde a um período de tempo de 3 a 8 minutos.



*Continua

*Continuação

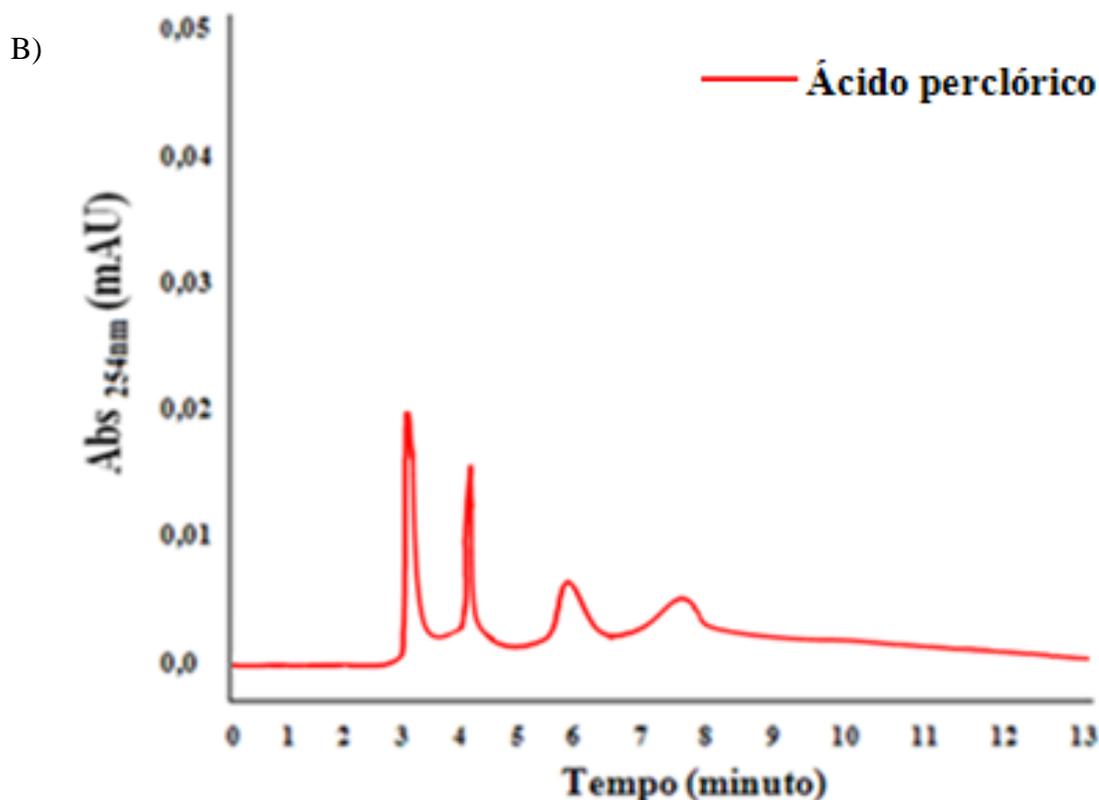


Figura 4.15 – (A) Perfil cromatográfico de troca aniônica mostrando a separação do GDP e GTP quando tratados com o método de desnaturação química com ácido perclórico. (B) Os picos correspondentes ao ácido perclórico submetido à troca aniônica. A reação foi monitorada a 254 nm.

Esses estudos indicam que o ácido também apresenta absorção em 254nm. Entretanto, foi possível separar com exatidão os picos correspondentes aos nucleotídeos e ao ácido.

Amostras das septinas SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G purificadas em tampão com excesso de GTP foram submetidas à diálise em Tris-HCl 25mM pH 7,8 na ausência de nucleotídeo, com o objetivo de remover todas essas moléculas. Assim, as únicas moléculas de nucleotídeos presentes nas amostras estarão ligadas às proteínas.

Estas proteínas após a desnaturação química foram submetidas à cromatográfica de troca aniônica. O perfil cromatográfico mostrando a liberação do conteúdo de nucleotídeo da proteína SEPT 7 é mostrado na figura 4.16.

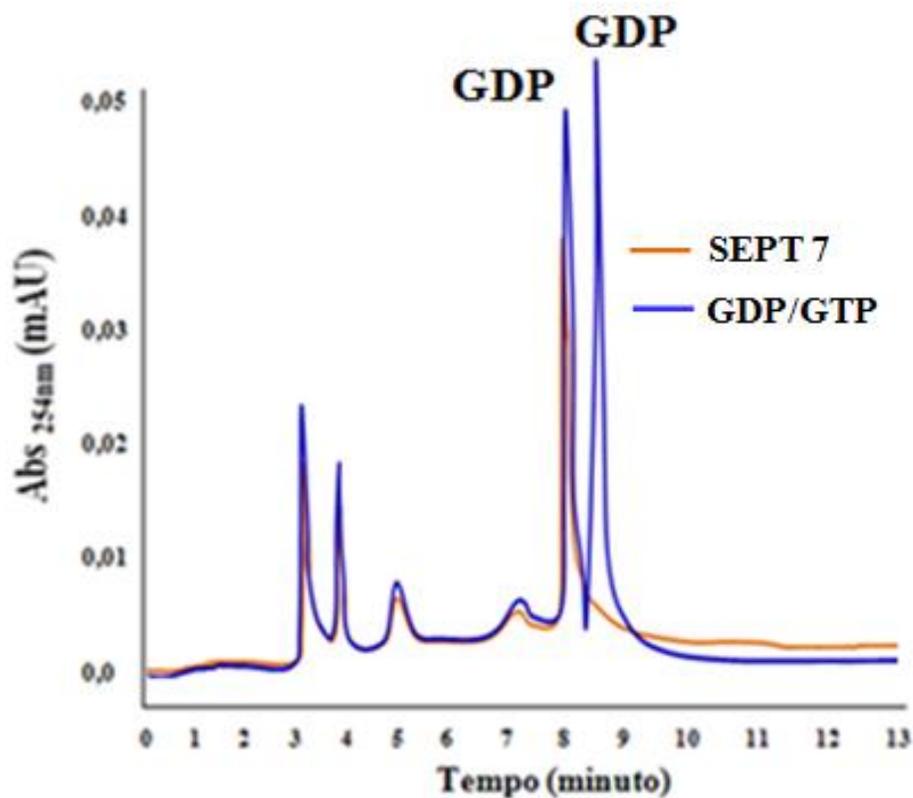


Figura 4.16 – Perfil cromatográfico da SEPT 7 após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.

Por meio da sobreposição do perfil da SEPT 7 e da mistura GDP/GTP foi possível concluir que o nucleotídeo da proteína após o tratamento químico foi liberado correspondendo ao GDP, pois seu pico está em aproximadamente 8 minutos.

A figura 4.17 mostra o perfil cromatográfico da SEPT 7G submetida à troca iônica após o tratamento com ácido perclórico.

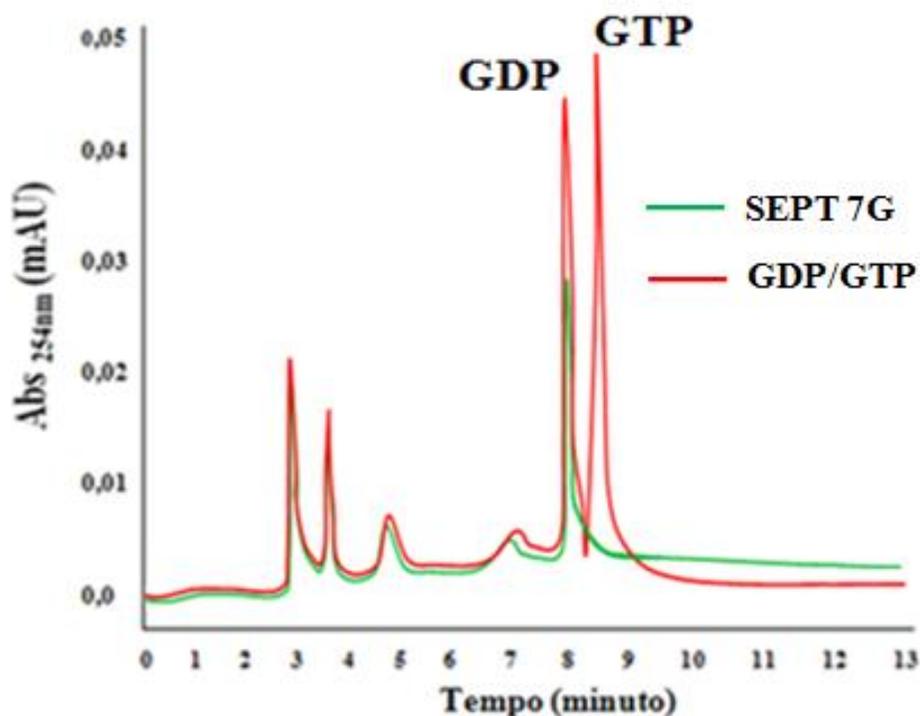


Figura 4.17 – Perfil cromatográfico do domínio GTPase da septina 7 humana após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.

A análise desses dados permite concluir que o domínio GTPase da septina 7 humana mantém a mesma capacidade da SEPT 7 em ligar com o GDP. Observações da sobreposição do perfil indicam que o pico do nucleotídeo está em aproximadamente 8 minutos.

Estes estudos para a septina humana SEPT 9G mostram que essa molécula também se liga ao nucleotídeo GDP (figura 4.18).

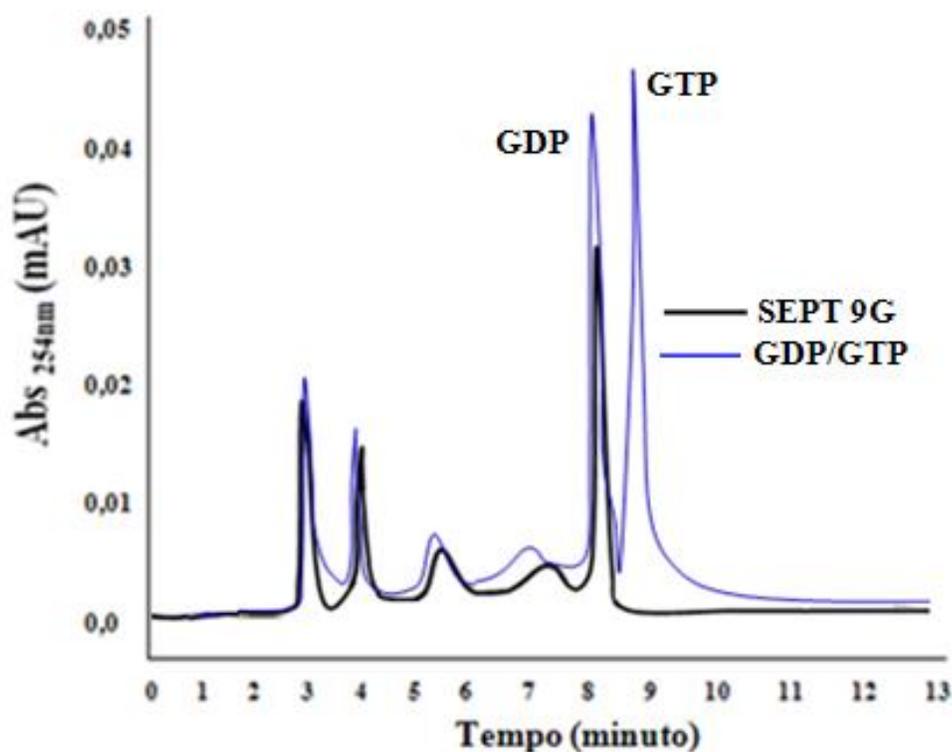


Figura 4.18 – Perfil cromatográfico do domínio GTPase da septina 9 humana após a desnaturação química, mostrando picos correspondentes ao ácido e ao nucleotídeo GDP em aproximadamente 8 minutos. A reação foi monitorada a 254 nm.

Estes resultados mostram que as septinas 7 e 9 humanas (SEPT 7 e SEPT 9) ligam-se aos nucleotídeos GTP e hidrolisam essas moléculas à GDP, pois nos perfis cromatográficos dessas proteínas são observados um único pico em 8 minutos, que indica a presença somente de GDP. Assim, essas moléculas estudadas ligam-se fortemente aos nucleotídeos e apresentam atividade catalítica *in vitro* na ausência de proteínas auxiliares.

Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura que relatam que a maioria das septinas são ligadas à GTP e hidrolisam estas moléculas, exceto a Cdc3 e Cdc 11 de levedura e a Sep 2 de drosófilas (81, 82, 83, 84, 85).

4.4 Estudos espectroscópicos por dicroísmo circular (CD)

4.4.1 Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD) das SEPT 7 e SEPT 7G

As seqüências das construções SEPT 7 , SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9C foram submetidas à predição da estrutura secundária usando o método PHD (92), e o IUPred (93), que foi usado para identificar regiões intrinsecamente não estruturadas. A tabela 4.1 mostra os resultados das predições.

Tabela 4.1 – Predição de estrutura secundária.

Domínios	Helices-α	Folhas-β	Volts e Estruturas Irregulares
SEPT 7	45% - 50%	17% - 22%	39% - 44%
SEPT 7G	30% - 35%	20% -25%	39% - 41%
SEPT 9GC	29% - 34%	23% - 28%	38% - 43%-
SEPT 9G	30% - 35%	20% - 25%	41% - 46%

Os resultados indicam que a proteína completa SEPT 7 apresenta uma porcentagem maior de estruturas secundárias regulares do que irregulares, sendo o domínio N-terminal uma região intrinsecamente não estruturada. Na predição, o C-terminal de todos os domínios mostrou aumentar a fração de hélice- α das proteínas, embora apresente uma maior proporção de regiões não estruturadas do que o domínio GTPase, conforme a predição pelo método IUPred.

Os estudos estruturais experimentais por dicroísmo circular envolveram inúmeros experimentos variando condições de temperatura e pH. Foram realizadas medidas padrões para determinar as frações de estruturas secundárias das moléculas usando uma base de dados de proteínas.

O espectro de dicroísmo circular no UV distante da SEPT 7 e do seu domínio GTPase em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8, 5% glicerol a 18° C é mostrado na figura 4.19. Estes espectros são caracterizados por duas bandas, uma fraca com um máximo em 210nm e outra banda bem intensa com um mínimo em aproximadamente 220nm, a elipicidade negativa observada nessa faixa indica a presença de hélices- α .

Por meio do pacote de programas CDPro (89, 90), foi gerado um espectro experimental para cada medida – baseado nos dados de CD das septinas e das proteínas do banco de dados selecionado – que sobrepõem perfeitamente ao espectro calculado.

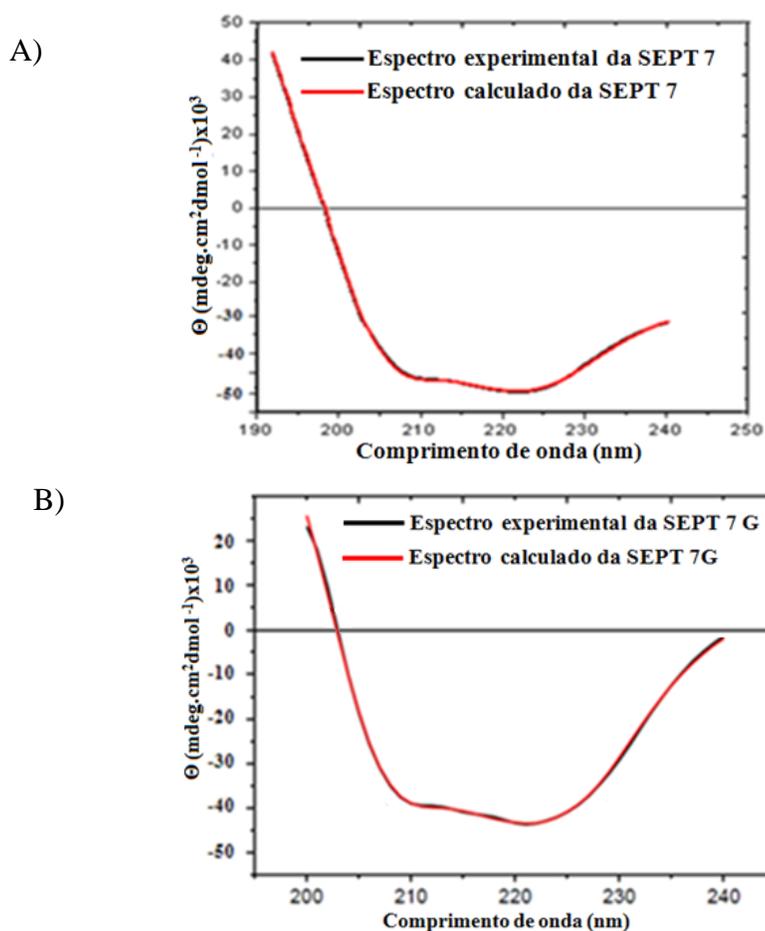


Figura 4.19 – Para o processo de desconvolução dos espectros de CD das septinas, foi utilizado o pacote de programas CDPro. A) SEPT 7 é constituída de 39% hélices- α , 17% folhas- β , 11% voltas e 33% estruturas irregulares . B) SEPT 7 GTPase é formada por 31% hélices- α , 22% Folhas- β , 16% voltas e 31% estruturas irregulares.

Para a desconvolução do espectro da SEPT 7 e da SEPT 7G foram utilizados os programas CONTIN, SELCON3 e CDSSTR do pacote CDPro (89, 90), com uma base de dados de 48 proteínas. Essa análise mostrou que a estrutura da septina 7 humana é constituída de 39% hélices- α , 17% folhas- β , 11% voltas e 33% estruturas irregulares. Enquanto que o seu domínio GTPase é formado por 31% hélices- α , 22% folhas- β , 16% voltas e 31% estruturas irregulares.

Observação dos espectros de CD da figura 4.19 mostra que a SEPT 7 tem uma grande elipicidade positiva em torno de 195 nm quando comparada com seu domínio GTPase. Essa proteína também apresenta uma elipicidade negativa em 210 e 220nm mais forte. Estas diferenças sugerem uma porcentagem ligeiramente maior de estruturas hélices- α .

A análise desses estudos indica que a ausência do domínio GTPase não altera muito a estrutura da proteína completa (SEPT 7), pois são observadas apenas pequenas alterações das estruturas entre as proteínas. O domínio GTPase apresenta menor porcentagem de hélices- α , embora apresente uma maior fração de estruturas irregulares, sugerindo que o domínio C-terminal seja responsável pela maior fração de hélices. Estes resultados estão consistentes com as predições teóricas observadas na tabela 4.1

As frações encontradas de hélices- α e folhas- β na desconvolução dos espectros de CD da septina 7 humana são parecidas às porcentagem de estruturas secundárias que há em pequenas GTPases, indicando uma semelhança estrutural entre essas moléculas. O trabalho de Garcia (2006) sugere que essa similaridade seja baseada em topologia de folhas- β aberta.

As alterações conformacionais dessas septinas foram estudadas por CD no UV distante em função da temperatura. As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL em tampão de Tris-HCl 25mM pH 7,8 e 5% glicerol.

Os estudos para o domínio GTPase da proteína foram feitos variando a temperatura de 15°C a 80°C, em intervalos de 5°C (figura 4.20). A proteína foi incubada por 15 minutos em cada temperatura e os espectros foram registrados entre o comprimento de onda de 200 a 250nm, com uma média de 16 varreduras.

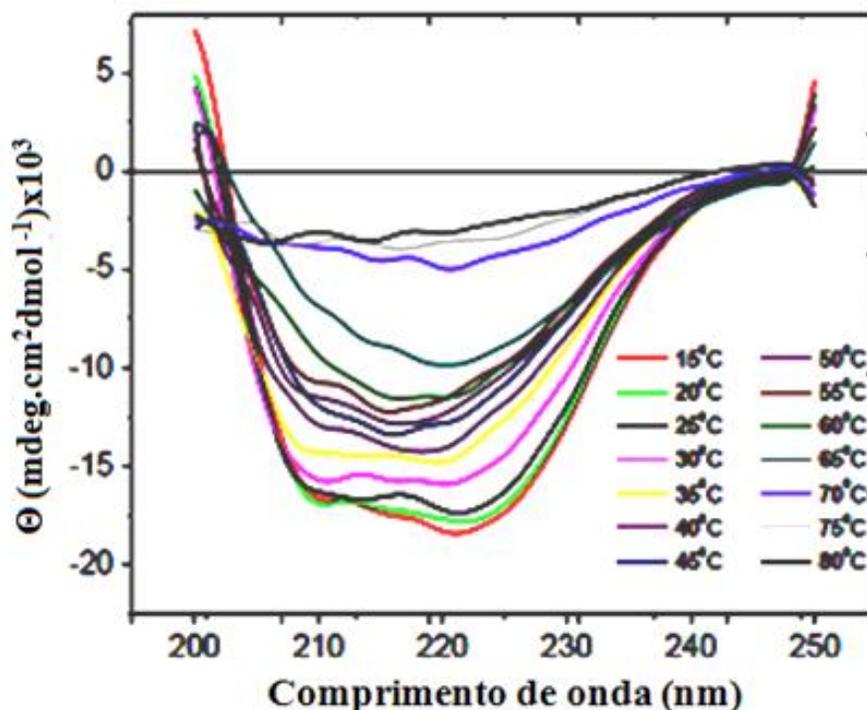


Figura 4.20 – Espectro de CD registrado de 200 a 250nm, acompanhando o efeito da temperatura sobre a SEPT 7G. A temperatura investigada variou de 15°C a 80°C com intervalo de 5°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado no aparelho.

Os espectros da septina mostrados na figura 4.20 indicam que entre as temperaturas de 15°C a 35°C a proteína permanece na sua conformação nativa, com uma diminuição da intensidade da banda em aproximadamente 210nm. Esta ligeira perda de intensidade continua até a temperatura de 45°C.

Após 35°C, ocorre também uma discreta perda da banda em torno de 220nm, que se acentua após 50°C. Portanto, entre 15°C e 35°C a septina é estável, pois se observa que nestas condições ocorrem poucas alterações no seu espectro de CD.

Por outro lado, as alterações significativas dos espectros indicando mudanças conformacionais iniciaram-se após 55°C. A partir desta temperatura, ocorrem significativas perdas da intensidade das duas bandas sendo mais evidente a partir de 60°C.

O gráfico mostrado na figura 4.21 representa os dados obtidos do experimento equivalente à figura 4.20 com o monitoramento do comprimento de onda em 220nm. Este gráfico é uma curva de transição das alterações das estruturas secundárias da proteína em função da temperatura.

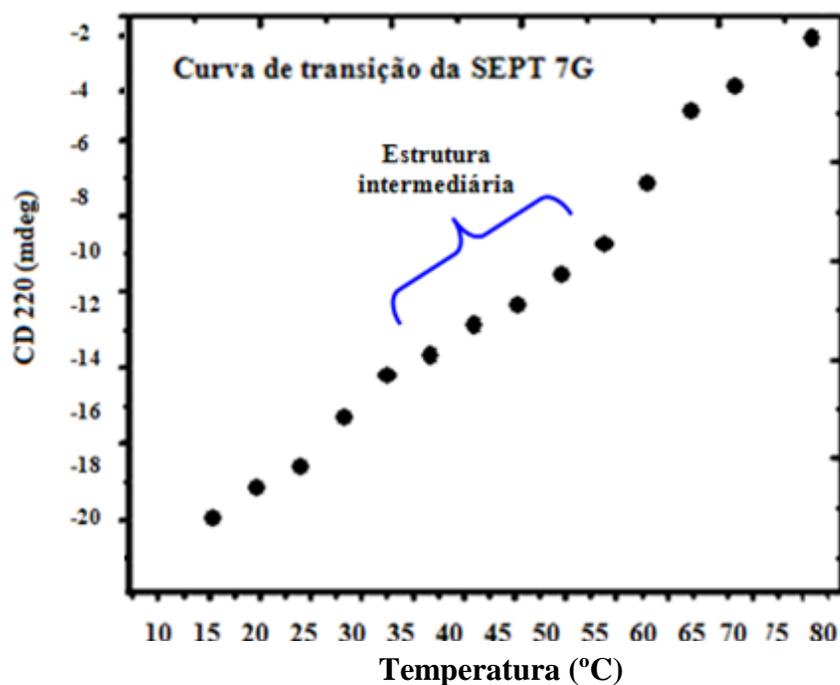


Figura 4.21 – Curva de transição em função da temperatura da SEPT 7G monitorada no comprimento de onda de 200nm.

Análise da curva de transição indica que o espectro de CD torna-se constante mais uma vez em torno da temperatura de 35°C a 55°C, indicado pela intensidade da banda negativa de mínimo em aproximadamente 220nm, sugerindo que apareça uma estrutura intermediária dentro dessa faixa. Isso é observado pela formação de um ombro no gráfico da figura 4.21.

Esta curva também indica que em aproximadamente 55°C ocorre a transição. Portanto, abaixo desta temperatura, a proteína apresenta-se enovelada com discretas alterações em sua estrutura e acima deste ponto a proteína inicia o processo de desnaturação, que ocorre passando por uma estrutura intermediária.

Pode-se observar estabilidade térmica da molécula entre 15°C a 30°C, pois nestas temperaturas os espectros apresentam mesma intensidade. Entretanto, acima dessa faixa, ocorre a perda de estruturas. A partir de 55°C, pode-se inferir que houve desnovelamento da proteína.

Os espectros das alterações conformacionais da SEPT 7 por CD foram realizados variando a temperatura de 10°C a 80°C, em intervalos de 10°C (figura 4.22). As medidas foram realizadas nas mesmas condições que o experimento anterior.

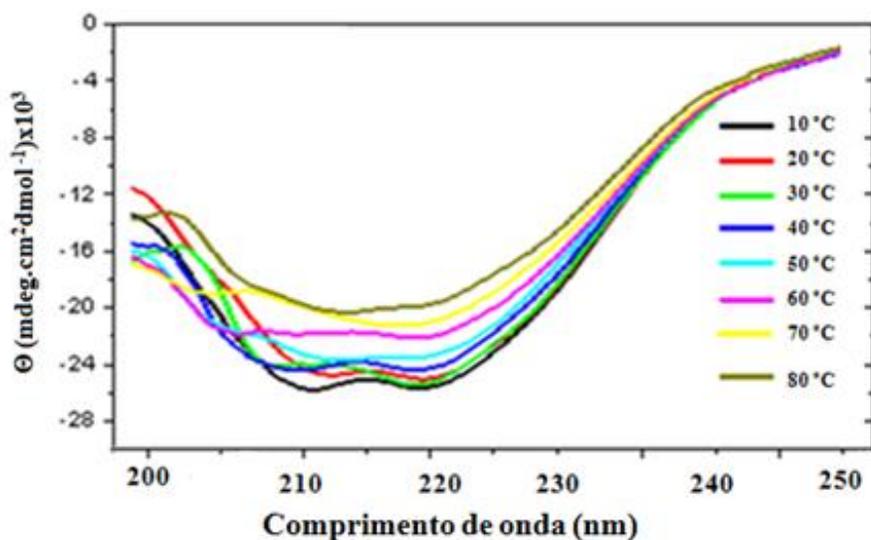


Figura 4.22 – Espectro de CD registrado de 203 a 250nm, mostrando o efeito da temperatura sobre a SEPT7 G. A temperatura investigada variou de 10°C a 80°C em intervalo de 10°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado no aparelho.

A análise das medidas de CD na SEPT 7 indica que molécula apresenta estabilidade térmica na faixa de temperatura de 10 °C a 40 °C, pois os espectros mantêm praticamente o mesmo padrão de bandas e ocorre apenas ligeira diminuição da intensidade destas. Em temperaturas superiores a 50°C, as bandas em 210 e 220 nm perdem sua forma e intensidade, indicando perda de estruturas secundárias.

Com esses dados de variação de temperatura foi construída uma curva de transição (figura 4.23) monitorando a intensidade da banda de mínimo em 220nm. Este gráfico é uma curva de transição das alterações das estruturas secundárias da proteína em função da temperatura.

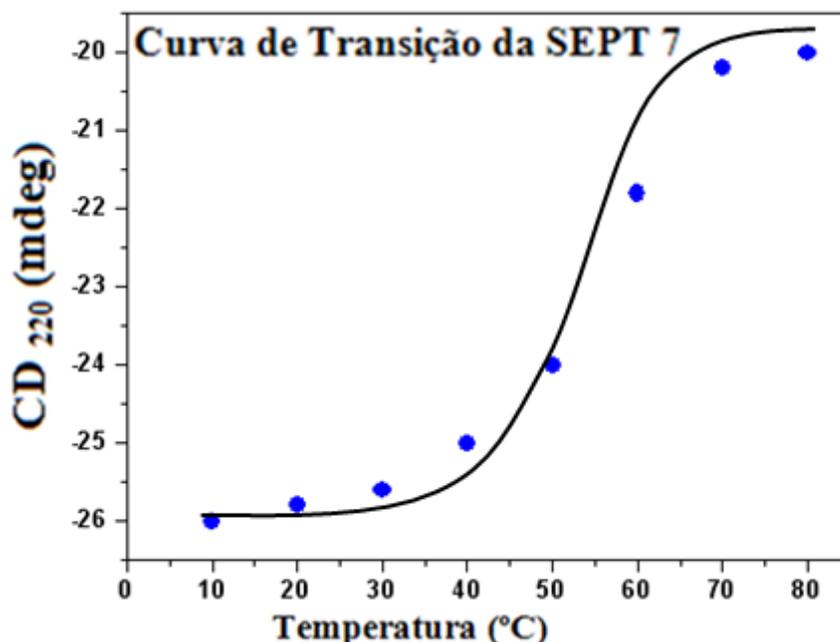


Figura 4.23 – Curva de transição em função da temperatura da SEPT 7 monitorada no comprimento de onda de 200nm.

Esta curva indica que em aproximadamente 50°C ocorre a transição, portanto, abaixo desta temperatura a proteína apresenta-se enovelada com discretas alterações em sua estrutura e acima deste ponto a proteína inicia a desnaturação, não sendo observada uma estrutura intermediária durante esse processo.

Comparando os dados de dicroísmo circular em função da temperatura das duas septinas, observa-se que a molécula inteira apresenta maior estabilidade térmica. Na SEPT 7 a perda da intensidade e forma das bandas iniciam-se à temperatura acima de 50°C, enquanto que na SEPT 7G a perda de estruturas secundárias inicia-se a temperaturas superiores a 40°C.

A análise dos dados de desconvoluções das duas moléculas mostra que a septina 7 humana inteira apresenta maiores porcentagens de α -hélice e maior intensidade. Isto sugere que o C-terminal proporciona um aumento na estabilidade térmica da proteína, que pode ser devido aos dipolos magnéticos orientados na α -hélice.

A estabilidade das septinas foram também verificadas em função dos diferentes pHs. A figura 4.24 mostra os espectros de CD das SEPT 7 e SEPT 7G.

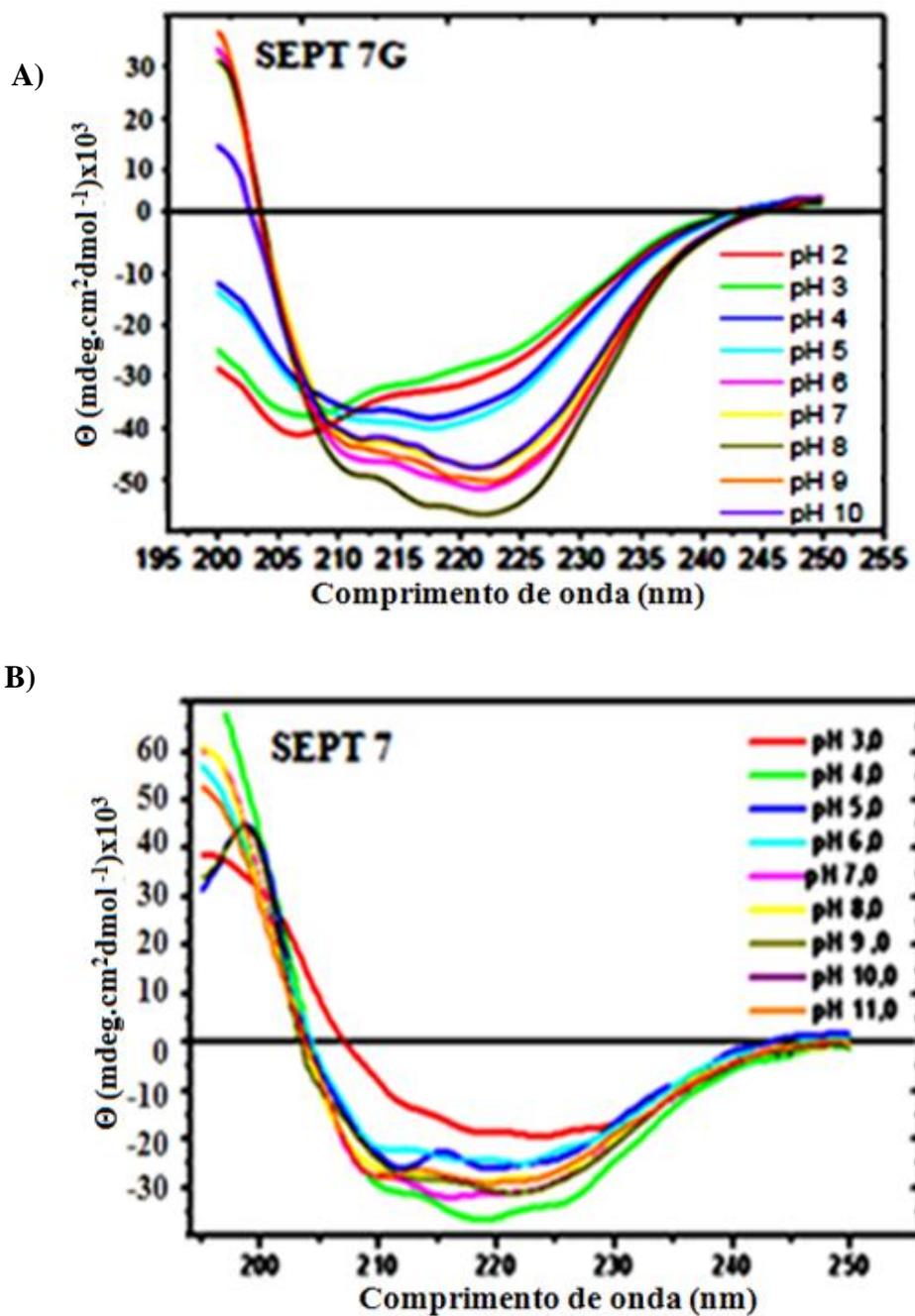


Figura 4.24 – Espectros de CD no UV distante da proteína em função do pH, monitorados a temperatura de 18°C. A) Espectros da SEPT 7G em diferentes pHs (2,0 a 11,0). B) Espectro da SEPT 7 em diferentes pHs (3,0 a 11,0). As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL variando o comprimento de onda de 193 a 250nm.

Os espectros das SEPT 7G indicam que essas moléculas apresentam estabilidade e conservação de suas estruturas secundárias, quando submetidas a variações de pH na faixa entre 6,0 e 8,0. Em pHs inferiores e superiores a esse intervalo é evidente a perda de estruturas secundárias, mostrando que a proteína é sensível a variações de pH, sendo estável apenas em torno do seu pH ótimo.

A SEPT 7 apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH (pH 5,0 – pH 10,0), sofrendo apenas alteração em pHs ácidos. Esses resultados confirmam os dados de CD em função da temperatura, mostrando que a proteína inteira é mais estável do que o seu domínio GTPase em função da variação de pH.

4.4.2 Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD) das SEPT 9G

O espectro experimental de dicroísmo circular no UV distante da septina humana SEPT 9G em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8, a 18°C e o calculado são mostrados na figura 4.25. Os dados indicam a presença de um alto conteúdo de hélices- α na estrutura secundária, como evidenciado pela forte elipticidade negativa ao redor de 210 nm e 220 nm.

Utilizando o pacote de programas CDPPro (89, 90), a desconvolução do espectro foi feita baseada em um banco de dados de 48 proteínas.

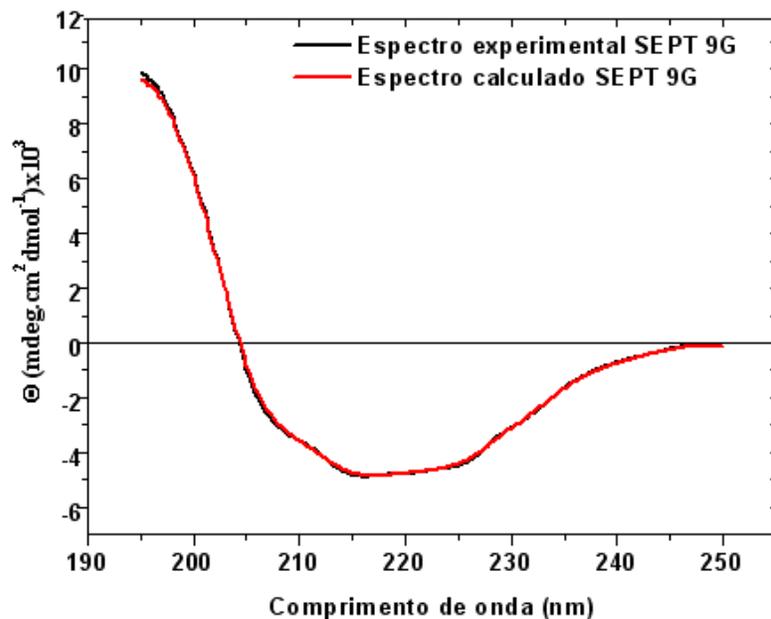


Figura 4.25 – Espectro de CD da proteína SEPT 9 GTPase em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,8 a 18°C. A desconvolução do espectro mostrou a seguinte proporção de estruturas secundárias: 35 % de hélice- α , 23% de folhas- β , 25% voltas e 20% de estruturas irregulares.

Essa análise mostrou que a proteína é constituída de estruturas secundárias na proporção de: 32% de hélice- α , 23% de folhas- β , 22 de voltas e 20% de estruturas irregulares. Os resultados obtidos na desconvolução do espectro de CD e por meio da predição de estrutura secundária estão de acordo. Assim esse domínio é formado por uma mistura de estruturas α/β , similar ao observado em muitas GTPases.

Para estudar a estabilidade estrutural da SEPT 9G frente à temperatura e pH, amostras da proteína foram submetidas ao dicroísmo circular com variação de temperatura e em diferentes pHs.

Esses estudos foram feitos variando a temperatura de 10°C a 90°C, em intervalos de 5°C (figura 4.26). A molécula foi incubada por 15 minutos em cada temperatura e os espectros foram registrados entre o comprimento de onda de 205 a 250nm, com uma média de 16 varreduras.

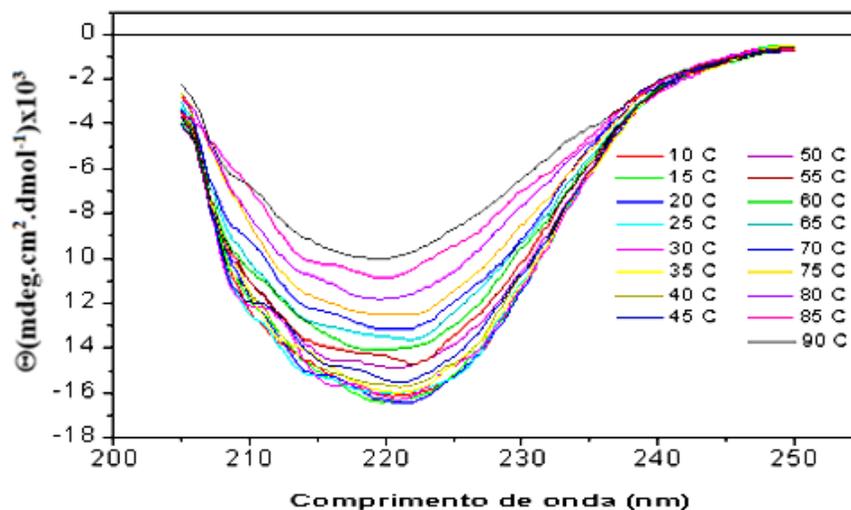


Figura 4.26 – Espectro de CD registrado de 205 a 250nm, mostrando o efeito da temperatura sobre a SEPT9 G. A temperatura investigada variou de 10°C a 90°C em intervalo de 5°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado ao aparelho.

A análise dos espectros de CD na SEPT 9G em função da temperatura indica que molécula apresenta estabilidade térmica na faixa de temperatura de 10 °C a 45 °C, pois nesta faixa os padrões dos espectros são mantidos, ocorrendo apenas diminuição da intensidade destes. Em temperaturas superiores a 50°C, ocorre nas bandas uma diminuição significativa de intensidade indicando perda de estrutura secundária.

A partir do monitoramento em 220nm dos espectros de CD das diferentes temperaturas, foi plotado um gráfico de transição entre a estrutura enovelada e a desenovelada da SEPT 9G (figura 4.27).

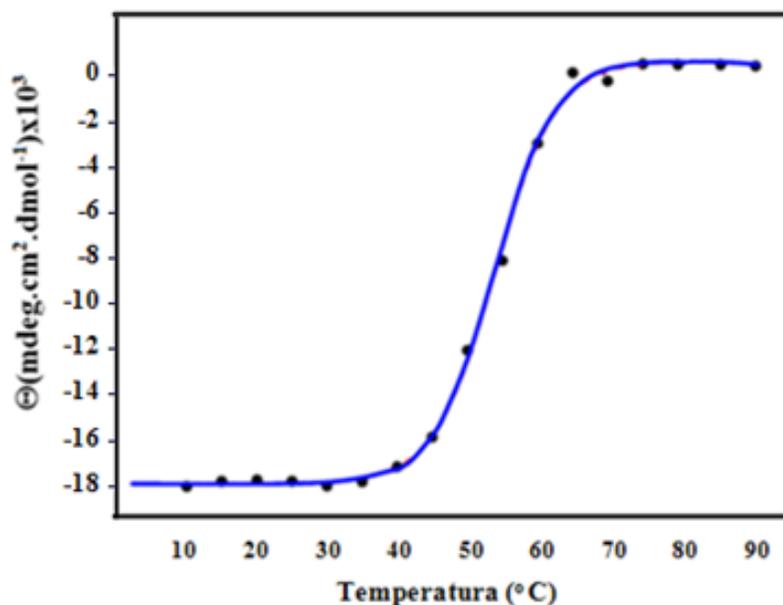


Figura 4.27 – Curva de transição em função da temperatura do domínio GTPase da septina humana 9, monitorada no comprimento de onda de 200nm.

A análise da Figura 4.27 mostra uma diminuição da intensidade da banda em 220nm com o aumento da temperatura indicando uma relação direta entre essa variável e a proteína. Assim, esses dados sugerem que não ocorre uma estrutura intermediária durante o processo de desnovelamento que se inicia a partir de 55°C.

A estabilidade estrutural do domínio GTPase da septina 9 humana (SEPT 9G) foi analisada também por dicroísmo circular em função dos diferentes pHs. Os espectros de CD obtidos mostram que a proteína é estável na faixa de pH 6,0 a pH 9,0, sofrendo processo de desnovelamento nos pHs extremos. Estes dados são mostrados na figura 4.28.

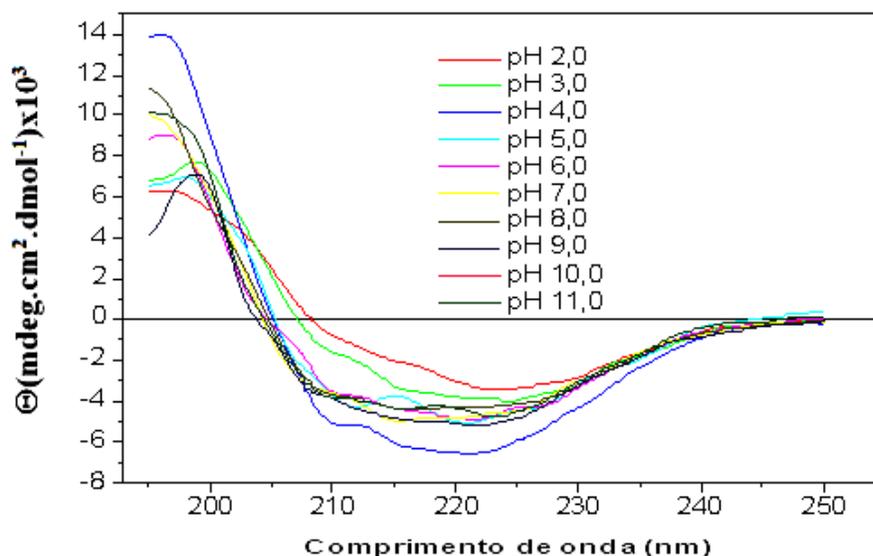


Figura 4.28 – Espectros de CD no UV distante da SEPT 9G em diferentes pHs (2,0 a 11,0) a 18°C. As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL variando o comprimento de onda de 193 a 250nm.

Esses dados de temperatura e pHs da SEPT 9G mostram que sua estruturas secundárias são mantidas em uma ampla faixa de condições físicas e químicas.

4.5 Espalhamento de luz a ângulo fixo

4.5.1 Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 7 e SEPT 7G

Medidas de espalhamento de luz a ângulo fixo foram realizadas para avaliar a agregação das proteínas em função da temperatura. As amostras foram submetidas à luz de comprimento de onda de 350 nm, e a intensidade do espalhamento foi coletada no mesmo comprimento de onda, em um ângulo fixo de 90°.

A figura 4.29 mostra os espectros de intensidade das septinas SEPT 7 e SEPT 7G em função do tempo e da temperatura. As medidas foram feitas com amostras nas temperaturas de 15°C, 37°C, 45°C e 60°C.

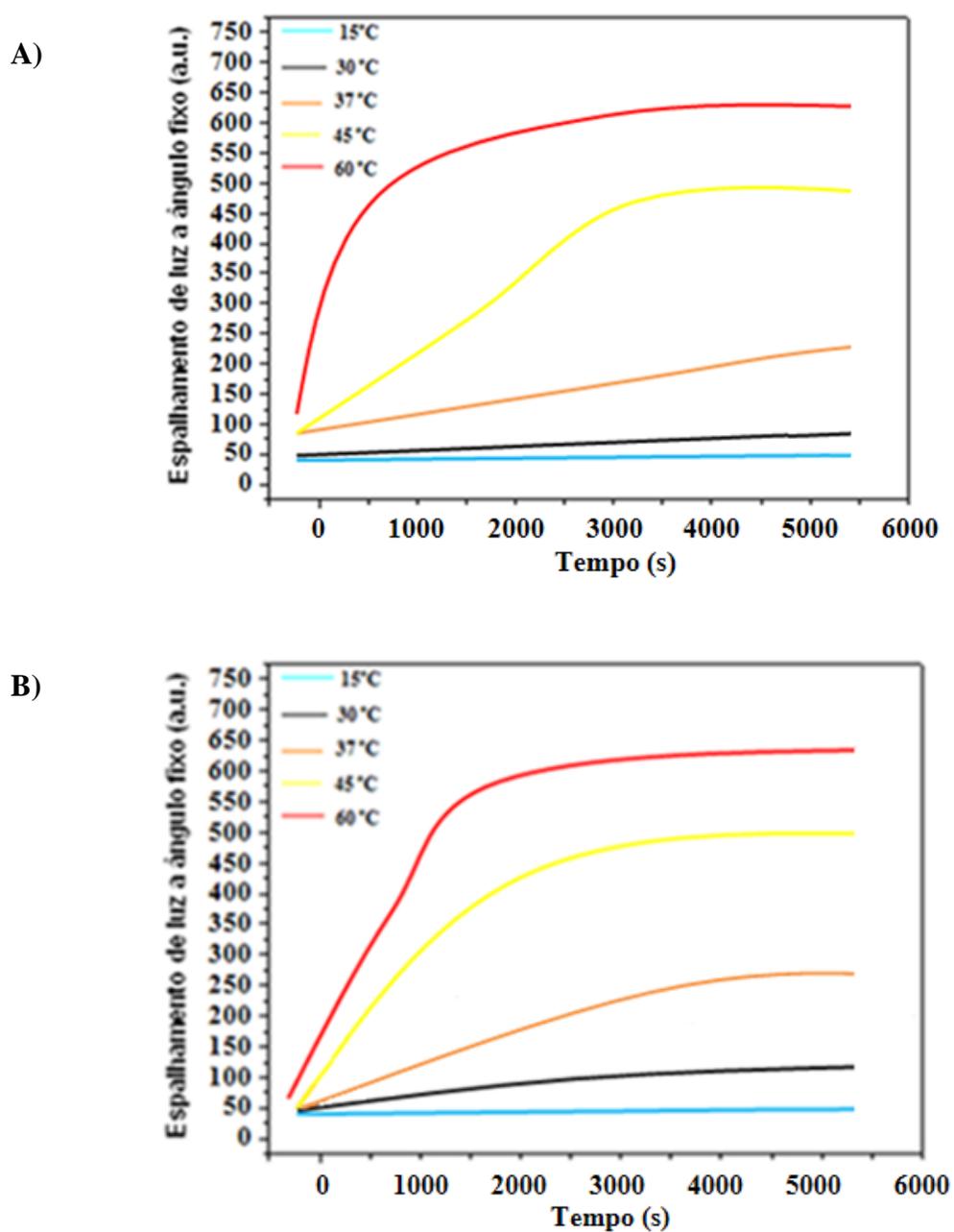


Figura 4.29 – Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 7 (A) e seu domínio GTPase (B), em função da temperatura. O comprimento de onda usado foi 350 nm e a intensidade do espalhamento foi monitorada durante 5400 segundos.

A intensidade da luz espalhada na SEPT 7 e SEPT 7G permaneceu constante entre 15°C e 30°C durante o intervalo da medida, indicando que essas proteínas não agregam nessas condições. Entretanto, na faixa de temperatura de 37°C a 60°C a intensidade da luz espalhada

aumentou ao longo do tempo, chegando, no máximo, em 60°C e permanecendo constante a partir desse ponto.

Esses dados indicam que há relação com o aumento da temperatura e a formação de agregados em solução. A SEPT 7G mostrou uma maior tendência em formar agregados, pois apresentou maior espalhamento de luz a partir de 30°C sugerindo que o domínio C-terminal das septinas favorece a estabilidade dessas moléculas evitando a agregação entre elas.

4.5.2 Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 9G

A SEPT 9G foi submetida às mesmas condições que a septina 7 humana para investigar a agregação da proteína em função da temperatura. A figura 4.30 mostra os espectros de intensidade das septinas em função do tempo e da temperatura.

A análise do espectro indica que entre 15 °C e 37 °C a proteína é estável, não formando agregados, pois a intensidade do espalhamento permanece baixa. Em temperaturas superiores a 45 °C, a molécula começa a formar agregados, chegando a um máximo de luz espalhada em 60°C e permanecendo constante a partir desse ponto.

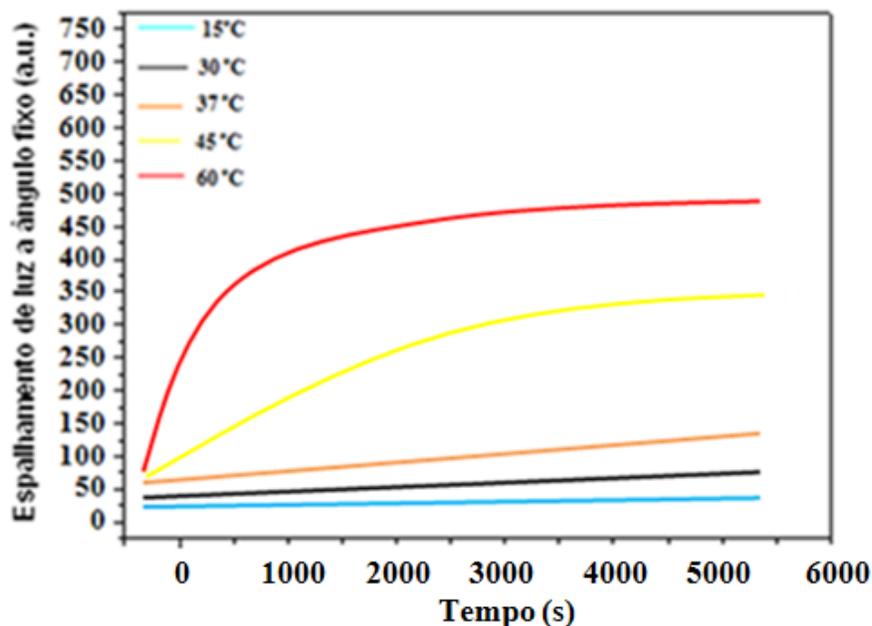


Figura 4.30 – Espalhamento de luz a ângulo fixo da SEPT 9G em função da temperatura. O comprimento de onda usado foi 350 nm e a intensidade do espalhamento foi monitorada durante 5400 segundos.

Assim, esses dados mostram que há também uma relação com o aumento da temperatura e a formação de agregados em solução para essa proteína.

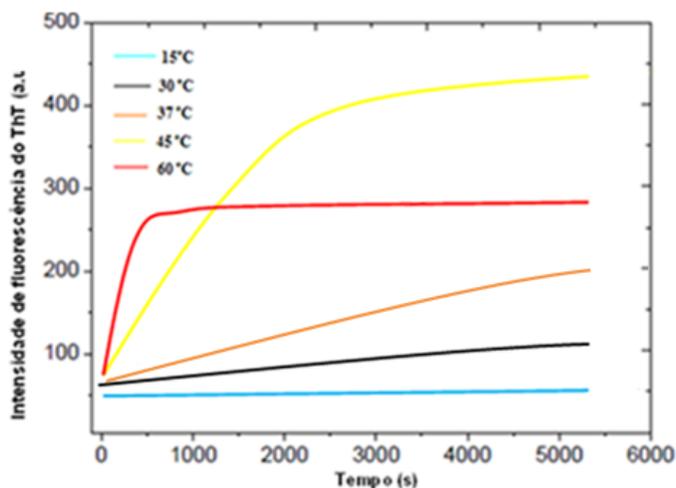
4.6 Estudos de fluorescência: emissão de fluorescência do fluoróforo Thioflavin-T

4.6.1 Estudos de emissão de fluorescência do fluoróforo (ThT) das SEPT 7 e SEPT 7G

As proteínas SEPT 7 e SEPT 7 G foram incubadas com o fluoróforo Thioflavina-T (ThT), que é utilizado para investigar as estruturas amiloides pois, essa molécula não se liga a agregados amorfos.

Com o objetivo de investigar a formação de agregados em função da temperatura, as medidas foram realizadas nas mesmas temperaturas em que foram feitas as medidas de espalhamento de luz a ângulo fixo. A figura 4.31 mostra a emissão de fluorescência em 482 nm do ThT na presença de SEPT 7 e SEPT 7G.

A)



B)

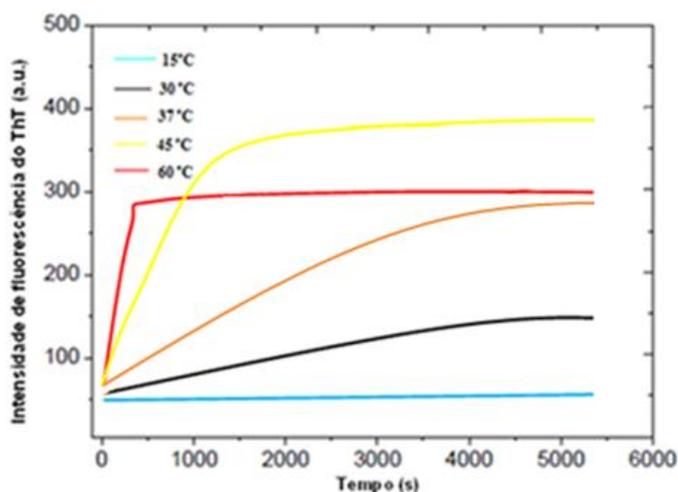


Figura 4.31 – Emissão de fluorescência do ThT ligado à SEPT 7 (A) e a seu domínio GTPase (B), em função da temperatura. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm durante um intervalo de tempo de 5400 segundos.

A intensidade de emissão dos espectros de fluorescência das septinas aumentou em um padrão aparentemente sigmóide em função da temperatura, mostrando a relação nesta da formação de agregados.

O espectro das SEPT 7 e SEPT 7G apresenta praticamente o mesmo padrão de formação de agregados em função da temperatura. Entretanto, o espectro da medida a 45°C - maior intensidade de fluorescência - do domínio GTPase mostra que esse atingiu um valor constante de intensidade mais rápido que a septina completa, assim agregando primeiro que a que a proteína com todos os seus domínios.

Estes dados juntos com os dados de espalhamento de luz a angulo fixo sugerindo que o C-terminal favorece a estabilidade diminuindo a formação de agregados na proteína.

4.6.2 Estudos de emissão de fluorescência do fluoróforo (ThT) das SEPT 9G

A reação foi preparada nas mesmas condições que as septinas 7 humanas para as médias de emissão de fluorescência do fluoróforo thioflavin-T incubado com SEPT 9G .Os espectros destas medidas (4.32) mostraram que essa proteína também é dependente temperatura pois, essa variável promoveu maior agregação das moléculas aumentando a intensidade da medida.

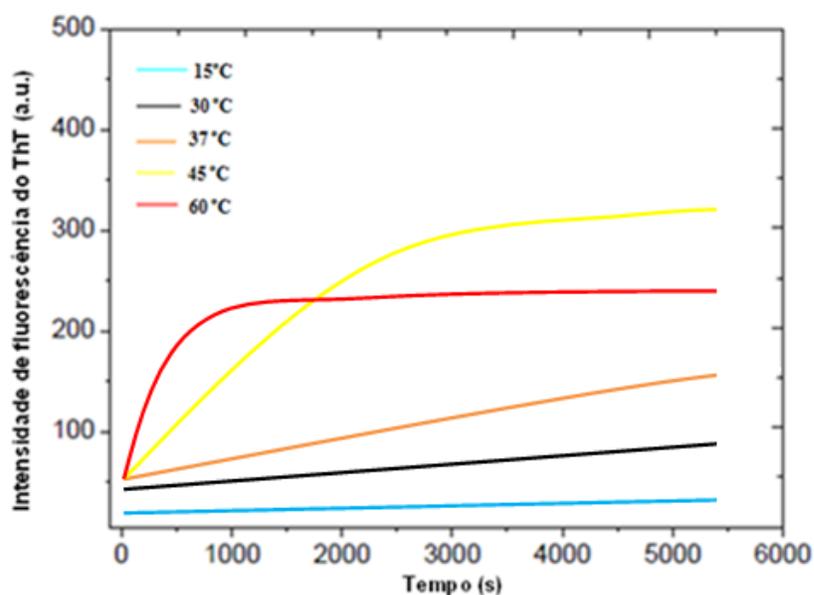


Figura 4.32 – Emissão de fluorescência do ThT ligado a SEPT 9G em função da temperatura. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 482 nm durante um intervalo de tempo de 5400 segundos.

A baixa intensidade do sinal na temperatura de 15°C indica que não há formação de agregados. O espectro atinge seu máximo de emissão a 45°C. Assim, em temperaturas biológicas a molécula encontra-se solúvel, formando poucos agregados.

Em temperaturas acima de 60°C um rápido aumento da emissão de fluorescência é observado durante os primeiros minutos em todas as amostras (SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G), o que é seguido por uma redução na intensidade de emissão devido ao fato de as proteínas precipitarem.

Todas as proteínas formam estruturas do tipo filamentos amiloides, sugerindo que apenas o domínio GTPase é necessário e suficiente para a formação desses filamentos, pois, em todos os casos, o ThT ligou-se aos agregados, o que é um comportamento comum de estruturas amiloides.

4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Com o objetivo de obter informações a respeito da estrutura terciária da SEPT 7G, medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS foram realizadas.

As curvas de 1mg/ml (Gnom 1) e 7 mg/ml (Gnom 2) mostradas na figura 4.33 possuem basicamente o mesmo perfil de espalhamento, assim os dados da proteína de maior concentração foram utilizados para a análise por apresentar uma maior resolução. Diferentes versões do programa Gnom foram utilizadas, pois cada versão tem melhor resultado em uma faixa de concentração da proteína.

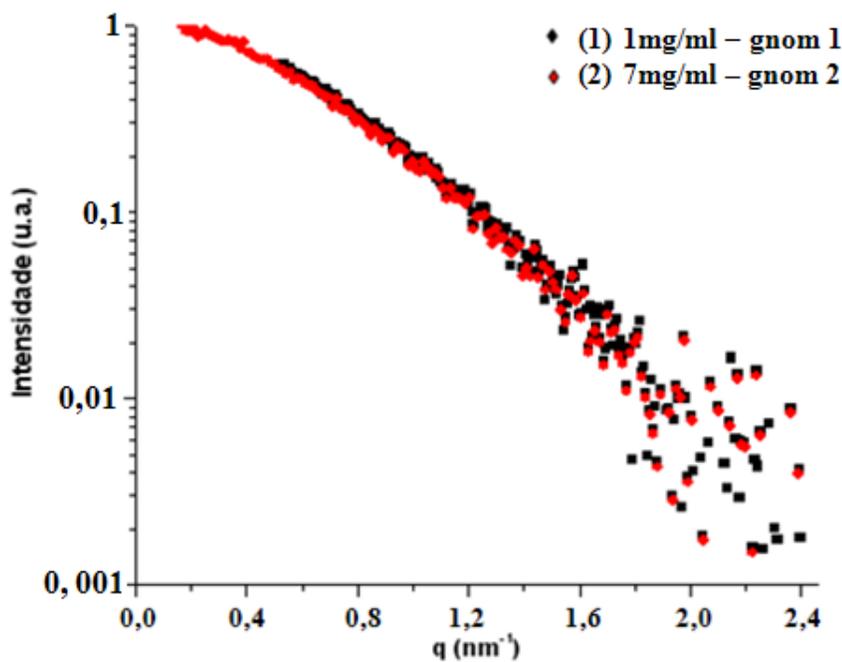


Figura 4.33 – Curvas de espalhamento da proteína SEPT 7G corrigidas pelo efeito de smearing, (1) 1 mg/ml – Gnom 1 e (2) 7 mg/ml – Gnom 2.

A análise dos dados de SAXS indica que o momento de transferência da curva de espalhamento foi de $0,2 \text{ nm}^{-1} < q < 2,4 \text{ nm}^{-1}$, possibilitando uma resolução de 2.4 nm.

A curva da função de distribuição de distâncias $p(r)$ pode ser vista na figura 4.34, mostrando que esse gráfico não contém parte negativa no eixo das abscissas, o que indica ausência de efeitos de interferência produzidos por correlações espaciais interpartículas.

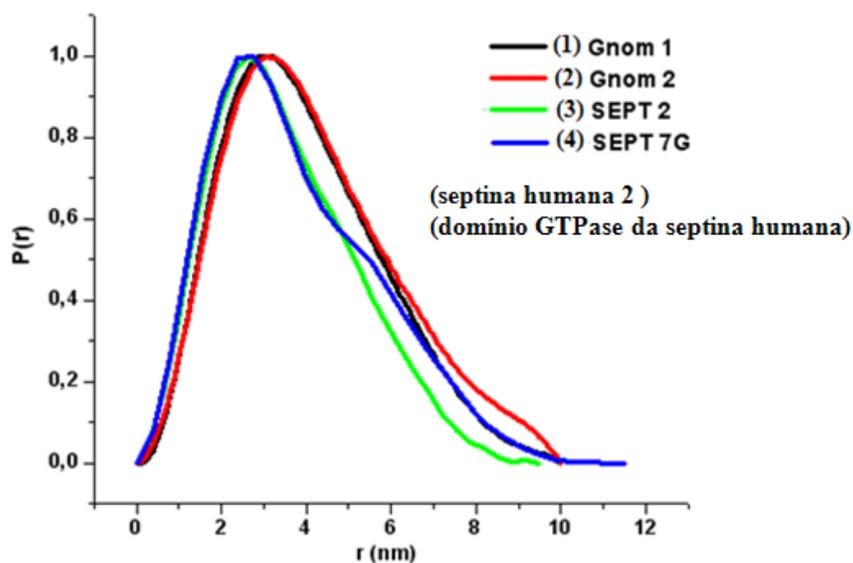


Figura 4.34 – Função de distribuição de distâncias evoluídas a partir das curvas de espalhamento utilizando o programa Gnom. (1) Gnom 1, (2) Gnom 2, (3) SEPT 2 - proteína de referência (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, *et al.*, 2007) e (4) SEPT 7G.

Por meio do programa Gnom foi possível obter a dimensão máxima da molécula (D_{\max}) e o raio de giração (R_g) que são, respectivamente, 10nm e 3nm.

O modelo tridimensional gerado por homologia com a SEPT 2 (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, *et al.*, 2007) sobre o PDB é mostrado da figura 4.35. Os dados desse modelo de baixa resolução foram obtidos pela técnica de SAXS por meio do procedimento *ab initio*.

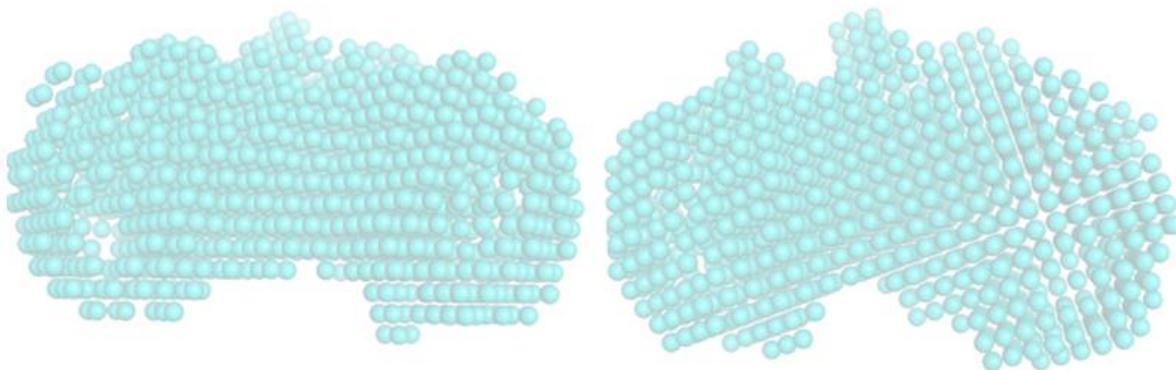


Figura 4.35 – Modelo tridimensional de baixa resolução da SEPT 7G usando procedimento *ab initio* por meio do programa Gasbor. As duas imagens são diferentes ângulos da mesma figura.

4.8 Ensaios de Cristalização

Antes de testar as condições de cristalização, alíquotas das amostras eram submetidas ao espalhamento dinâmico de luz (DLS). Assim, apenas soluções de proteínas monodispersas e homogêneas eram submetidas aos ensaios de cristalização.

Em 282 condições testadas, os primeiros resultados dos ensaios de cristalização apareceram a partir de 10 dias, com uma concentração de proteína de 7mg/ml utilizando os kits Crystal Screen (Hampton Research), mantendo as amostras a 18°C. Na condição 0,1M Tris pH 8,5, 1,5M de sulfato de amônio e 12% v/v glicerol (fatorial 42 do Crystal Screen 2) foram observados na câmera de cristalização os primeiros pontos de nucleação e pequenos cristais (figura 4.36).

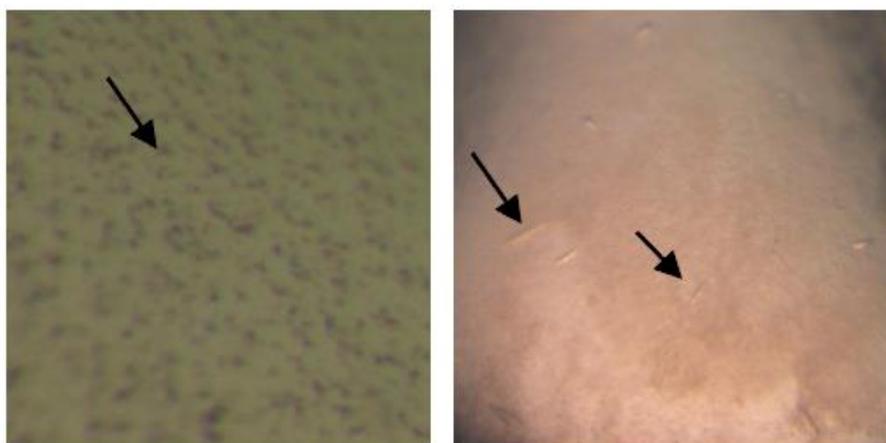


Figura 4.36 – À esquerda: a seta indica os pontos de nucleação encontrados no ensaio. À direita: as setas indicam os cristais formados nos primeiros ensaios de cristalização.

Os cristais observados são pequenos, no entanto, foi possível a realização da coleta, análise e confirmação de que essas amostras são cristais de proteína.

Após refinamento, melhores cristais foram obtidos em tais condições: 0,1M Tris; pH 8,4; 16% glicerol; 1,5M sulfato de amônio; 12,5% Isopropanol, 500mM GDP (figura 4.37).



Figura 4.37 – As setas indicam os cristais do domínio GTPase da septina 7 humana (SEPT 7G) obtido através da técnica de difusão de vapor em gotas suspensas com 0,1M Tris; pH 8,4; 16% glicerol; 1,5M sulfato de amônio; 12,5% Isopropanol, 500mM GDP. Dimensão típica de 0,2 x 0,2 x 0,2mm.

As análises dos cristais indicam que esses pertencem ao grupo de simetria espacial, $P6_122$. As estatísticas do processamento de dados estão mostradas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros do cristal e estatísticas do processamento de dados.

Parâmetros da coleta de dados	
Grupo Espacial	$P6_122$
Dimensões da cela unitária (Å)	$a=b=83,67$; $c=213,74$ $\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$
Detector	Mar Mosaic 225
Fonte de raios-X	MX2 – LNLS – Brasil
Comprimento de onda (Å)	1,43
Faixa de resolução (Å)	106,6-4,0 (4,22-4,0)

*Continua

*Continuação

Redundância	8,2 (8,5)
Rmeans (%)	12,5 (70,1)
Rsym (%)	11,6 (65,9)
Completeza (%)	99,9 (99,9)
Total de reflexões	36360 (4974)
Reflexões únicas	4204 (586)
I/ σ I	14,7 (3,3)
Parâmetros de refinamento	
R (%)	39,43
Rfree (%)	39,43

4.9 Resolução Estrutural

Para a resolução da estrutura cristalográfica do domínio GTPase da septina 7 humana foi empregado o método da substituição molecular, implementado no programa AMORE/MOLREP (94), e as coordenadas atômicas disponíveis no PDB (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, *et al.*, 2007). Assim, foi possível obter uma resolução de 3.4 Å da proteína (figura 4.38).

A baixa resolução desta estrutura deve-se ao fato de existir uma cauda de poli-histidina e um sítio de clivagem para a enzima AC-TEV Protease – de 17 resíduos - que está em uma disposição aleatória, dificultando a qualidade dos dados medidos e, conseqüentemente, a resolução estrutural da proteína.

Outro problema pode estar relacionado às características biofísicas intrínsecas à proteína, pois essas moléculas são conhecidas desde a década de 70 e há poucas informações estruturais na literatura. Isto é devido, principalmente, a dois fatores: dificuldade das proteínas se expressarem na forma solúvel e problemas na obtenção de estruturas cristalinas.

Assim, esses dados cristalográficos irão acrescentar novas informações estruturais importantes a respeito da família destas proteínas que apresentam uma literatura escassa sobre o assunto.

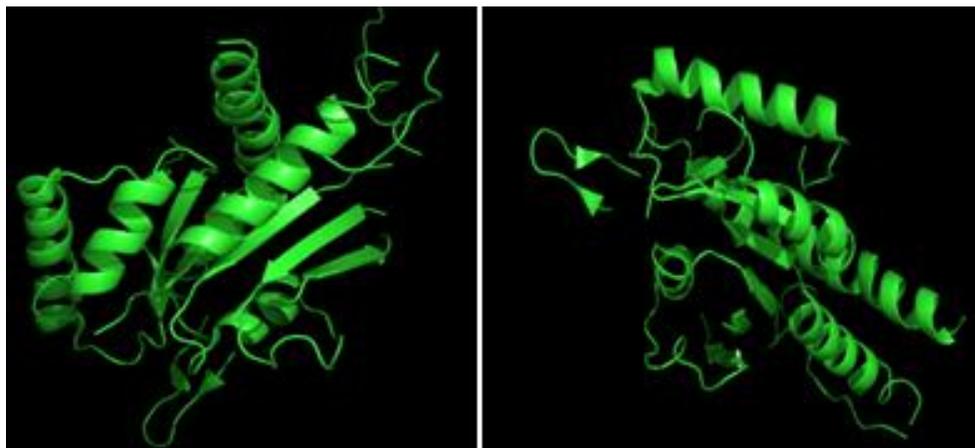
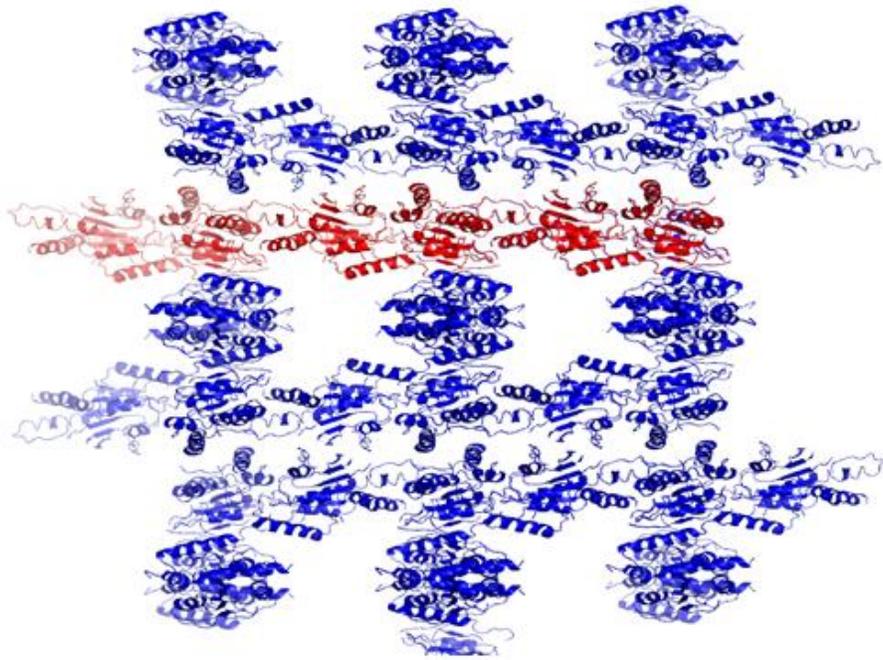


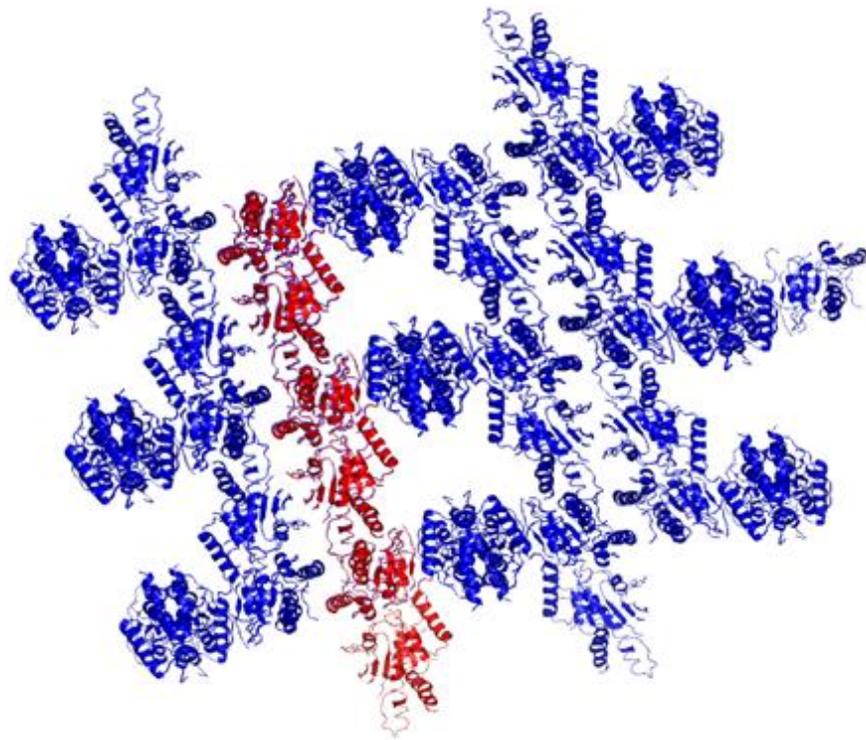
Figura 4.38 – Resolução estrutural da SEPT 7G de 3.4Å. Foi feita a substituição molecular com os dados cristalográficos do complexo 2-6-7 (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, *et al.*, 2007). As imagens ilustram duas disposições diferentes da mesma estrutura.

A análise dos dados da resolução estrutural da SEPT 7G mostra um aspecto interessante em relação ao empacotamento das moléculas no retículo cristalino, à forma de sua célula unitária e ao grupo espacial - P6₁22. Pois, esse conjunto de dados apresenta uma simetria em relação a sua célula assimétrica e, conseqüentemente, isso se repete por toda a estrutura do cristal. A figura 4.39 mostra essa estrutura em diferentes ângulos.

A)



B)



*Continua

*Continuação

C)

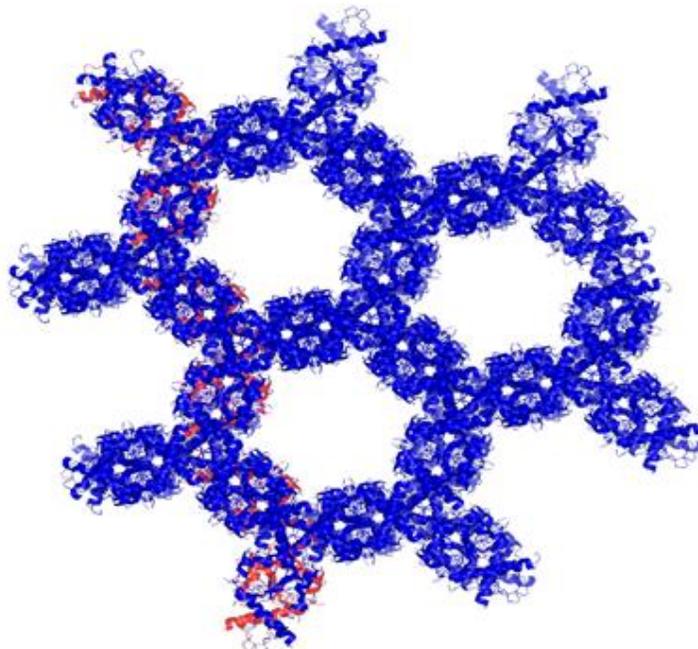


Figura 4.39 – (A) Resolução estrutural da SEPT 7G a 3,4 Å, evidenciando a simetria das moléculas dentro do retículo cristalino. (B) A imagem anterior (A) da estrutura cristalográfica em um ângulo em 90° em relação a um dos eixos. (C) A estrutura cristalográfica em (B) em um ângulo em 90° em relação a um dos eixos perpendiculares ao anteriormente rodado.

Essa figura sugere que a cristalização da SEPT 7G ocorreu como a cristalização dos filamentos homo-oligoméricos entre domínios GTPase da proteína.

4.9.1 Análise dos dados de cristalografia e SAXS

As análises dos dados estruturais obtidos pela técnica de SAXS e cristalografia mostram que o domínio GTPase da proteína septina 7 se organiza de maneira a formar filamentos oligoméricos, que, em solução, se apresentam na forma dimérica. Este arranjo também foi determinado pelas técnicas de cromatografia de exclusão molecular e o gel nativo na SEPT 7G.

Estes resultados estão de acordo como os dados cristalográficos do complexo de Septinas 2-6-7 (Low e Macara, 2006; Sirajuddin, *et al.*, 2007) e previstos pelas interações dos domínios GTPase entre as Septinas (Low e Macara, 2006).

O modelo cristalográfico gerado por homologia foi posicionado de maneira não ambígua dentro do modelo de baixa resolução da proteína. A figura 4.40 mostra a sobreposição dos modelos em diferentes ângulos. Para o alinhamento dessas estruturas utilizou-se o programa SUPCOMB.

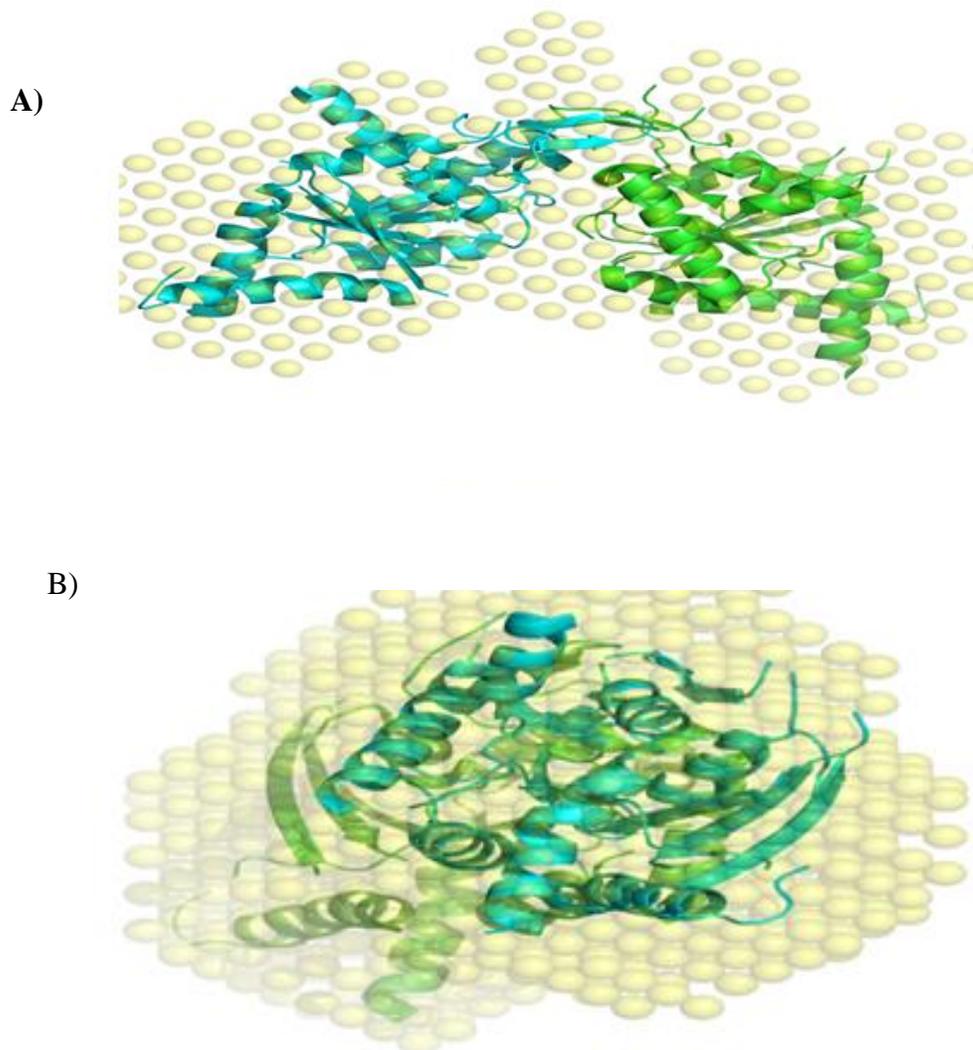


Figura 4.40 – (A) Modelo gerado pelos dados obtidos pela técnica de SAXS sobreposto ao modelo cristalográfico obtido do domínio GTPase da septina 7 humana. (B) O mesmo modelo de SAXS anterior sobreposto ao cristalográfico da SEPT 7G, em um ângulo de 90° em relação ao outro.

A superposição estrutural do modelo *ab initio* à estrutura dimérica cristalográfica da septina não deixa qualquer dúvida de que a proteína é de fato um dímero em solução.

4.10 Técnicas computacionais

4.10.1 Determinação de parâmetros biofísicos dos recombinantes

Características biofísicas importantes das septinas humanas e seus domínios (SEPT 7, SEPT 7GTPase, SEPT 9, SEPT 9GC) foram obtidas com um conjunto de programas do ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://ca.expasy.org>), veja tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Parâmetros das septinas SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G. Massa molecular (M.M), coeficiente de extinção teórico (ϵ), ponto isoelétrico (pI), resíduos fluorescentes (R) e número de aminoácidos (aa).

	MM (KDa)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	pI	R	aa
SEPT 7	48,7	34,38	8,76	3W 14F 12Y	418
SEPT 7G	31,0	24,41	6,22	2W 10F 9Y	271
SEPT 9GC	33,6	21,68	6,56	2W 13F 7Y	291
SEPT 9G	31,7	21,68	8,23	2W 13F 7Y	273

Os dados mostrados na tabela 4.3 foram obtidos por meio das sequências de aminoácidos das septinas 7 e 9 humanas (figura 4.41) depositadas no GenBank. A sequência em preto indica o C-terminal, em vermelho o domínio GTPase e em azul o N-terminal de cada proteína recombinante.

SEPT 7: MVAQQKNLEGYVGFANLPNQVYRKSVKR**GFEFTLMVVGESGLGKSTLINSLFTDLYSPEYPGPSHRIK**
KTVQVEQSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPGFGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDN
RVQCCLYFIAPSGHGLKPLDIEFMKRLHEKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKKQIMKEIQEHKIKIYEF
ETDDEEENKLVKKIKDRLPLAVVGSNTIEVNGKRVGRQYPWGVAEVENGEHCDFILRNMLIRTH
MQEMEMEQVFEMKVKEKVQKLDSEAEQRRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQ
QRILEQQNSSRTLEKNKKKGKIF

SEPT 7G: **GFEFTLMVVGESGLGKSTLINSLFTDLYSPEYPGPSHRIKKTVQVEQSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPGF**
GDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDNRVQCCLYFIAPSGHGLKPLDIEFMKRLH
EKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKKQIMKEIQEHKIKIYEFPETDDEEENKLVKKIKDRLPLAVVGSNTI
IEVNGKRVGRQYPWGVAEVENGEHCDFILRNMLIRTHMQ

SEPT 9GC: **GFEFNIMVVQSGLGKSTLINTLFKSKISRKSVQPTSEERIPKTIEIKSITHDIEEKGVRMKLTVIDTPGF**
GDHINNENCWQPIMKFINQYKYLQEEVNNRKKRIPDTRVHCCLYFIPATGHSLRPLDIEFMKRLS
KVVNIVPVIKADTLTLEERVHFKQRITADLLSNGIDVPQKFEDESEDRLVNEKFREMIPFAVVGSDH
EYQVNGKRILGRKTKWGTIEENTHCEFAYLRLDILLIRTHMQNIKDITSSIHFEAYRVKRLNEGSSAMA
NGVEEKEPEAPEM

SEPT 9G: **GFEFTLMVVGESGLGKSTLINSLFTDLYSPEYPGPSHRIKKTVQVEQSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPG**
FGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDNRVQCCLYFIAPSGHGLKPLDIEFMKRLH
EKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKKQIMKEIQEHKIKIYEFPETDDEEENKLVDLKDVNNVHYENYRS
RKLAAVT

Figura 4.41 – Sequências das proteínas recombinantes SEPT 7, SEPT 7G, SEPT 9GC e SEPT 9G. Em preto, o C-terminal; em vermelho, o domínio GTPase e em azul o N-terminal de cada proteína recombinante.

4.10.2 Modelagem molecular por homologia

Os estudos de modelagem estrutural por homologia realizados por meio do software modeller, resultaram na obtenção de modelos das proteínas alvo. A figura 4.42 mostra o modelo gerado por esse programa.

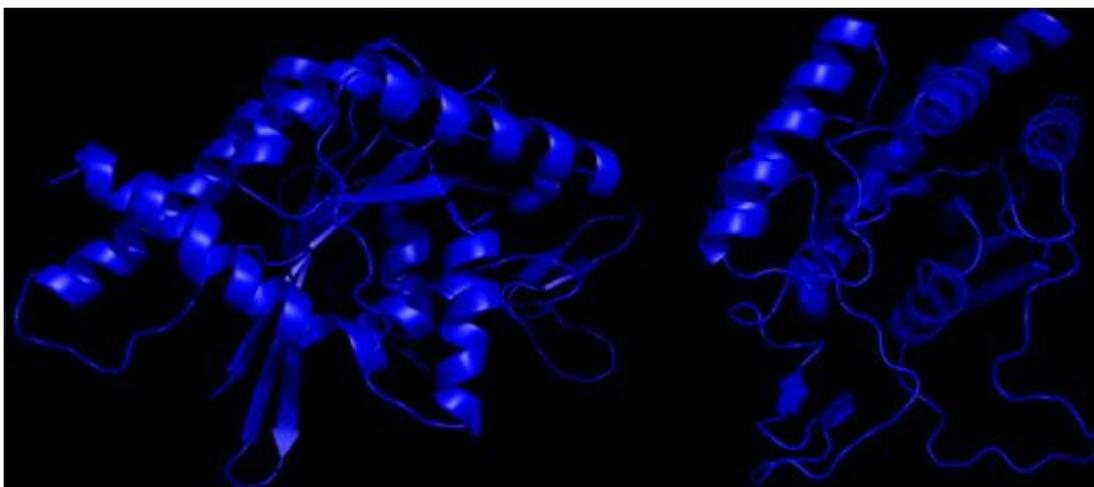


Figura 4.42 – Visualização do modelo gerado em duas posições diferentes. A estrutura apresenta conservação no enovelamento dos domínios GTPase das septinas.

Esse modelo predito por homologia foi sobreposto à estrutura do domínio GTPase da septina 7 humana obtida experimentalmente por difração de raios-X (figura 4.43). Isso foi realizado com objetivo de analisar as estruturas tridimensionais da proteína.

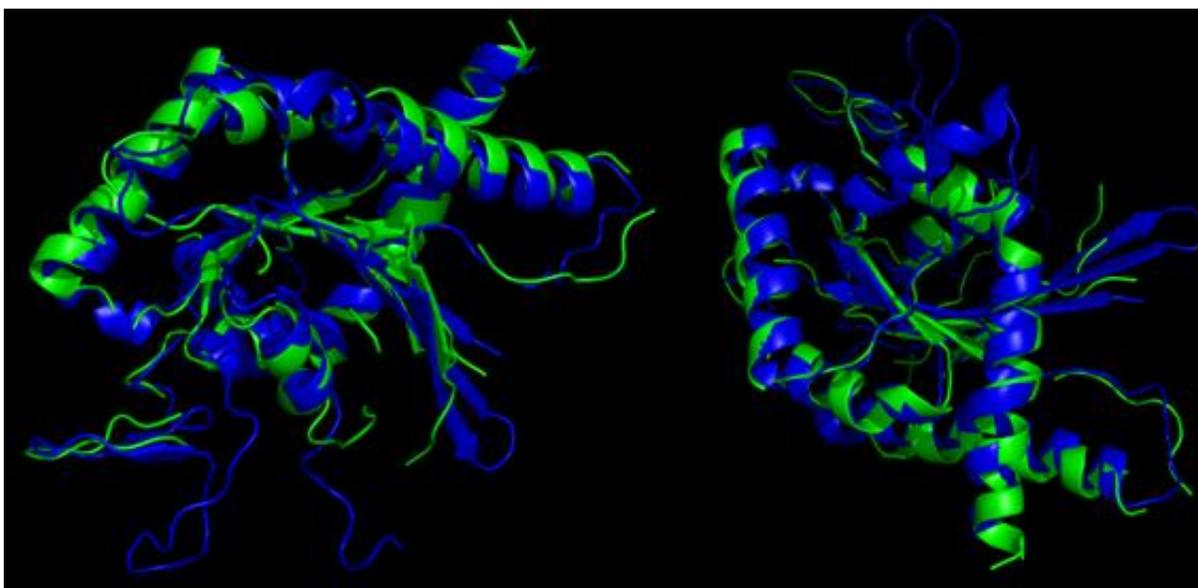


Figura 4.43 – Visualização do modelo gerado (azul) sobreposto ao modelo obtido experimentalmente (verde) em duas posições diferentes. Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo, refletindo nos valores RMS 2.41Å.

Observações desses dados mostram que a estrutura modelada condiz com os resultados experimentais de maneira satisfatória. Assim, foi possível identificar regiões de alças que não foram visualizadas no modelo experimental de baixa resolução, pois esse apresenta perda da densidade eletrônica nessas regiões.

Um segundo modelo foi gerado após serem feitos alguns ajustes em parâmetros limitantes estéreo-químicos (figura 4.44).

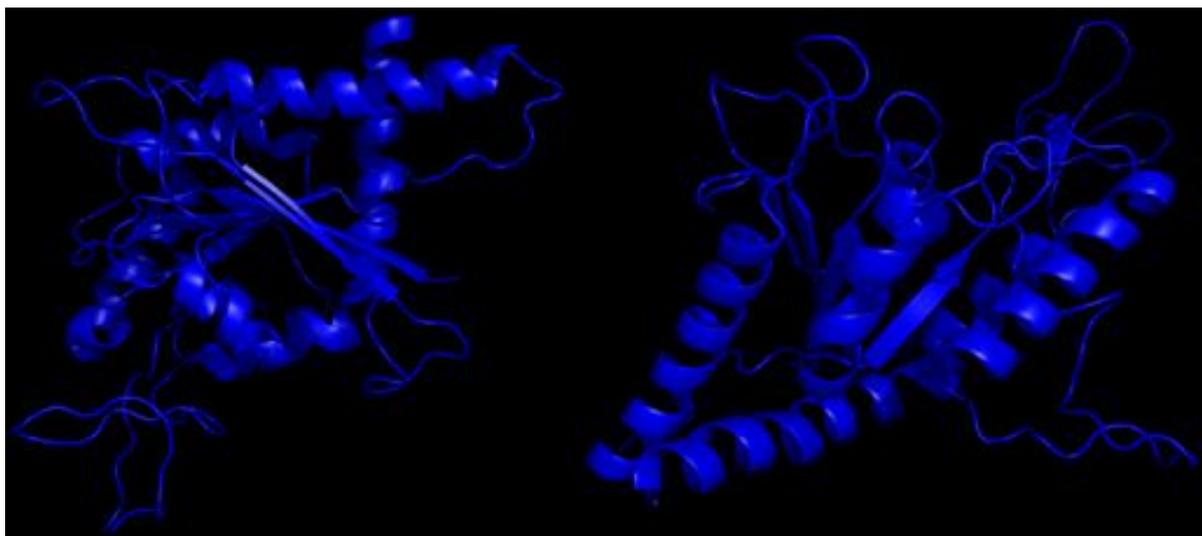


Figura 4.44 – Visualização do modelo gerado em duas diferentes posições. A estrutura apresenta conservação no enovelamento encontrado nos domínios GTPase das septinas.

Novamente, foram sobrepostos os resultados computacionais à estrutura obtida experimentalmente por difração de raios-X da SEPT 7G, com o objetivo de realizar análises comparativas nestes diferentes modelos (figura 4.45).

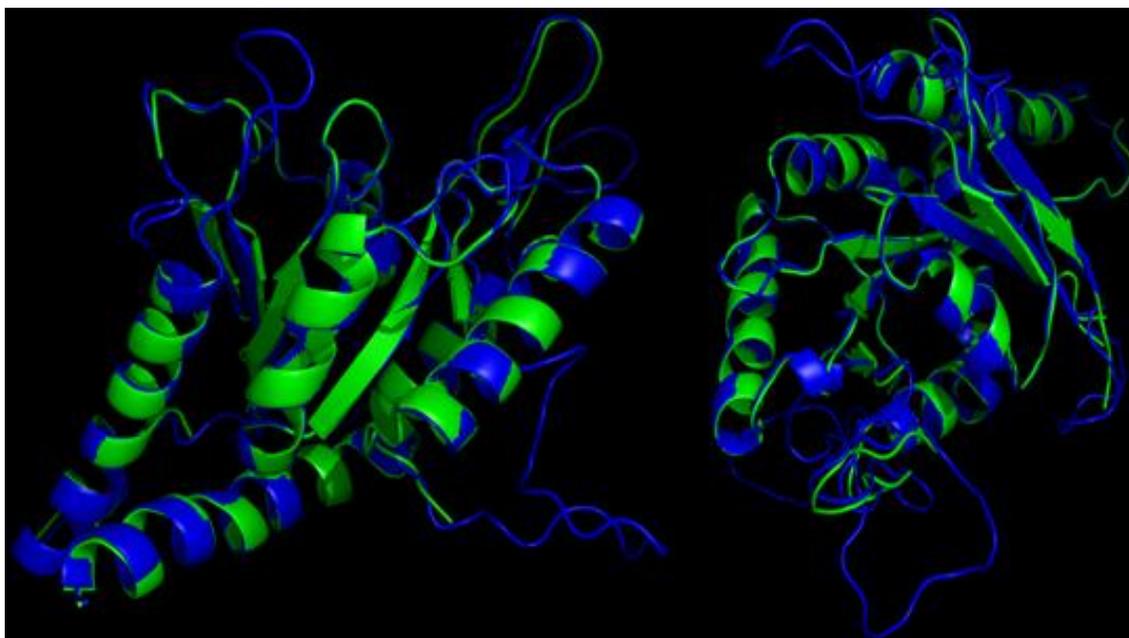


Figura 4.45 – Visualização do modelo gerado (azul) sobreposto ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde) em duas diferentes posições. Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo que reflete nos valores RMS 0.292Å.

A análise dos dados sobrepostos mostra que a estrutura modelada condiz com o modelo experimental de maneira satisfatória - analogamente ao obtido com o modelo anterior. Assim, foi possível determinar regiões flexíveis de baixa densidade eletrônica que não eram visualizadas nos padrões de difração. A confiabilidade desses dados é baseada no baixo valor de RMS (0.292Å) – desvio médio padrão das distâncias atômicas.

Essas informações sugerem que a baixa resolução obtida experimentalmente está vinculada a regiões críticas para o empacotamento cristalino, uma vez que por serem regiões com alta flexibilidade - alças e loops - não permitem contatos cristalinos efetivos. Isto conduz a uma orientação diferente para essas regiões em cada uma das moléculas. Assim a soma de todas as orientações possíveis para esses segmentos dentro do cristal acarreta na perda de densidade eletrônica durante o experimento de difração de raios-X.

Enfim, com os estudos de modelagem foi possível prever regiões estruturais - alças e loops - que apresentavam baixa densidade eletrônica no modelo cristalográfico na GTPase, formando o polipeptídeo completo, ou seja, sem cortes.

Análises de modelagem por homologia também foram feitas para a septina 7 humana completa, pois há poucas informações estruturais na literatura sobre essa proteína. A figura 4.46 mostra o modelo gerado pelo modeller da SEPT 7 utilizando-se os mesmos parâmetros dos estudos com a SEPT 7G.

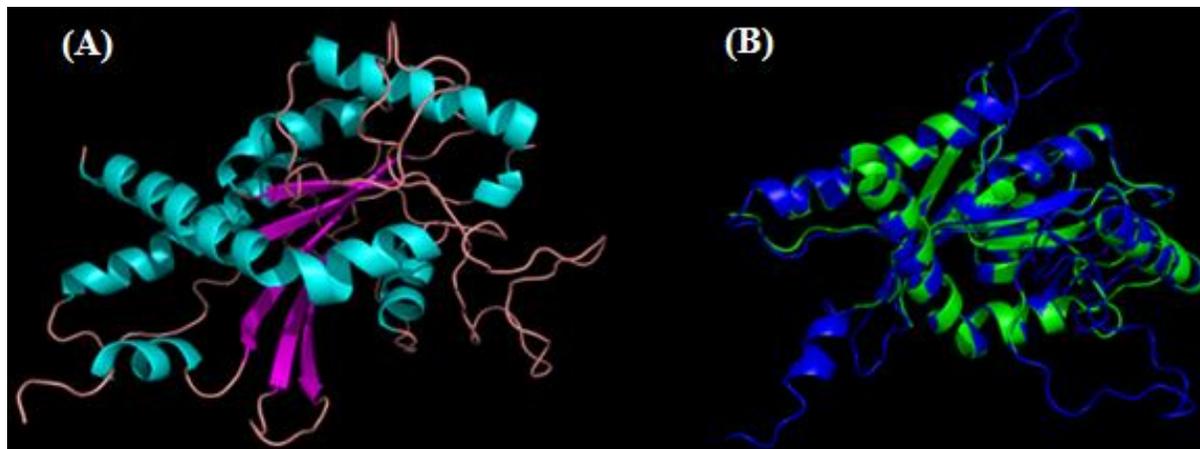


Figura 4.46 – (A) Visualização do modelo gerado. (B) Sobreposição ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde). Observa-se a conservação do enovelamento bem como da estrutura como um todo que reflete nos valores RMS 0.415Å.

Observações da sobreposição do modelo mostram a conservação da região GTPase com um alinhamento estrutural satisfatório, pois apresentou um baixo valor RMS - 0.415Å. A figura 4.47 mostra as regiões que não se alinham estruturalmente (destacada em vermelho) entre a construção GTPase obtida experimentalmente e o modelo gerado por homologia para a SEPT 7.

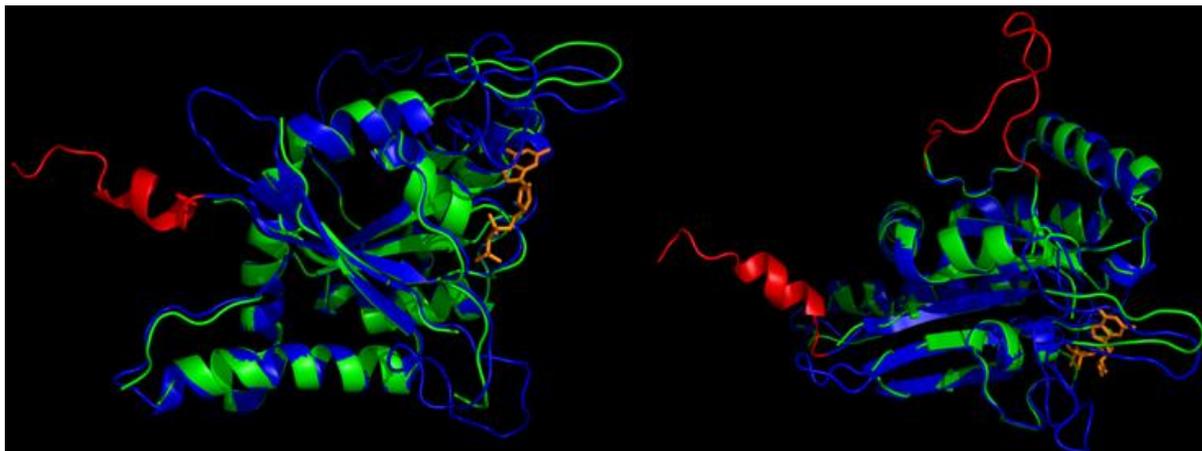


Figura 4.47 – Mostra em duas diferentes posições a sobreposição do modelo gerado (azul) ao modelo obtido experimentalmente da SEPT 7G (verde). Também são visualizados regiões de não sobreposição estruturais evidenciadas (vermelho) e o sítio de ligação à GDP (alaranjado).

Essa figura evidencia dois principais pontos: a conservação da região GTPase e a presença de estruturação secundária nos terminais presentes na septina 7 humana. O modelo ajuda a visualizar como seria a estruturação dessas regiões, uma vez que não há dados experimentais sobre essa construção com resolução necessária para observar tais regiões.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas análises estruturais e bioquímicas da septina 7 humana (SEPT 7) e seu domínio GTPase (SEPT 7G) e também dos domínios da septina 9 humana (SEPT 9GC e SEPT 9G). A importância em estudar essas proteínas é fundamentada no fato dessas moléculas estarem envolvidas com inúmeros processos fisiológicos e patológicos tais como: atividade GTPase, formação de filamentos e associação com membranas, tráfego de vesículas, apoptose, remodelamento de citoesqueleto, infecção, neurodegeneração e neoplasias.

Os dados estruturais e bioquímicos obtidos durante a pesquisa fornecem informações relevantes que podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação das septinas e na compreensão do papel destas proteínas nas funções biológicas descritas acima.

A clonagem de todas as construções foi realizada com sucesso no vetor de expressão pET-TV. As proteínas SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9 foram expressas e purificadas com êxito na forma solúvel, homogênea e em quantidades que possibilitaram as diferentes análises bioquímicas e espectroscópicas. Entretanto, não foi possível estabelecer um protocolo para a SEPT 9GC, pois esta molécula foi expressa na fração insolúvel do extrato bruto após a indução, sendo necessário mudar o sistema de expressão para essa construção em estudos futuros.

O teste de atividade GTPase por desnaturação química mostrou que as construções SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G ligam-se à GTP e hidrolisam-na a GDP. Assim, esse estudo evidenciou que essas proteínas foram purificadas na sua estrutura nativa e que a catálise e liberação do produto ocorrem na ausência de moléculas auxiliares.

As análises experimentais das estruturas secundárias das proteínas realizadas por difratação circular estão de acordo com a predição destas por meio de técnicas computacionais. Esses resultados indicam que ambas as septinas são compostas de uma mistura de α/β , como observado em outras moléculas da mesma classe.

Os estudos espectroscópicos de difratação circular e fluorescência das amostras em diferentes condições físico-químicas mostraram que a SEPT 7 apresenta maior estabilidade que a SEPT 7G. Essas análises sugerem que o C e o N terminais contribuem com a estabilidade - diminuindo a formação de agregados - e, possivelmente, com a função da proteína.

Esses resultados também indicaram que há relação com o aumento da temperatura e a formação de agregados das proteínas em solução.

As medidas de emissão de fluorescência do fluoróforo thioflavin-T mostraram que as proteínas SEPT 7, SEPT 7G e SEPT 9G formam estruturas do tipo filamentos amiloides. Esse dados sugerem que apenas o domínio GTPase é necessário e suficiente para a formação desses filamentos, pois, em todos os casos, o ThT ligou-se aos agregados, o que é um comportamento comum de estruturas amiloides.

Após inúmeros ensaios de cristalização foi possível obter cristais do domínio GTPase da septina 7 humana, esses pertencem ao grupo de simetria espacial P6₁22. Por meio do método da substituição molecular e das coordenadas atômicas disponíveis no PDB foi possível obter um modelo cristalográfico deste domínio em 3.4 Å.

Esse modelo tridimensional foi posicionado de maneira não ambígua dentro do modelo de baixa resolução da proteína (SAXS), mostrando que o domínio GTPase se organiza de forma dimérica em solução. Este arranjo também foi determinado pelas técnicas de cromatografia de exclusão molecular e o gel nativo da SEPT 7G. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos no complexo Septinas 2-6-7 (46) e com os estudos das interações dos domínios GTPases destas moléculas (33).

Por meio dos procedimentos de modelagem molecular com os dados cristalográficos obtidos foi possível visualizar as estruturas tridimensionais da molécula de maneira mais abrangente, não se atendo aos problemas experimentais de regiões flexíveis presentes na macromolécula. Assim, foi possível identificar regiões de alças e loops que não eram visualizadas no modelo experimental de baixa resolução, pois essas apresentam perda da densidade eletrônica.

Capítulo 6

PERSPECTIVA

6 PERSPECTIVA

Não foi possível realizar ensaios cristalográficos na septina 7 humana (SEPT 7), pois em altas concentrações, necessárias para os testes, ocorre a precipitação da proteína. Assim, as próximas etapas será a co-expressão dessa com outras septinas com o objetivo de aumentar a solubilidade da molécula. Essa linha de pesquisa já vem sendo feito por outros grupos que trabalham com septinas.

O domínio da septina 9 humana SEPT 9GC foi expresso de forma insolúvel, assim não foi possível realizar os estudos espectroscópicos e biofísicos. As próximas etapas será mudar o vetor de expressão e as condições para expressar essa molécula na fração solúvel do extrato bruto.

Após a obtenção das proteínas da SEPT 7 e da SEPT 9GC na forma solúvel e em quantidades suficientes, novos trabalhos terão como objetivo:

- realizar ensaios de atividade que avaliem a taxa de hidrólise do GTP e liberação de GDP;
- realizar experimentos de espectroscopia como dicroísmo circular (CD) e espalhamento de luz com a proteína;
- realizar ensaios de cristalização da SEPT 7;
- realizar ensaios de cristalização da SEPT 7 com outras septinas e entre essas proteínas com outras moléculas estruturalmente identificadas por meio de duplo-híbrido;
- realizar ensaios de cristalização dos domínios da septina 9;
- realizar estudos de mutação sítio-dirigida.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 2 LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, v. 317, n. 1, p. 341-372, 2002.
- 3 HUANG, YI-WEI.; SURKA, M. C.; REYNAUD, D.; ASCIAK, C. P.; TRIMBLE, W. S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS Journal*, v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.
- 4 CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 8, p. 2762-2777, 2003.
- 5 OEGEMA, K.; DESAI, A.; WONG, M.L.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C.M. Purification and assay of a septin complex from *Drosophila* embryos. *Methods Enzymology*, v. 298, p. 279-295, 1998.
- 6 ELIAS, T.; SPILIOTIS, W. JAMES, Nelson. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *Journal of Cell Science*, v. 119, n.1, p. 4-10, 2005.
- 7 SPILIOTIS, E. T.; NELSON, W. J. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Division*, v. 4, n. 18, p. 1-14, 2009.
- 8 KUSCH, J.; MEYER, A.; SNYDER M. P., BARRAL, Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes & Development*, v. 16, n. 13, p. 1627-1639, 2002.
- 9 FATY, M.; FINK, M.; BARRAL, Y. Septins: a ring to part mother and daughter. *Current Genetics*, v. 41, n. 3, p. 123-131, 2002.
- 10 HALL, P.A.; RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. *Journal Pathology*, v. 204, n. 4, p. 489-505, 2004.

11 KALIKIN, L. M.; SIMS, H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that maps to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, v. 63, n.2, p. 165-172, 2000.

12 MONTAGNA, C.; LYU, M. S.; HUNTER, K.; LUKES, L.; LOWTHER, W.; REPERT, T. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, v. 63, n. 9, p. 2179-2187, 2003.

13 SCOTT, M. W.; GLENN, McCluggage ; KENNETH, J. H.; PETER, A. H.; RUSSELL, S. E. H. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *International Journal Cancer*, v. 118, n. 5, p. 1325-1329, 2006.

14 SAKAI, K.; KURIMOTO, M.; TSUGU, A.; HUBBARD, S. L.; TRIMBLE, W. S.; RUTKA, J. T. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *Journal Neurooncology*, v. 57, n. 3, p. 169-177, 2002.

15 KIM D, S.; HUBBARD, S. L.; PERAUD, A.; SALHIA, B.; SAKAI, K.; RUTKA, J. T. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumours. *Neoplasia*, v. 6, n. 2, p. 168-178, 2004.

16 ROESELER, S.; SANDROCK, K.; BARTSCH I.; ZIEGER, B. Septins, a novel group of GTP-binding proteins: relevance in hemostasis, neuropathology and oncogenesis. *Klinische Padiatrie*, v. 221, n. 3, p. 150-155, 2009.

17 OSAKA, M.; ROWLEY, J. D.; ZELEZNIK-LE, N. J. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, v. 96, n. 11, p. 6428-6433, 1999.

18 SORENSEN, A. B.; LUND, A. H.; ETHELBERG, S.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; PEDERSEN, F. S. Sint1, a common integration site in SL3-3-Induced T-Cell Lymphomas, harbors a putative proto- oncogene with homology to the Septin gene family. *Journal of Virology*, v. 74, n. 5, p. 2161-2168, 2000.

19 CERVEIRA, N.; CORREIA, C.; BIZARRO, S.; PINTO, C.; LISBOA, S.; MARIZ, J. M.; MARQUES, M.; TEIXEIRA, M. R. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene*, v. 25, n. 45, p. 6147-6152, 2006.

20 RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Do septins have a role in cancer? *British Journal of Cancer*, v. 93, p. 499-503, 2005.

21 CALTAGARONE, J.; RHODES, J.; HONER, W.G.; BOWSER, R. Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport*, v. 9, n. 12, p. 2907-2912, 1998.

22 TODA, S.; KAJII, Y.; SATO, M.; NISHIKAWA, T. Reciprocal expression of infant- and adult-preferring transcripts of CDCrel-1 septin gene in the rat neocortex. *Biochemical Biophysical Research Communications*, v. 273, n. 2, p. 723-728, 2000.

23 KIM, D.S.; HUBBARD, S. L.; PERAUD, A.; SALHIA, B.; SAKAI, K.; RUTKA, J. T. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumours. *Neoplasia*, v. 6, n. 2, p. 168-78, 2004.

24 SIMANTOV, R.; PENG, W. MDMA (Ecstasy) controls in concert a group of genes involved in GABA neurotransmission. *FEBS Letters*, v. 563, n. 1, p. 3-6, 2004.

25 GRUENHEID, S.; FINLAY, B. B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, v. 422, p. 775-81, 2003.

26 SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.

27 KINOSHITA, M. The septins. *Genome Biology*, v. 4, n. 236, p. 1-9, 2003.

28 KOH-ICHI, N.; TOMIKO, A.; YOSHINORI, N.; MASAKI, I. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 53, p. 55895-55904, 2004.

29 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, v. 77, n. 3, p. 371-379, 1994.

30 LONGTINE, M. S.; FARES, H.; PRINGLE, J. R. Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *Journal Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 719-736, 1998.

31 MARTINEZ, C.; SANJUAN, M. A.; DENT, J. A.; KARLSSON, I.; WARE, J. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochemical Journal*, v. 382, p. 783-791, 2004.

32 JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R.; SHEFFIELD, P. J.; KINOSHITA, M.; NODA, M.; HAYSTEAD, T.; MACARA I. G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nature Cell Biology*, v. 3, n. 10, p. 861-866, 2001.

33 CLAUDIA, Low; MACARA, I. G. Structural analysis of Septin 2, 6, and 7 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 30697-30706, 2006.

34 PAN, F. 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.

35 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *The Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.

36 CAO, L, X.; DING, W. YU; YANG, X.; SHEN, S.; YU, L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Letters.*, v. 581, n. 28, p. 5526-5532, 2007.

37 BOUNR, H. R.; SANDRERS, A. D.; MCCORNICK, F. The GTPase superfamily conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, v. 349, p. 117-127, 1991.

38 CAO, L.; WENBO, Y. U.; YANHUA, W. U. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 20, p. 3309-3323, 2009.

39 MACARA, I. G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C. M. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111-4113. 2002.

40 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.

41 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 478-489, 2008.

42 LONGTINE, M. S. Bi EF Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biology*, v. 13, n. 7, p. 403-409, 2003.

43 FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biology*, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.

44 VERSELE, M.; GULLBRAND, B.; SHULEWITZ, M.J.; CID, V. J.; BAHMANYAR, S.; CHEN, R. E.; BARTH, P.; ALBER, T.; THORNER, J. Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 12, p. 4568-4583, 2004.

45 JOHN, C. M.; HITE, R. K.; WEIRICH, C.S.; FITZGERALD, D.J.; JAWHARI, H.; FATY, M.; SCHLAPFER, D.; KROSCHEWSKI, R.; WINKLER, F.K.; WALZ, T.; BARRAL, Y.; STEINMETZ, M. O. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO Journal*, v. 26, n. 14, p. 3296 - 3307, 2007.

46 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KUHLMANN, D.; MACARA, I. G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOFER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, n. 7160, p. 11-315, 2007.

47 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P.; PARK, S. S.; GARCIA, G.; PATANWALA, I.; HO-LEUNG, N. G.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.

48 LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A.; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *Journal of Molecular Biology*., v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008.

49 BARRAL, Y.; KINOSHITA, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 20, n. 1, p. 12-18, 2008.

50 KINOSHITA, M.; FIELD, C. M.; COUGHLIN, M.L.; STRAIGHT, A. F.; MITCHISON, T. J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell*, v. 3, n. 6, p. 791-802. 2002.

51 ZHANG, J.; KONG, C.; XIE, H.; MCPHERSON, P. S.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W. S. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, v. 9, n. 24, p. 1458-1467, 1999.

52 BERLIN, A.; PAOLETTI, A. Chang F Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *Journal Cell Biology*, v. 160, n. 7, p. 1083-1092, 2003.

53 VALLEN, E. A.; CAVISTON, J. Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and Myo1p in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, n. 2, p. 593-611, 2000.

54 TASTO, J. J.; MORRELL, J. L.; GOULD, K. L. An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *Journal Cell Biology*, v. 160, n.7, p. 1093-1103, 2003.

55 BARDIN, A. J.; VISINTIN, R.; AMON, A. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell*, v. 102, n. 1, p. 21-31, 2000.

56 PEREIRA, G.; SCHIEBEL, E. Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defect. *Molecular Cell*, v. 19, n. 2, p. 209-221, 2005.

57 ENSERINK, J. M.; SMOLKA, M. B.; ZHOU, H. L.; KOLODNER, R. D. Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Cell Biology*, v. 175, n. 5, p. 729-741, 2006.

58 SMOLKA, M. B.; CHEN, S. H.; MADDOX, P. S.; ENSERINK, J. M.; ALBUQUERQUE, C. P.; WEI, X. X.; DESAI, A.; KOLODNER, R. D.; ZHOU, H. L. An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. *Journal Cell Biology*, v. 175, n. 5, p. 743-753, 2006.

59 BARRAL, Y.; MERMALL, V.; MOOSEKER, M. S.; SNYDER, M. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Molecular Cell*, v. 5, n. 5, p. 841-851, 2000.

60 DOBBELAERE, J.; BARRAL, Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science*, v. 305, n. 5682, p. 393-396, 2004.

61 IWASE, M.; LUO, J. Y.; NAGARAJ, S.; LONGTINE, M.; KIM, H. B.; HAARER, B. K.; CARUSO, C.; TONG, Z. T.; PRINGLE, J. R. Bi EF. Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 3, p. 1110-1125, 2006.

62 LIPPINCOTT, J.; SHANNON, K. B.; SHOU, W.Y.; DESHAIES, J.; LI, R. The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *Journal of Cell Science*, v. 114, n. 7, p. 1379 -1386, 2001.

63 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2006.

64 NGUYEN, T. Q.; SAWA, H.; OKANO, H.; WHITE, J. G. The C-elegans septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000.

65 KINOSHITA, M.; KUMAR, S., MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; KINOSHITA, A.; HARAGUCHI, T.; HIRAOKA, Y.; NODA, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actinbased structures. *Genes Development*, v. 11, p. 1535-1547,1997.

66 NAGATA, K.; KAWAJIRI, A.; MATSUI, S.; TAKAGISHI, M.; SHIROMIZU, T.; SAITOH, N.; IZAWA, I.; KIYONO, T.; ITOH, TJ.; HOTANI, H.; INAGAKI, M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 20, p. 18538-18543, 2003.

67 FINGER, F. P.; KOPISSH, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in C-elegans. *Developmental Biology*, v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.

68 SPILIOTIS, E. T.; KINOSHITA, M.; NELSON, W. J. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.

69 ZHU, M.; WANG, F.S.; YAN, F.; YAO, P.Y.; DU, J.; GAO, X. J.; WANG, X. W.; WU, Q.; WARD, T.; LI, J. J.; KIOKO, S.; XIE, W.; DING, X. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 27, p. 18916-18925, 2008.

70 JOO, E.; SURKA, M. C.; TRIMBLE, W. S. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Developmental Cell*, v. 13, n. 5, p. 677-690, 2007.

71 NAGARAJ, S.; RAJENDRAN, A.; JACKSON, C. E.; LONGTINE, M. S. Role of nucleotide binding in septin-septin interactions and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 28, n. 16, p. 5120-5137, 2008.

72 KREMER, B.E.; HAYSTEAD, T.; MACARA, I.G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAPP-1. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, n. 10, p. 4648-4659, 2005.

73 SPILIOTIS, E. T.; HUNT, S. J.; HU, Q.; KINOSHITA, M.; NELSON, W. J. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *Journal Cell Biology*, v. 180, n. 2, p. 295-303, 2008.

74 ITO, H.; IWAMOTO, I.; MORISHITA, R.; NOZAWA, Y.; NARUMIYA, S.; ASANO, T.; NAGATA, K. I. Possible role of Rho/Rhotekin signaling in mammalian septin organization. *Oncogene*, v. 24, n. 47, p. 7064-7072, 2005.

75 SISSON, J. C.; FIELD, C.; VENTURA, R.; ROYOU, A.; SULLIVAN, W. Lava lamp, a novel peripheral Golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization. *Journal Cell Biology*, v. 151, n. 4, p. 905-917, 2000.

76 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 114, n. 5, p. 839-844, 2001.

77 GONZALEZ, M. E.; MAKAROVA, O.; PETERSON, E. A.; PRIVETTE, L. M.; PETTY, E. M. Up-regulation of SEPT9 v1 stabilizes c-Jun-NTerminal kinase and contributes to its proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cell Signal*, v. 21, n. 4, p. 477-480, 2009.

78 XUE, J.; TSANG, C. W.; GAI, W. P.; MALLADI, C. S.; TRIMBLE, W. S.; ROSTAS, J. A. P.; ROBINSON, P. J. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, v. 91, n. 3, p. 579-590, 2004.

79 XIE, Y. L.; VESSEY, J. P.; KONECNA, A.; DAHM, R.; MACCHI, P.; KIEBLER, M. A. The GTP-binding protein septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.

80 TADA, T.; SIMONETTA, A.; BATTERTON, M.; KINOSHITA, M.; EDBAUER, D.; SHENG, M. Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 1752-1758, 2007.

81 HUIJBREGTS, R. P.; SVITIN, A.; STINNETT, M.W.; RENFROW, M. B.; CHESNOKOV, I. *Drosophila* Orc6 facilitates GTPase activity and filament formation of the septin complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 1, p. 270-281, 2009.

82 CHESNOKOV, I. N.; CHESNOKOVA, O. N.; BOTCHAN, M. A cytokinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, v. 100, n. 16, p. 9150-9155, 2003.

83 BEITES, C. L.; CAMPBELL, K. A.; TRIMBLE, W. S. The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochemical Journal*, v. 15, p. 347-353, 2005.

84 VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *Journal Cell Biology*, v. 164, n. 5, p.701-715, 2004.

85 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.

86 VEGA, I. E.; HSU, S. C. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *NeuroReport*, v. 14, n. 1, p. 31-37, 2003.

87 VRABIOIU, A. M.; GERBER, S. A.; GYGI, S. P.; FIELD, C. M.; MITCHISON, T. J. The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *Journal Biological Chemistry*, v. 279, n. 4, p. 3111-3118, 2004.

88 DING, X. M.; YU, W. B.; LIU, M.; SHEN, S. Q.; CHEN, F.; CAO, L. H.; WAN, B.; YU, L. GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. *Molecules and Cells* v. 25, n. 3, p. 385-389, 2008.

89 GARCIA, W.; OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M. R.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRAT, R. C. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, v. 45, n. 46, p. 13918-13931, 2006.

90 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.U.; WOODY, R. W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using CD spectroscopy. *Protein Science*, v. 8, n. 2, p. 370-380, 1999.

91 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

92 ROST B: PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods in Enzymology*, v. 266, p. 525-539, 1996.

93 DOSZTANYI, Z.; CSIZMOK, V.; TOMPA, P.; SIMON, I. IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, v. 21, n. 16, p. 3433-3434, 2005.

94 NAVAZA, J.; SALADJIAN, P. AMORE: an automated molecular replacement program package. *Methods in Enzymology: Macromolecular crystallography*, v. 276, p. 581-594, 1997.

95 SALI, A., BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

96 GIBAS, C.; JAMBECK, P. *Desenvolvendo bioinformatica: ferramentas de software para aplicações em biologia*. Tradução Milarepa Ltda. Rio de Janeiro: Campus, 2001.

97 ROSSLE, S. C. S. *Desenvolvimento de um sistema computacional para a modelagem comparativa em genômica estrutural: análise de sequências do genoma da Gluconacetobacter diazotrophicus*. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ, 2004.

98 LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK:a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Applied Crystallography*, v. 26, p. 283-291, 1993.

99 NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; KRYSTEK JR, S. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*, v. 15, n. 4, p. 808-824, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)