



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

**ESTUDOS ESTRUTURAIS DOS DOMÍNIOS C-TERMINAIS DAS
SEPTINAS HUMANAS 6, 7, 11 e 14**

WALLACE VASCONCELOS DE OLIVEIRA CONCEIÇÃO

BRASÍLIA

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**ESTUDOS ESTRUTURAIS DOS DOMÍNIOS C-TERMINAIS DAS
SEPTINAS HUMANAS 6, 7, 11 e 14**

WALLACE VASCONCELOS DE OLIVEIRA CONCEIÇÃO

Orientador: Dr. Napoleão Fonseca Valadares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília (UnB), para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Área de concentração: Biofísica Molecular

BRASÍLIA

2020

Mestrado realizado no Laboratório de Biofísica Molecular e apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Defendido em: 17/03/2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Napoleão Fonseca Valadares

Universidade de Brasília (UnB)
Laboratório de Biofísica Molecular
Presidente da Banca

Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

Universidade de Brasília (UnB)
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
Examinador Interno

Dra. Renata Vieira Bueno

Universidade de São Paulo (USP)
Instituto de Física de São Carlos
Examinador Externo

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Universidade de Brasília (UnB)
Laboratório de Toxinologia
Examinador Suplente

À minha anjinha, vovó Euzina Vasconcelos de Oliveira (*in memoriam*), que continua cuidando de mim e da minha família até mesmo do céu. Sou eternamente grato a Deus por ter me permitido ser seu neto e por ter tido seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus em sua magnificência, por toda bondade para comigo. Deus, sei que os seus olhos estão sobre os que o temem e esperam na sua misericórdia. Honra e glória sejam para ti!

À minha mãe Débora Marcia e à minha vovó Euzina Vasconcelos (*in memoriam*), duas mulheres de fibra que sempre batalharam e me deram todo o apoio necessário na minha vida. Agradeço pelo exemplo de coragem e perseverança, pela exímia educação que me deram, pelo carinho e pelo amor. Não há palavras e nem gestos suficientes para demonstrar minha gratidão.

A toda a minha família, os que estão perto (especialmente minha tia Elúcia e meu primo Celso) e os que estão longe – que sempre torcem por mim e pelo meu sucesso, me apoiando, incentivando e vibrando com cada conquista.

Ao meu grande orientador, o professor Dr. Napoleão Fonseca Valadares, que me recebeu e me incluiu em seu grupo de pesquisa dando todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste projeto. Obrigado pela confiança, pelo profissionalismo, pelo aprendizado compartilhado e pela colaboração em todos os momentos. A qualidade do corpo docente da UnB está em professores-pesquisadores como você.

Aos meus amigos de longa jornada Rafael, Sérgio, Daniela, Juliana, Daniel e a todos os demais amigos e colegas da vida e da igreja, que sempre torcem por mim e se alegram com as minhas conquistas, da mesma forma que me alegro com as deles. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e por me salvarem inúmeras vezes.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofísica Molecular, uma segunda família: Amanda Araújo, Azadeh Mehdad (*in memoriam*), Diego Honda, Diogo Martins, Gideane Mendes, Gustavo Trajano, Izadora Cristina, João Paulo, Jônatas Lima, Julia Freitas, Liem Canet, Maria Alzira, Marysol Moraes, Patrícia Alves, Paulo Jardim e Renata Bueno. Cada discurso, cada compartilhamento de conhecimento e cada risada vitais nesta jornada. Torço pelo sucesso de cada um!

Aos professores Dr. Aisel Valle, Dr. João Alexandre e Dra. Sônia Freitas, por todos os ensinamentos, colaboração e boa convivência que tornam admirável a equipe da biofísica.

Aos colegas e amigos da Embrapa, pelo incentivo em dar continuidade na minha formação acadêmica, em especial a Dra. Maria Elvira, que foi propulsora e incentivadora do início ao fim desta jornada. Que as bênçãos de Deus estejam sempre sobre ti!

Ao professor Dr. Richard Garratt, aos alunos e técnicos que conheci no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), obrigado pelas discursões e colaboração.

Às agências de fomento FAPDF, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro. À UnB e ao DPG, por fomentarem a divulgação científica e a minha participação neste ano de 2020 no maior congresso de biofísica, o encontro anual da Sociedade de Biofísica, em San Diego-EUA. E a todos os demais que colaboraram e torceram para esta conquista, muito obrigado!

RESUMO

Septinas são proteínas originalmente descritas em leveduras, e também presentes em humanos e outros eucariotos. Essas proteínas formam filamentos e integram o citoesqueleto, onde desempenham importante papel no estágio final da divisão celular – citocinese. Estudos apontam seu envolvimento em patologias como mal de Parkinson, Alzheimer, leucemia e outras. Cada septina humana é formada por um domínio GTP central flanqueado pelos domínios N-terminal e C-terminal. Alguns domínios C-terminais de septinas contêm regiões descritas como *coiled coil* que se associam com alta afinidade, no entanto o papel destas na automontagem de filamentos de septinas não está definido e nenhuma estrutura cristalográfica destas está depositada nos bancos de dados. Neste trabalho, construções contendo regiões preditas como *coiled coil* dos domínios C-terminais das septinas humanas 6, 7, 11 e 14 foram expressas de forma heteróloga, purificadas e submetidas a ensaios biofísicos e de cristalização, tanto separadamente quanto combinadas. Os dados de estrutura secundária obtidas por dicroísmo circular mostram que, enquanto SEPT7c adota conformações helicoidais em pH 4, 7 e 9, apenas em pH 4 as construções de SEPT11c e SEPT14c apresentam α -hélices estáveis – indicando a presença de *coiled coils* nestas condições, ao considerar a razão $[\theta]_{MRE} 222 \text{ nm}/[\theta]_{MRE} 208 \text{ nm}$. As análises de SEC-MALS indicaram a presença de monômeros para as proteínas analisadas individualmente, enquanto que por *crosslinking* químico foi possível identificar a presença de homodímeros. Além disto, as duas técnicas demonstraram a presença de heterodímeros SEPT7c+SEPT11c. Os ensaios de ultracentrifugação analítica indicaram a influência do pH para a conversão de SEPT7c de monômeros para dímeros, porém o mesmo não foi observado para as demais construções nas condições testadas. Centenas de condições de cristalização foram triadas roboticamente, assim como a variação de temperatura para favorecer a precipitação organizada das proteínas. Alguns cristais foram identificados e o espaço químico em torno das condições observadas foi explorado. Os cristais foram submetidos a ensaios de difração de raios X em difratômetro *in house* (D8 Venture) e também na fonte de luz Síncrotron do LNLS, contudo apenas conjuntos de dados de baixa resolução foram obtidos não permitindo a resolução das estruturas destas proteínas.

Palavras-chave: Septinas. Filamentos. *Coiled coil*. Cristalização.

ABSTRACT

Septins were first identified and described in yeast and nowadays is known their presence in human and other eukaryotes. These proteins form filaments and include the cytoskeleton compounds, in which play an important role in the final stage of cell division – cytokinesis. Many evidences support the participation of septins in pathological conditions like leukemia, Parkinson's and Alzheimer's disease, and others. Each human septin present a central guanine nucleotide binding domain that is flanked by N-terminal and C-terminal domains. Some septins present in its C-terminal domain regions predicted to form coiled coil structures and the function of these structures to form filaments still not clear and no crystallographic structure of those is deposited on data banks. In this work, constructions of C-terminal domains of human septins 6, 7, 11 and 14 were heterologously expressed and purified. Subsequently, biophysical and crystallization assays were done using individually or combined septins samples. The secondary structure data obtained by circular dichroism indicated that SEPT7c adopts helicoidal conformation at pH 4, 7 and 9. Otherwise, the data showed that SEPT11c and SEPT14c assume α -helix structure only at pH 4, suggesting the presence of coiled coils when considering the ratio $[\theta]_{\text{MRE}} 222 \text{ nm}/[\theta]_{\text{MRE}} 208 \text{ nm}$ in these conditions. SEC-MALS analyses showed the monomeric state of each protein, whereas homodimeric architectures were obtained by chemical crosslinking. Besides that, the SEPT7c+SEPT11c heterodimers formation was observed by both techniques. Analytical ultracentrifugation demonstrated that pH participates in the formation of SEPT7c dimers, but the same was not observed for the other septins. Hundreds of conditions were automated explored as also the variation of temperature to favour the proteins crystallization. Some conditions yielded crystals and the chemical space around these conditions were explored. The crystals were subject to X-ray diffraction using an in house D8 Venture diffractometer and in the Synchrotron light source of LNLS, however only low resolution datasets were obtained not allowing the resolution of these protein structures.

Key-words: Septinas. Filaments. Coiled coil. Crystallization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade de funções de septinas.....	16
Figura 2. Classificação e estrutura das septinas humanas.....	20
Figura 3. Estrutura do heterofilamento de septinas humanas.....	22
Figura 4. Modelo dos filamentos de septinas humanas disposto em hexâmeros e octâmeros....	24
Figura 5. Estrutura de um <i>coiled coil</i> com fase paralela.....	25
Figura 6. Alinhamento das sequências de SEPT7 e do grupo da SEPT6 deste estudo.....	28
Figura 7. Modelo da interação do <i>coiled coil</i> formado por SEPT6c-SEPT7c.....	29
Figura 8. Modelo da interação dos filamentos de septinas.....	30
Figura 9. Diferentes pareamentos possíveis para os C-terminais de SEPT6c e SEPT7c paralelos.....	31
Figura 10. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT6c e SEPT7c em meio autoindutor a 18 °C.....	54
Figura 11. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT6c e SEPT7c em meio autoindutor a 37 °C.....	55
Figura 12. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT11c e SEPT14c em meio autoindutor a 37 °C.....	56
Figura 13. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT14c em pLysE no meio autoindutor.....	57
Figura 14. Ensaio de expressão e de solubilidade na cepa Rosetta(DE3).....	58
Figura 15. Perfil cromatográfico de SEPT6c em coluna de afinidade.....	60
Figura 16. Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação de SEPT6c.....	60
Figura 17. Purificação de SEPT7c em coluna de afinidade.....	61
Figura 18. Purificação de SEPT11c em coluna de afinidade.....	62
Figura 19. Purificação de SEPT14c em coluna de afinidade.....	62
Figura 20. Purificações das construções de septinas por exclusão molecular.....	63
Figura 21. Eletroforese em gel SDS-PAGE Tris-Tricina 16% das septinas após exclusão molecular.....	64
Figura 22. Calibração da coluna de exclusão molecular e estimativa dos pesos moleculares das septinas.....	65
Figura 23. Espectros de dicroísmo circular das septinas em diferentes pH.....	68
Figura 24. Estabilidade térmica das septinas em pH 4 por dicroísmo circular.....	70
Figura 25. Perfil cromatográfico de SEPT7c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS.....	71
Figura 26. Perfil cromatográfico de SEPT11c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS.....	72
Figura 27. Perfil cromatográfico de SEPT7c + SEPT11c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS.....	73
Figura 28. Perfis cromatográficos de SEPT14c e da calibração com BSA.....	73

Figura 29. Crosslinking químico em gel desnaturante.....	75
Figura 30. Perfil da sedimentação contínua de SEPT7c a 0,82 mg/mL.....	77
Figura 31. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT7c a 0,82 mg/mL.....	78
Figura 32. Perfil da sedimentação contínua de SEPT11c a 0,75 mg/mL.....	79
Figura 33. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT11c a 0,75 mg/mL.....	79
Figura 34. Perfil da sedimentação contínua de SEPT14c a 0,82 mg/mL.....	80
Figura 35. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT14c a 0,82 mg/mL.....	81
Figura 36. Representação do padrão de difração de cristal de SEPT7c com resolução a 10 Å.....	82
Figura 37. Gota com precipitado de SEPT6c.....	82
Figura 38. Gota com precipitado de SEPT6c+SEPT7c.....	82
Figura 39. Cristais de SEPT7c visualizados após 53 dias de acondicionamento a 4 °C.....	83
Figura 40. Cristais de SEPT11c e SEPT14c obtidos em acondicionamento a 20 °C.....	84
Figura 41. Representação dos ensaios de difração de raios-X realizados na UnB.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das proteínas (em mg/mL) utilizadas nos ensaios de <i>screening</i>	51
Tabela 2. Concentrações das proteínas (em mg/mL) utilizadas nos ensaios de <i>screening</i> realizados no IFSC/USP.....	51
Tabela 3. Características físico-químicas das construções utilizadas nesse estudo.....	52
Tabela 4. Peso molecular e grau de pureza das frações purificadas após SEC das construções de septinas.....	64
Tabela 5. Elipticidade molar residual média das septinas nas bandas características de α -hélice.....	69
Tabela 6. Características hidrodinâmicas das construções de septinas.....	76
Tabela 7. Características hidrodinâmicas dos tampões utilizados.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	<i>Absorbance Units</i> (unidades de absorvância)
AUC	<i>Analytical Ultracentrifugation</i> (ultracentrifugação analítica)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina do soro bovino)
CD	<i>Circular Dichroism</i> (dicroísmo circular)
CDC	<i>Cell division cycle</i> (ciclo de divisão celular)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (espalhamento dinâmico de luz)
dRI	<i>Differential Refractive Index</i> (índice de refração diferencial)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
f/f ₀	Razão friccional
FRET	<i>Flourescence Resonance Energy Transfer</i> (transferência ressonante de energia por fluorescência)
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzima que promove a hidrólise de guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
IFSC/USP	Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (cromatografia de afinidade por metal imobilizado)
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani, meio de cultura
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LS	<i>Light Scattering</i> (espalhamento da luz)
mA	miliampère
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MRE	<i>Mean Residue Ellipticity</i> (elipticidade residual média)
MRW	<i>Mean Residue Weight</i> (peso residual médio)
MPa	Megapascal

m/v	Razão em massa/volume
NaCl	Cloreto de sódio
<i>NdeI</i>	Endonuclease do tipo I proveniente de <i>Neisseria denitrificans</i>
ng	nanograma
nm	Nanômetro
OD	<i>Optical Density</i> (densidade óptica)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (banco de dados de proteínas)
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoeletrico
PM	Peso Molecular
PSA	Persulfato de amônia
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> (raiz quadrática do desvio médio)
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio)
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (cromatografia de exclusão molecular)
SEC-MALS	<i>Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering</i> (cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multiangular)
SEPT	Septina humana
SEPT_c	Construção do C-terminal de septina humana
SV-AUC	<i>Sedimentation Velocity – Analytical Ultracentrifugation</i> (ultracentrifugação analítica – velocidade de sedimentação)
$S_{20,w}$	Coefficiente de sedimentação em água a 20 °C
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
UV	Ultravioleta
V	Volt
v/v	Razão em volume/volume
V_{bar}	Volume parcial específico
<i>XhoI</i>	Endonuclease do tipo I proveniente de <i>Xanthomonas holcicola</i>
μL	microlitro
μM	micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Graus
°C	Graus Celsius
Å	Angstrom (10^{-10} m)
g	Força G (força gravitacional)
n	Orbital molecular com elétrons não ligados
η	Viscosidade
θ	Elipticidade
$[\theta]$	Elipticidade molar
λ	Comprimento de onda
π	Orbital molecular formado a partir de dois orbitais atômicos p sobrepondo-se lateralmente
π^*	Orbital molecular não ocupado
ρ	Densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Septinas	16
1.2. Diversidade de septinas	18
1.3. Estrutura das septinas	19
1.4. Complexos de septinas	21
1.5. Motivo <i>coiled coil</i>	24
1.6. Domínios C-terminais de septinas humanas	26
1.7. Domínios de septinas humanas utilizados neste estudo	27
1.7.1 Grupo da SEPT7	28
1.7.2 Grupo da SEPT6.....	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Síntese dos genes	35
4.2. Preparo de células competentes	36
4.3. Produção heteróloga	36
4.3.1. Transformação das células	36
4.3.2. Ensaio de expressão e de solubilidade	37
4.3.3. Produção em larga escala	38
4.4. Purificação das proteínas	38
4.4.1. Purificação por cromatografia de afinidade.....	38
4.4.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular	40
4.4.3. Calibração da coluna de cromatografia de exclusão molecular	41

4.5. Técnicas eletroforéticas	41
4.5.1. Eletroforese SDS-PAGE Tris-Glicina.....	41
4.5.2. Eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina.....	42
4.5.3. Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.....	43
4.5.4. Quantificação da pureza das bandas dos géis.....	44
4.6. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	44
4.7. Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a Espalhamento de Luz Multiangular (SEC-MALS)	46
4.8. Crosslinking químico	47
4.9. Ultracentrifugação analítica – Velocidade de Sedimentação (SV-AUC)	48
4.10. Ensaio de cristalização	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Síntese dos genes	52
5.2. Produção heteróloga	53
5.3. Purificação das proteínas	59
5.3.1. Purificação por cromatografia de afinidade.....	59
5.3.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular.....	63
5.3.3. Calibração da coluna de cromatografia de exclusão molecular.....	65
5.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	66
5.5. Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a Espalhamento de Luz Multiangular (SEC-MALS)	71
5.6. Crosslinking químico	74
5.7. Ultracentrifugação analítica – Velocidade de Sedimentação (SV-AUC)	76
5.8. Ensaio de cristalização	81
6. CONCLUSÕES	86
7. PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE	96

1. INTRODUÇÃO

O citoesqueleto celular é responsável por manter a forma das células e pela organização interna de suas organelas. Nas células eucarióticas o citoesqueleto é composto por proteínas que se organizam de forma versátil polimerizando-se em filamentos que mantêm a integridade mecânica das células, dotando-as de considerável rigidez. Um exemplo dessa versatilidade é a montagem e desmontagem de filamentos em resposta a forças e sinais externos à célula (FLETCHER; MULLINS, 2010). A base da motilidade celular é de responsabilidade dos constituintes do citoesqueleto, formando cílios e flagelos, assim como a divisão celular, formando o fuso mitótico, e a ancoragem de componentes celulares. Os principais componentes do citoesqueleto eucariótico são os microtúbulos (compostos por α - e β -tubulina), os filamentos de actina (compostos por monômeros de actina) e os filamentos intermediários (que apresentam composição variada de acordo com o tipo celular – podendo conter queratina, laminina, vimentina, desmina e outras proteínas). Além destas três classes de componentes do citoesqueleto celular, outras proteínas também apresentam importante função estrutural mantendo a conformação celular, como é o caso das septinas – proteínas que recentemente têm sido consideradas o quarto elemento do citoesqueleto de células eucarióticas (MOSTOWY; COSSART, 2012).

1.1. Septinas

As septinas compõem uma família conservada de proteínas que ligam nucleotídeos de guanina e polimerizam-se formando estruturas com alto grau de organização – tais como filamentos e anéis, que compõem o citoesqueleto celular. Os genes de septinas foram originalmente descritos há quase cinquenta anos na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, identificados como genes relacionados ao ciclo de divisão celular (HARTWELL, 1971). A descoberta resultou-se a partir de mutações sensíveis a variação térmica nos genes *cdc* (*cell division cycle*) que promoveram brotamentos anômalos multinucleados. Foi observada a presença dos produtos destes genes no anel de divisão do brotamento, destacando a importância destas proteínas para a citocinese. Estudos posteriores indicaram genes de *Drosophila* sp. que codificavam proteínas similares às de leveduras, com igual importância para a citocinese, e, meses depois, foi reportada a alcunha de “septinas” para tais proteínas,

devido à estrutura de *septum* formada no fim da divisão celular (NEUFER; RUBIN, 1994; SANDERS; FIELD, 1994).

Em fungos, as septinas estão associadas à citocinese, formando o anel no sítio de esporulação, à morfogênese (interagindo e hiperpolarizando os filamentos actina do citoesqueleto) e à manutenção da morfologia celular (LONGTINE, 1996; MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Em células animais, as septinas também interagem com actina e microtúbulos, se organizando ao longo dos filamentos (KINOSHITA *et al.*, 2002; SILVERMAN-GAVRILA; SILVERMAN-GAVRILA, 2008). As septinas estão presentes em diversos processos celulares que envolvem curvatura de membranas (**Figura 1**), como na formação de anéis que atuam como barreiras de difusão, como ocorre na base dos cílios (KIM *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2010) e no *annulus* do flagelo das células espermáticas (IKARA *et al.*, 2005); no tráfego de vesículas e no transporte por exocitose (HSU *et al.*, 1998; TOKHTAEVA, 2015); no correto desenvolvimento e ramificação dos dendritos dos neurônios (TADA *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2007) e na formação de arcabouço para aprisionar bactérias no processo de infecção, retendo as células invasoras (MOSTOWY *et al.*, 2010).

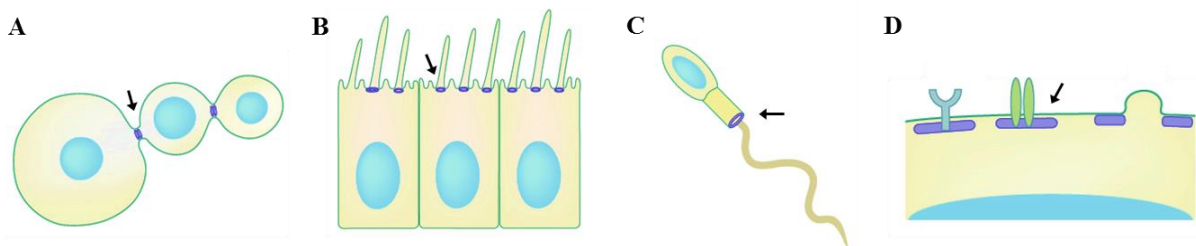


Figura 1. Diversidade de funções de septinas. As estruturas formadas por septinas, apresentadas em roxo, são indicadas pelas setas. (A) Anéis de septinas formam o *septum* na citocinese. (B) Barreira de difusão formada por septinas na base dos cílios. (C) Barreira de difusão de septinas que separam a cauda do corpo da célula espermática. (D) Septinas associada à membrana servem como plataforma para outras proteínas de ligação. Fonte: Adaptada de MBInfo com permissão.

As septinas são apontadas como plataformas para recrutamento de proteínas, organização de várias estruturas nos organismos e inclusive estão associadas a condições patológicas (KINOSHITA, 2006). Em 1998, foram identificadas três septinas presentes em placas proteicas na doença de Alzheimer (KINOSHITA *et al.*, 1998). No mesmo ano foi reportado o envolvimento do gene hCDCrel (atualmente *SEPT5*) com a leucemia mieloide (MEGONIGAL *et al.*, 1998). Em 2000, foi sugerido que a proteína CDCrel-1 contribui para a degeneração de neurônios dopaminérgicos, favorecendo a doença de Parkinson (ZHANG *et*

al., 2000). Em 2002, o gene *SEPT4* foi identificado e demonstrou-se importante marcador tumoral de câncer colorretal e de melanoma maligno (TANAKA *et al.*, 2002). Em 2005, mutações no gene *SEPT9* demonstraram causar amiotrofia nevrálgica hereditária (KUHLENBÄUMER *et al.*, 2005). Ainda assim, estudos também apontam septinas com potencial papel na supressão de câncer – como em gliomas, onde a expressão do gene *SEPT7* atua de forma benéfica, suprimindo a tumorigênese em células da glia (JIA *et al.*, 2009).

1.2. Diversidade de septinas

A família de genes das septinas em organismos eucariontes apresenta grande diversidade. Estudos sobre a ortologia de septinas através dos reinos dos seres vivos reportaram a presença de septinas em fungos e em animais, porém não em plantas. Utilizando o produto do gene *cdc13* de *S. cerevisiae* como sequência primária, uma das septinas melhor estudada, foram identificados 162 genes de septinas em variados organismos como fungos, microsporídios e animais. Nas leveduras *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, 7 genes de septinas foram identificados. Já nos insetos *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster* foram detectados 4 e 5 genes de septinas, respectivamente. Já o genoma do peixe-zebra (*Danio rerio*) apresenta 6 regiões codificantes de septinas. O microsporídio *Encephalitozoon cuniculi*, o único com genoma completo até a publicação do estudo, apresentou 3 septinas (PAN; MALMBERG; MOMANY, 2007).

A distribuição de septinas nos grupos de eucariotos é bastante conhecida, sendo que já foi reportada a presença destas proteínas em grupos representativos. No clado dos opisthokontes (fungos, animais e representantes próximos) estudos intensivos para caracterização estrutural funcional e evolutiva têm sido realizados, contudo nenhum membro da família das septinas foi detectado fora deste clado. Uma dentre as várias indagações feitas em estudos da filogenia de septinas é compreender o motivo da diferenciação do modo de citocinese, uma vez que plantas terrestres não apresentam nenhum representante de septina e que o modo divisão celular se distinguiu de outros eucariotos (YAMAZAKI *et al.*, 2013; ONISHI; PRINGLE, 2016).

O genoma humano possui 14 genes codificantes, sendo que 13 genes codificam septinas (SEPT1-SEPT12, SEPT14) – com diversas isoformas derivadas de *splicing* e de modificações pós-traducionais. O gene *SEPT13* teve sua expressão reportada por Hall *et al.* em 2005, entretanto seus transcritos apresentavam características similares aos de outras septinas humanas (HALL *et al.*, 2005). Atualmente o gene *SEPT13* é considerado um

pseudogene por produzir uma proteoforma de *SEPT7*. Com a identificação de vários genes de septinas em mamíferos e devido ao aumento dos interesses neste novo campo de estudo, Macara *et al.* (2002) racionalizaram as diversas nomenclaturas existentes dos genes de septinas, em consonância com o *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (HGNC, ou HUGO). Conforme estabelecido, os genes de septinas humanas passaram a ser grafados com letras maiúsculas e em itálico (por exemplo, *SEPT1* e *SEPT9*) e seus produtos, apenas com letras maiúsculas (SEPT1 e SEPT9) (MACARA *et al.*, 2002).

O perfil de expressão de septinas humanas é amplo com distribuição em vários tecidos, tendo sido possível detectar isoformas de pelo menos uma septina em praticamente todos os tecidos, como no caso dos genes *SEPT2*, *SEPT4*, *SEPT6*, *SEPT7*, *SEPT8*, *SEPT9*, *SEPT10* e *SEPT11*. O estudo utilizou microarranjos de DNA para analisar simultaneamente a expressão de septinas e detectou genes que são abundantemente expressos no sistema nervoso central: *SEPT3*, *SEPT4*, *SEPT5*, *SEPT7*, *SEPT8*, *SEPT11* – corroborando com o conhecimento sobre a patologia de septinas relacionada a doenças neurodegenerativas. Mesmo apresentando um perfil discreto de expressão, o gene *SEPT12* é mais nitidamente expresso nos testículos. Já outros genes, como *SEPT1*, são bastante expressos em tecidos linfoides e nos glóbulos brancos. Sugere-se então que os níveis de expressão de septinas são regulados especificamente nas células e, de acordo com a necessidade estrutural requerida, os monômeros individuais são sintetizados para oligomerização e formação do arcabouço desejado (HALL *et al.* 2005).

1.3. Estrutura das septinas

As septinas humanas apresentam estrutura primária conservada composta por um domínio N-terminal, um domínio G central (de ligação de guanosina, ou GTPase) e um domínio C-terminal. Os três domínios são extremamente característicos, o que embasa a classificação das septinas pela identidade de suas sequências. O domínio G é o mais conservado, apresenta uma região denominada elemento único de septinas – que caracteriza e difere as septinas de outras proteínas de ligação de nucleotídeos de guanosina trifosfato (GTP) – e os motivos G1, G3 e G4 (este último importante para selecionar os nucleotídeos de guanosina). O domínio G geralmente apresenta atividade de GTPase, convertendo os nucleotídeos para guanosina difosfato (GDP), excetuando o grupo da *SEPT6* cujos membros não apresentam atividade catalítica. A função de hidrólise de GTP é pouco conhecida e continua sendo objeto de estudos.

O domínio N-terminal apresenta tamanho variável e um conteúdo de desordem intrínseca. A região contém uma região polibásica (rica em aminoácidos carregados positivamente) e estudos sugerem a importância desta na interação com membrana, se ligando especificamente a fosfolipídios (ZHANG, 1999).

O domínio C-terminal de septinas também apresenta tamanho variável, porém característico em cada grupo (**Figura 2**). A região C-terminal das septinas (exceto o grupo da SEPT3) apresenta uma região predita como *coiled coil*, que possui de 50 a 100 resíduos de aminoácidos (KINOSHITA, 2003). A presença do motivo *coiled coil*, no qual duas α -hélices interagem formando uma super-hélice, é tida como fisiologicamente importante para a correta associação dos monômeros de septinas na automontagem de filamentos, porém esta dinâmica ainda não está totalmente elucidada (VALADARES; GARRAT, 2016; VALADARES *et al.*, 2017).

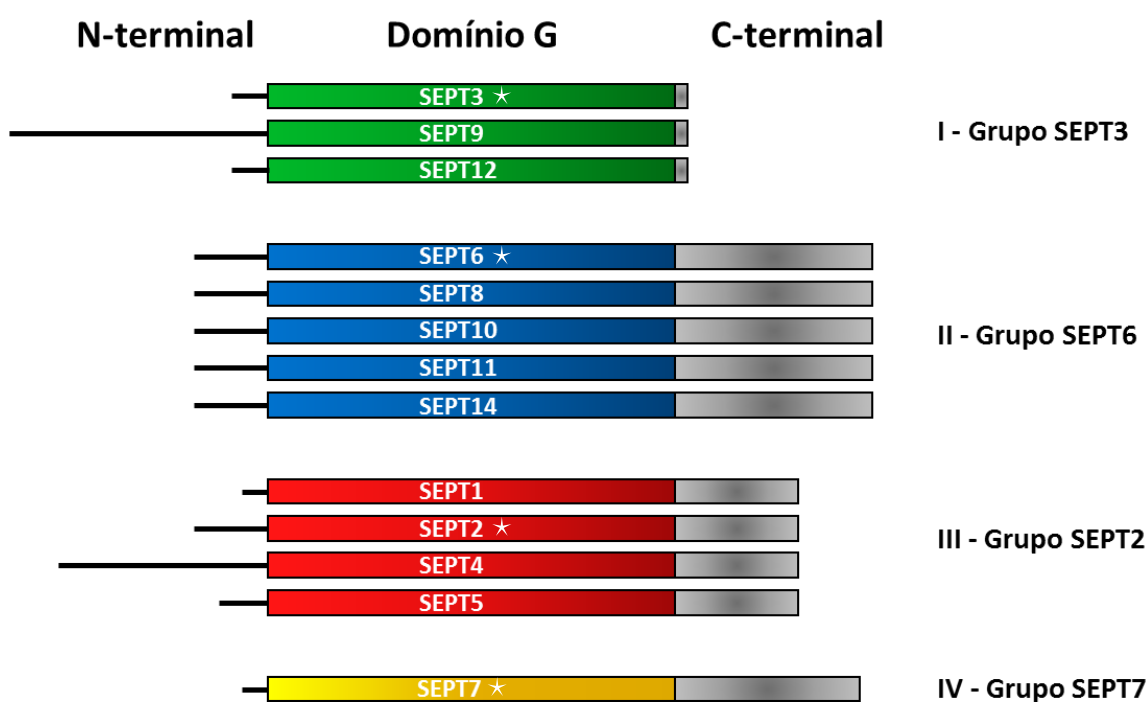


Figura 2. Classificação e estrutura das septinas humanas. Cada septina apresenta uma região N-terminal de tamanho variável, um domínio de ligação a guanósina denominado domínio G, e uma região C-terminal que, exceto para septinas do grupo I, da SEPT3, apresentam um *coiled coil*. A estrela branca indica o representante canônico de cada grupo. Fonte: Adaptado de Martínez (2006) e de Valadares e Garratt (2016).

Com base na homologia das sequências de aminoácidos as septinas são organizadas em 4 grupos característicos, apresentados na **Figura 2** (KINOSHITA, 2003). Os grupos são denominados conforme seu membro inicialmente mais estudado, sendo os grupos: SEPT2 (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5), SEPT6 (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14), SEPT3 (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) e SEPT7 (SEPT7). A especificidade dos monômeros de cada grupo de septinas é essencial para a formação e para a estabilidade dos filamentos (VALADARES *et al.*, 2017).

1.4. Complexos de septinas

Os monômeros de septinas humanas se associam para formar estruturas com alto grau de organização, sendo observados *in vivo* na forma de filamentos e em regiões onde a membrana apresenta curvatura (MOSTOWY; COSSART, 2012). Os mecanismos moleculares responsáveis pela associação dos monômeros de septinas ainda não foram completamente elucidados. Em uma revisão da literatura existente, Kinoshita (2002) propôs que as septinas humanas 2, 6 e 7 se organizam em filamentos em uma variedade de condições. Kinoshita observou que as septinas interagem preferencialmente com septinas de grupos diferentes, e propôs uma observação que ficou conhecida como “Regra de Kinoshita”, que sugere que cada septina no filamento SEPT2-SEPT6-SEPT7 pode ser substituída por outro membro de seu grupo (KINOSHITA, 2003). Tal concepção, além de manter a estequiometria e estabilidade do complexo, também serviu de base para diversos estudos funcionais e estruturais (KINOSHITA, 2003; VALADARES *et al.*, 2017).

A única estrutura tridimensional de um heterocomplexo de septinas humanas foi obtida por cristalografia e difração de raios X no grupo espacial $P 4_3 2 2$ com resolução de 4 Å (SIRAJUDDIN *et al.*, 2007). A estrutura apresenta um trímero formado pelas septinas 2, 6 e 7 em sua unidade assimétrica, e o uso de operações de simetria permite a observação de um hexâmero de ordem SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7, apresentado na **Figura 3**. O núcleo hexamérico do filamento apresenta 25 nm de comprimento e aproximadamente 5 nm de espessura. Na estrutura são observadas dois tipos de interface, a primeira ocorre pela associação de regiões N- e C-terminais, formando a "interface NC" com os contatos entre SEPT6 e SEPT7. A segunda interface compreende a interação entre SEPT6 e SEPT2, em que as regiões próximas ao sítio de ligação do nucleotídeo se associam, formando a chamada “interface G”. A estrutura também permite a identificação dos nucleotídeos de guanosina,

GTP – ligado a SEPT6, e GDP – ligado a SEPT2 e SEPT7 (visto que estes apresentam atividade catalítica para hidrolisar GTP).

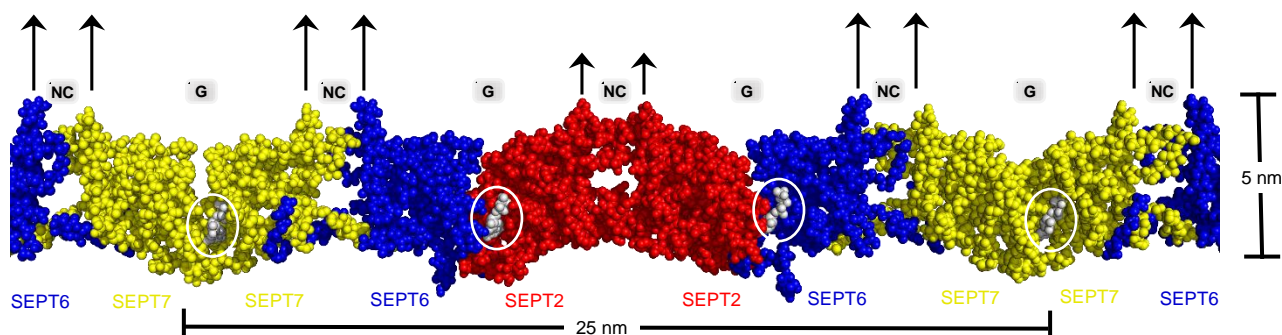


Figura 3. Estrutura do heterofilamento de septinas humanas. Na estrutura (PDB código 2QAG) são observados dois tipos de interface, uma onde os nucleotídeos de guanosina (em branco) estão próximos – interface G; e outra onde os domínios N- e C-terminais estão próximos – interface NC. As regiões onde os *coiled coils* se encontram estão indicadas por setas, sendo o *coiled coil* formado entre SEPT6 e SEPT7 mais proeminente. Fonte: Adaptada de Sirajuddin *et al.* (2007).

No heterocomplexo duas subunidades de SEPT2 interagem numa interface homodimérica pelas regiões N- e C-terminais com seu par. Na ocasião da publicação também foi reportada a resolução da estrutura de um dímero de SEPT2, desprovida de 46 aminoácidos do C-terminal, com a resolução de 3,4 Å (PDB 2QA5). Apesar da interação observada na unidade assimétrica entre os monômeros de septina 2 ocorrer através de uma interface G, a aplicação de operações de simetria permite a observação de um filamento formado exclusivamente por SEPT2, com interfaces G e NC se alternando ao longo do filamento. Essa observação constitui uma das primeiras evidências estruturais da ocorrência de promiscuidade na formação de complexos de septinas, termo que se refere à capacidade de diversas septinas de, na ausência de seu parceiro fisiológico (de acordo com a regra de Kinoshita), interagir com outra subunidade idêntica, dando origem a um homofilamento (SIRAJUDDIN *et al.*, 2007).

Apesar da quantidade de informação gerada com a estrutura cristalográfica do complexo de septinas, a baixa resolução e outros fatores impossibilitou a identificação dos domínios N- e C-terminais na estrutura. Durante o processo de refinamento da estrutura apresentada por Sirajuddin e colaboradores (2007) nenhuma densidade foi visualizada para os *coiled coils* dos C-terminais. Os autores descrevem que a orientação da alfa-hélice α_6 , proveniente de domínio G, poderia indicar a direção do posicionamento dos domínios C-terminais.

Estudos subsequentes aumentaram a entendimento sobre a plasticidade dos filamentos de septinas, com a detecção de octâmeros onde a SEPT9 (membro do grupo da SEPT3) interage diretamente com SEPT7 através da interface G nas extremidades dos complexos, no arranjo 9-7-6-2-2-6-7-9. O complexo que continha todos os subgrupos de septinas, apresentou variantes de peso molecular devido à presença de proteoformas de SEPT9 provenientes de *splicing* alternativo. Contudo, após a remoção de SEPT9 foi possível identificar complexos estáveis de massa molecular equivalente à massa de hexâmeros 7-6-2-2-6-7, demonstrando a maleabilidade destes heterocomplexos (SELLIN *et al.*, 2011). O complexo octamérico também foi detectado por Kim e colaboradores (2011), que avaliaram se a habilidade de formação de fibras e de anéis de septinas é prejudicada pela presença da proteoformas menores de SETP9 (SEPT9_i4 e SEPT9_i5). Também foi avaliado o mutante SEPT9 Δ N, sintetizado ainda menor que a proteoforma SEPT9_i5, e em todos os ensaios SEPT9 se mostrou apta a desencadear a formação de complexos. Apesar dos avanços obtidos nesses estudos, o papel dos membros da família da SEPT3 ainda está longe de ser elucidado.

Com o avanço da técnica de crio-microscopia eletrônica de partícula única foi descrita uma nova abordagem para a identificação do posicionamento dos monômeros de septinas no filamento. Diferentemente do hexâmero canônico 7-6-2-2-6-7, no qual monômeros de SEPT7 se apresentavam nas extremidades dos filamentos, com o uso de crio-microscopia foram observadas estruturas tanto com SEPT2, quanto com SEPT5 (da mesma família de SEPT2) localizadas nas extremidades dos filamentos, em conformação SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2 e SEPT5-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT5. Tais arranjos sugerem a necessidade de revisar a estrutura dos hexâmeros e octâmeros, e a organização dos filamentos (MENDONÇA *et al.*, 2019). Outro estudo publicado concomitantemente por Soroor e colaboradores (2019) também sugere a revisão da subunidade dos complexos de septinas humanas, sugerindo o arranjo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9-SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2, para os octâmeros, e SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2, para os hexâmeros (**Figura 4**). Ambos os arranjos foram observados por microscopia eletrônica e a conformação sugerida, incluindo SEPT9 – representante do grupo da SEPT3, é mais compatível com a organização das septinas de leveduras. Além disto, a disposição dos complexos observados permite a copolimerização de hexâmeros com octâmeros em filamentos maiores, através das associação das SEPT2 que ficam expostas nas extremidades.

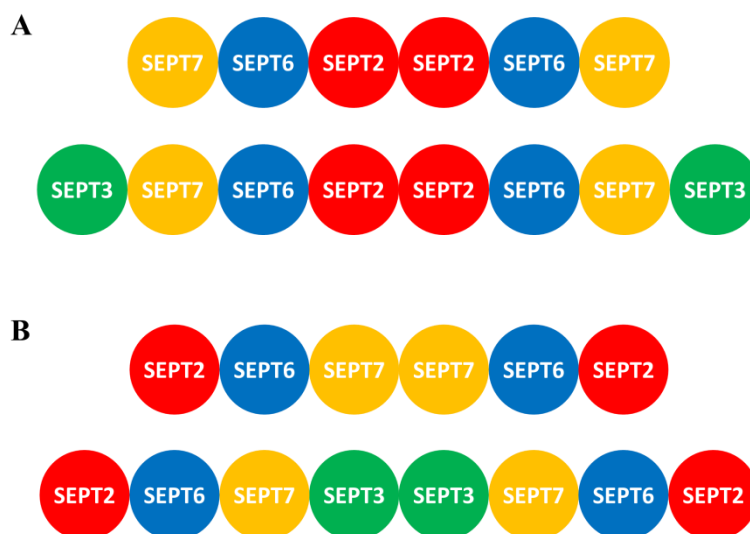


Figura 4. Modelo dos filamentos de septinas humanas disposto em hexâmeros e octâmeros. (A) Complexos de septinas baseados na estrutura cristalográfica publicada por Sirajuddin *et al.* (2007), onde a SEPT2 se encontra no centro. (B) Filamentos de septinas baseados em crio-microscopia e em microscopia eletrônica propondo a reorganização da subunidade dos complexos com a SEPT2 disposta nas extremidades – modelos apresentados por Mendonça *et al.* (2019) e Soroor *et al.* (2019). Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5. Motivo *coiled coil*

Coiled coil, em alguns casos chamados de zíperes de leucina, é um motivo estrutural onde duas ou mais hélices de proteínas interagem formando uma super-hélice. Estes arranjos são tidos como importantes nos processos de oligomerização de proteínas, e predições feitas a partir de sequências primárias indicam que aproximadamente 3% dos resíduos de aminoácidos das proteínas com sequência primária conhecida formam *coiled coils*. Essa conformação versátil em *coiled coil* é encontrada no citoesqueleto (queratina, septinas), em complexos proteicos na membrana relacionados ao tráfego de vesículas, em estruturas de reconhecimento molecular (zíperes de leucina em fatores de transcrição), em proteínas de fusão de membrana de vírus, em proteínas da matriz extracelular (laminina), dentre outros (WOLF; KIM; BERGER, 1997; BURKHARD; STETEFELD; STRELKOV, 2001).

As hélices deste motivo estrutural geralmente são anfipáticas e no *coiled coil* os resíduos hidrofóbicos se empacotam fazendo contato direto, se apresentando parcialmente enterrados. Esse arranjo propicia a observação de uma das características marcantes dos

coiled coils, um padrão na sequência de aminoácidos que se repete a cada sete resíduos, geralmente apresentando aminoácidos apolares na primeira e na quarta posições, e que é conhecido como *heptad*. As posições dos aminoácidos no *heptad* são designadas pelas letras *a b c d e f g*, onde resíduos nas posições *a* e *d* tendem a ser hidrofóbicos (frequentemente valinas ou leucinas), ao passo que resíduos nas posições *e* e *g* geralmente são polares ou carregados (**Figura 5**). A presença dos *heptads* confere estabilidade e seletividade aos *coiled coils*, pois permite que os resíduos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* sejam parcialmente enterrados (não expostos ao solvente), ao passo que os resíduos *e* e *g* ficam expostos ao solvente e frequentemente os resíduos na posição *e* de uma hélice interagem por ligações de hidrogênio ou pontes salinas com os resíduos na posição *g* de outra hélice (LUPAS, 1991; LUPAS; GRUBER, 2005).

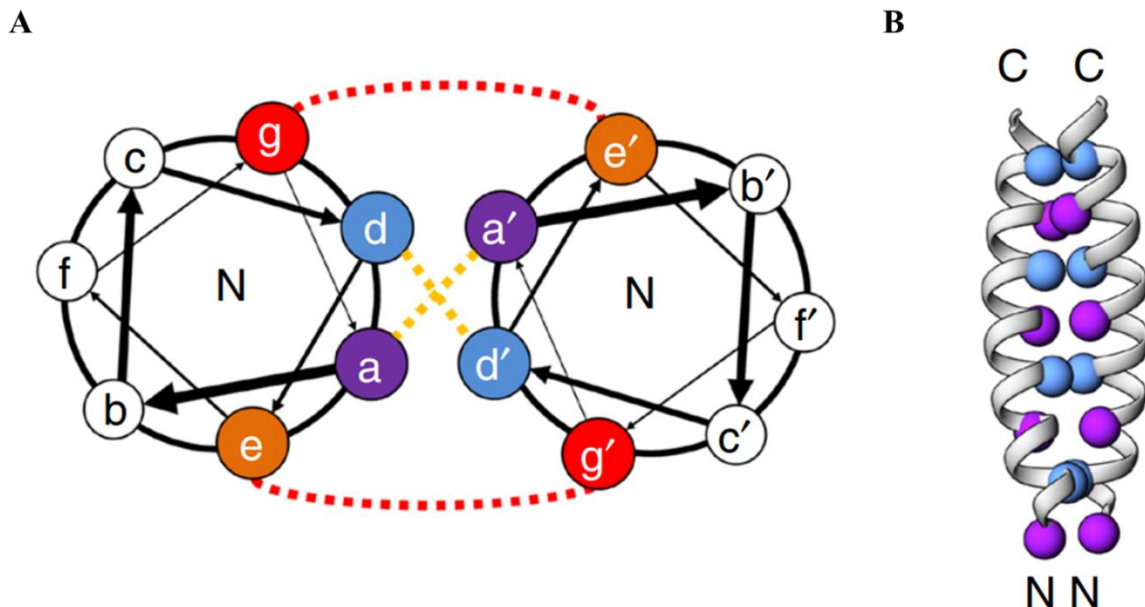


Figura 5. Estrutura de um *coiled coil* com fase paralela. (A) Visão superior da sequência de 7 aminoácidos de duas hélices de um *coiled coil* configurando a estrutura *heptad*. A interação hidrofóbica entre as hélices, tracejado amarelo, é apresentada ao núcleo e é efetuada pelos aminoácidos nas posições *a*, *a'*, *d* e *d'* não expostos ao solvente. Os aminoácidos *e*, *e'*, *g* e *g'* conferem maior estabilidade à estrutura, devido à formação de pontes salinas – tracejado vermelho. (B) Visão frontal de um motivo em *coiled coil* elucidando as interações entre os aminoácidos *a* e *d* representados pelas esferas azuis e roxas respectivamente. Fonte: Adaptado de Ljubetič *et al.* (2017).

Os *coiled coils* geralmente são formados por duas, três ou quatro hélices, entretanto arranjos com mais hélices já foram descritos, como o heptâmero no zíper de leucina GCN4 mutado (LIU *et al.*, 2006). Essas hélices podem estar dispostas de forma paralela ou antiparalela, e os *heptads* são observados em ambos os casos. Embora os *coiled coils* sejam geralmente estruturas bem regulares, alguns podem apresentar descontinuidades. Estas podem

ser representadas por deleções de um ou mais resíduos no registro do *heptad*. É interessante notar que a deleção de x resíduos é equivalente à inserção de $7 - x$ resíduos, sendo que descontinuidades podem se originar de mutações e processos evolutivos diferentes. As deleções de 3 resíduos são chamadas *stutters*, e as deleções de 4 resíduos, *stammers*; as inserções de 1 resíduo são denominadas *skips* (que matematicamente podem ser consideradas *2 stutters*), (BROWN; COHEN; PARRY, 1996).

1.6. Domínios C-terminais de septinas humanas

As regiões C-terminais das septinas humanas são características em cada grupo. No grupo da SEPT3 estão as septinas com os menores domínios C-terminal. A SEPT2 e os demais representantes de seu grupo apresentam um comprimento intermediário na região do C-terminal e tendem a formar *coiled coils* apenas entre si, na interface NC. O grupo da SEPT6 e da SEPT7 apresenta o domínio C-terminal de maior comprimento, com mais de 100 resíduos de aminoácidos. Destes dois grupos, o C-terminal é predito formar motivo em *coiled coil* em interfaces homotópicas (entre os representantes do mesmo grupo, que na falta do parceiro biológico evidenciam tal promiscuidade) e heterotópicas (associando-se com o grupo parceiro) (VALADARES *et al.*, 2017). Nas interfaces heterotópicas os *coiled coils* são formados com a interação da SEPT7 com os membros do grupo da SEPT6. Esta associação é corroborada pela Regra da Kinoshita que prevê que, na ocasião da associação dos monômeros de septinas para formar filamentos, estes podem ser substituídos pelos membros do mesmo grupo sem prejuízo para a estabilidade da interação (KINOSHITA, 2003).

A existência de *coiled coils* nas regiões C-terminais das septinas humanas das famílias da SEPT2, SEPT6 e SEPT7 foi demonstrada por diversas técnicas e a especificidade da interação entre SEPT6 e SEPT7 é evidente. Ensaios de copurificação demonstraram o quão peculiar é esta interação, construções com variados tamanhos de C-terminal copurificavam, diferentemente de construções de N-terminal e da combinação entre ambas. Estes achados fortalecem a importância da região dos C-terminais no recrutamento de monômeros de septinas na formação de filamentos (SHEFFIELD *et al.*, 2003).

A afinidade de associação entre os domínios C-terminais do grupo da SEPT6 e o C-terminal de SEPT7 – em todas as possíveis combinações das construções estudadas – foi caracterizada por ressonância plasmônica de superfície (SALA *et al.*, 2016). A técnica, que permite acompanhar a cinética das interações moleculares em tempo real utilizando biossensores, foi empregada imobilizando construções dos C-terminais de SEPT6 (todos os

representantes do grupo) e de SEPT7 em diferentes chips. Os chips foram utilizados para capturar construções das mesmas septinas, porém livres, injetadas em fluxo constante e em várias concentrações. Para a interação da SEPT7 com SEPT6, SEPT8, SEPT10 e SEPT11 os ensaios revelaram uma associação muito maior com dissociação bastante lenta, o que demonstra a seletividade entre estas regiões que dão preferência a parceiros para formar hétero *coiled coils*. Assim, sugere-se que o domínio C-terminal atue de forma a favorecer interações não promíscuas entre septinas de diferentes grupos, sendo responsáveis ao menos por parte da seletividade na formação de heterofilamentos.

1.7. Domínios de septinas humanas utilizados neste estudo

Para este trabalho foram selecionadas as regiões dos domínios C-terminais dos genes de septinas humanas que são preditos formarem hétero *coiled coils* através da interface NC, em que monômeros de septina 7 se associam seletivamente a monômeros do grupo da septina 6 (qualquer um membro do grupo) na formação de heterofilamentos. Assim, foram escolhidos do grupo da SEPT7: seu único membro, SEPT7; e do grupo da SEPT6 os genes: SEPT6, SEPT11 e SEPT14 (devido às limitações econômicas, os demais genes do grupo não puderam ser testados neste projeto). As sequências dos genes foram escolhidas com base em predições de estruturas do tipo *coiled coil* observando os padrões dos *heptads* (Figura 6) com a utilização de *softwares* estabelecidos na literatura, como COILS (LUPAS *et al.*, 1991), MARCOIL (DELORENZI; SPEED, 2002) e Paircoil (BERGER *et al.*, 1995). Estes *softwares* analisam as sequências de aminoácidos sob as janelas dos *heptads* de *coiled coils*, observando as posições *a* e *d* para os aminoácidos hidrofóbicos.

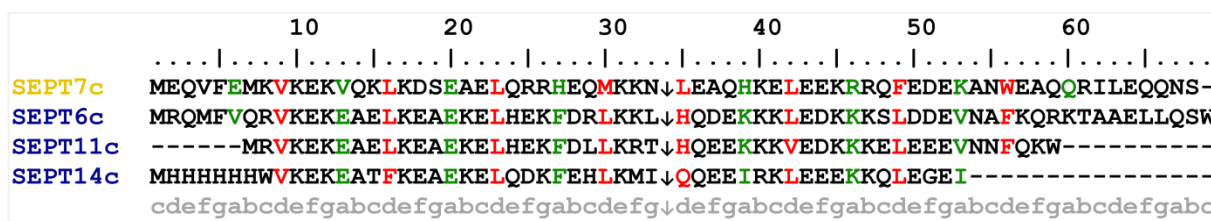


Figura 6. Alinhamento das sequências de SEPT7 e do grupo da SEPT6 deste estudo. O modelo da interação heterotópica do *coiled coil* formado por SEPT7 (em amarelo) com a parceira integrante do grupo da SEPT6 (em azul) destaca as posições *a* (verde) e *d* (vermelho) do *heptad*. A organização dos *heptads* está representada em cinza e a quebra desse padrão (*stutter*) está indicada com uma seta (↓). Fonte: Elaborada pelo autor.

1.7.1 Grupo da SEPT7

A septina 7 humana, única de seu grupo, é uma GTPase que tem a capacidade de hidrolisar guanosina trifosfato pelo motivo G através de um interruptor molecular (KINOSHITA *et al.*, 1997; VETTER; WITTINGHOFER, 2001). Por apresentar esta atividade catalítica, SEPT7 é observada em estruturas cristalográficas ligada apenas a GDP ou a análogos não hidrolisáveis de GTP. A classe de proteínas GTPase regula diversos processos celulares, através de sua atividade hidrolítica, promovendo controle sobre atividades biológicas, como a formação de filamentos no caso das septinas (ZENT; WITTINGHOFER, 2014; VALADARES *et al.*, 2017). SEPT7 participa da formação de filamentos do citoesqueleto, assim como outras septinas, e foi observado que o silenciamento de seu gene por *knockdown* causa despolarização celular e estresse às fibras de actina até desintegrarem (KREMER; ADANG; MACARA, 2007). Esta proteína apresenta diversas isoformas de acordo com órgão onde é expressa, decorrentes de *splicing* alternativo, e é homóloga ao produto do gene do ciclo de divisão celular CDC10 de *S. cerevisiae*. A presença do domínio C-terminal com um dos maiores comprimentos dentre os grupos de septinas humanas é intrínseca de SEPT7, o que possibilita a interação heterodimérica com o grupo parceiro da SEPT6 por meio de hétero *coiled coils* (SHEFFIELD *et al.*, 2003).

1.7.2 Grupo da SEPT6

O grupo da SEPT6 é composto pelas septinas humanas 6, 8, 10, 11 e 14, sendo uma classe peculiar de septinas humanas por não possuírem atividade hidrolítica, sendo consideradas proteínas somente de ligação de GTP. A perda da capacidade de hidrólise é atribuída à ausência da treonina catalítica no interruptor molecular (*switch* I) do motivo G2, sendo o domínio G do grupo da SEPT6 apenas de ligação de nucleotídeos de guanosina trifosfato. Assim como em outros organismos (*S. cerevisiae*, *Drosophila* e *Danio Rerio*), as proteínas do grupo homólogo de SEPT6 não apresentam a treonina conservada na região do *switch* I. Sugere-se que esta especificidade demonstra ser importante para as funções desempenhadas por este grupo, em que apenas a ligação com GTP proporcione a estabilidade para viabilizar a interação das interfaces com outros grupos de septinas na formação de filamentos – no entanto, a razão da perda deste aminoácido ainda não está clara (ZENT; WITTINGHOFER, 2014). Até o presente momento, a única estrutura cristalográfica depositada no PDB contendo membro do grupo da SEPT6 de humanos é representada pelo

hexâmero 7-6-2-2-6-7 (PDB código 2QAG). A identificação da organização deste filamento foi possível pela densidade eletrônica atribuída à presença de GTP, organização esta que é semelhante ao observado nos ensaios bioquímicos descritos na literatura (SIRAJUDDIN *et al.*). Neste mesmo estudo, Sirajjudin e colaboradores presumem que as extensões do C-terminal de SEPT6 e de SEPT7, com alta probabilidade de formação de *coiled coils* (**Figura 7**), contribuam para a formação dos complexos de septinas, porém a região não foi visualizada no mapa de densidade eletrônica. Além de formarem *coiled coils* entre si, as septinas Cdc3 e Cdc12 de *S. cerevisiae* (proteínas homólogas às septinas humanas 6 e 7 respectivamente) apresentam regiões C-terminais que são responsáveis pelo pareamento com outros filamentos de septinas, formando feixes de α -hélices, estabelecendo uma organização supramolecular (BERTIN *et al.* 2008).

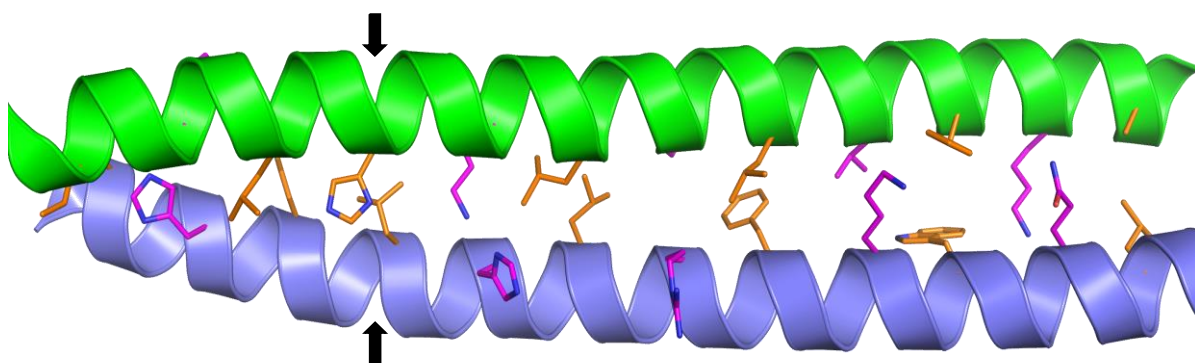


Figura 7. Modelo ilustrativo da interação do *coiled coil* formado por SEPT6c-SEPT7c. Modelo por homologia mostra SEPT6c (verde) e SEPT7c (azul) associadas pela interação de seus aminoácidos hidrofóbicos, destacados nas posições “A”, em magenta, e “D”, em laranja. As setas em preto indicam a posição da quebra do *heptad* (*stutter*), que é compensado por um relaxamento local da super-hélice de mão-esquerda. Fonte: Elaborado pelo autor usando Modeller 9.22 e PyMOL 1.0.

2. JUSTIFICATIVA

As septinas humanas são requisitadas na citocinese, e mutações ou alterações fisiológicas que comprometam a formação dos filamentos de septinas podem desencadear diversas doenças, dentre elas, cânceres, mal de Alzheimer e mal de Parkinson são algumas abordadas pela literatura. No entanto, os mecanismos que regulam a formação de complexos de septinas ainda não foram esclarecidos. Ao tempo em que é notada considerável especificidade entre os diferentes subgrupos de septinas na oligomerização, também já foi demonstrada promiscuidade entre subunidades do mesmo grupo, que se associam entre si. A dinâmica da interação entre as septinas evidenciam uma importante área de estudo (VALADARES *et al.*, 2017).

A automontagem de heterofilamentos de septinas foi observada *in vivo* e *in vitro*, e ainda não se sabe muito sobre os fatores que contribuem para o recrutamento ordenado das subunidades neste processo. A presença de regiões C-terminais extensas nos grupos de SEPT6 e SEPT7 – com aminoácidos característicos de *heptads* e preditos como *coiled coils* – é tida como uma das principais características para a correta associação dos monômeros de septinas. Esta interação das hélices ocorre de forma heterotópica, contudo a organização destes *coiled coils* é pouco conhecida, uma vez que tais estruturas podem assumir diversos posicionamentos nos cristais dificultando a resolução da estrutura (**Figura 8**) (SIRAJUDDIN *et al.*, 2007).

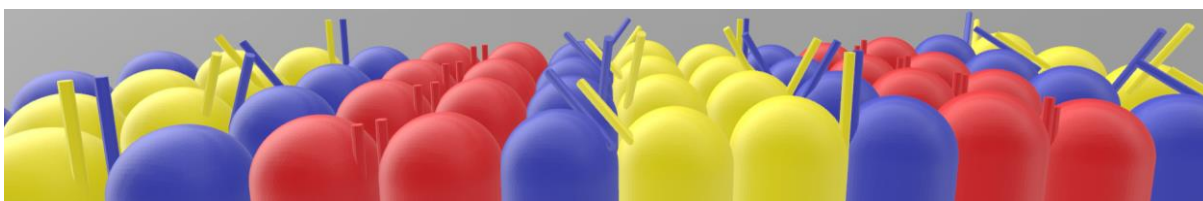


Figura 8. Modelo da interação dos filamentos de septinas. Os monômeros de septinas pareiam-se ordenadamente na formação de filamentos. As interações entre os domínios C-terminais auxilia na manutenção da estabilidade do complexo, como ocorre na formação de hétero *coiled coils* entre os C-terminais do subgrupo da SEPT6 (em azul) e de SEPT7 (em amarelo). Porém tais estruturas podem assumir várias posições durante o processo de oligomerização, dificultando a compreensão da mesma. O subgrupo de SEPT2 (em vermelho) apresenta C-terminais mais curtos. Fonte: Elaborada pelo autor.

Abordagens experimentais ainda não revelaram a orientação das hélices dos hétero *coiled coils* das septinas humanas (se são paralelas ou antiparalelas) e nem demonstraram qual é a fase de interação entre os resíduos delas. Uma vez que a predição dos *heptads* é conhecida, diversos fatores, fisiológicos ou não, podem alterar a organização do núcleo hidrofóbico formado pelos aminoácidos nas posições *a* e *d*. De acordo com a protonação e a composição do microambiente onde se localizam, as hélices podem interagir ao longo de toda região do *coiled coil* ou apenas parcialmente, associando-se em diferentes extremidades (Figura 9).

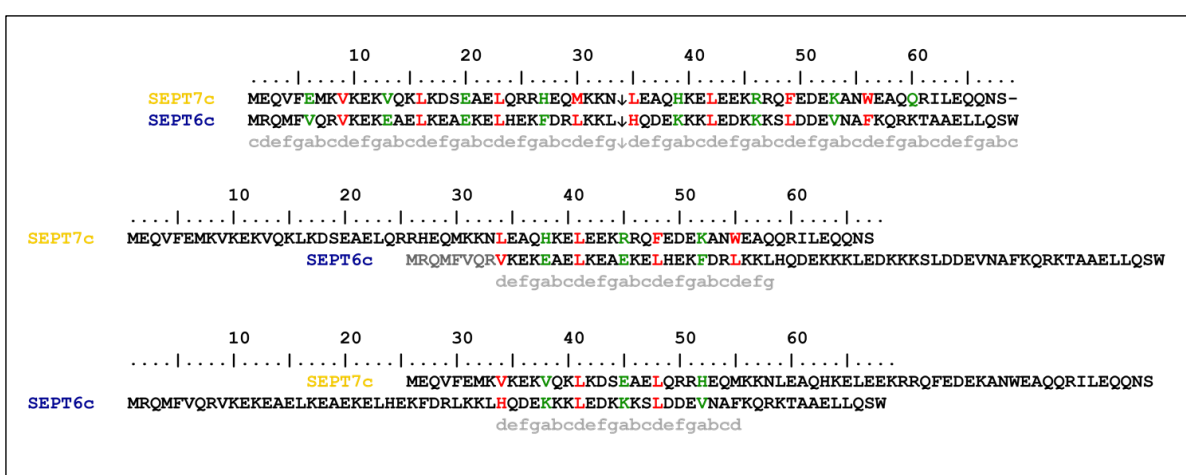


Figura 9. Diferentes pareamentos possíveis para os C-terminais de SEPT6c e SEPT7c paralelos. A presença das sequências em *heptad* possibilita diversos arranjos para a associação dos aminoácidos hidrofóbicos em diversas fases. A figura ilustra possibilidades para uma estrutura paralela (na mesma direção), entretanto a associação entre as hélices é passível de ser antiparalela (em direções opostas). Fonte: Elaborada pelo autor.

Os motivos em *coiled coil* têm sido utilizados como ferramenta biotecnológica devido a capacidade de reconhecimento de parceiros de oligomerização. A literatura descreve a construção de nanopartículas polidrais para transporte de fármacos com maior estabilidade feitas com blocos de peptídeos desenhados com a presença de *coiled coil* (RAMAN *et al.*, 2006). Anticorpos fusionados com *coiled coils* promovem uma atuação mais seletiva, diminuindo a ação destes em tecidos não alvos, direcionando-os especificamente aos sítios tumorais de interesse (TRANG, 2019). Estudos também avaliaram o potencial de adicionar *coiled coils* como *tags* para purificação de proteínas de interesse por cromatografia de afinidade em colunas contendo sequência complementar, no entanto a alta estabilidade do pareamento demandava metodologias de eluição que podem danificar a proteína, como uso de

acetonitrila ou tampão com baixo pH (MÜLLER; ARNDT; ALBER, 2000; MASON; ARNDT, 2004).

Tento em vista as lacunas presentes na literatura e o potencial uso do motivo presente nos C-terminais das septinas humanas, o presente trabalho ambiciona obter estruturas cristalográficas de *coiled coils* de septinas das famílias das SEPT6 e SEPT7, e também tentar obter estruturas dos hétero *coiled coils* de septinas desses dois grupos. Desta forma, a obtenção da estrutura cristalográfica do hétero *coiled coil* e estudos dos estados oligoméricos destas regiões permitirão compreender melhor a função desta estrutura na montagem dos filamentos de septinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a estrutura tridimensional e as interações dos heterodímeros formados pelas construções dos domínios C-terminais das septinas humanas 6, 7, 11 e 14, estruturalmente preditos como *coiled coils*.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar ensaios de expressão das construções dos domínios C-terminais das septinas humanas 6, 7, 11 e 14 humanas em *E. coli* visando identificar as condições onde essas proteínas são expressas em sua forma solúvel.
- Purificar as proteínas por cromatografias de afinidade (Ni^{2+}) e de exclusão molecular.
- Promover a formação de heterodímeros, utilizando concentrações equimolares de diferentes septinas.
- Verificar a formação de dímeros com auxílio de *crosslinkers* químicos com posterior visualização por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).
- Executar ensaios de cristalização utilizando septinas puras ou misturas equimolares.
- Submeter os cristais obtidos a difração de raios X, em difratômetro e/ou síncrotron, para coleta de dados.
- Processar os dados de difração obtidos e resolver a estrutura cristalográfica utilizando os programas XDS, CCP4 e PHENIX.

- Analisar as densidades eletrônicas e estruturas obtidas, observando se os *coiled coils* são paralelos ou antiparalelos e qual a fase entre as hélices.
- Realizar ensaios biofísicos adicionais, como ultracentrifugação analítica (AUC), espalhamento de luz em múltiplos ângulos acoplado a cromatografia de exclusão molecular (SEC-MALS), desnaturação térmica e análise de estrutura secundária por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese dos genes

As sequências dos genes de septinas humanas foram escolhidas com base na predição de estrutura *coiled coil* feita no programa COILS (LUPAS *et al.*, 1991), disponibilizado online, que designa a melhor região com alta pontuação indicando a presença da estrutura. Os genes selecionados para este trabalho abrangeram os domínios C-terminais das septinas SEPT6 (UniProtKB: Q14141 – do resíduo 342 ao 408), SEPT7 (UniProtKB: Q16181 – do resíduo 357 ao 423), SEPT11 (UniProtKB: Q9NVA2 – do resíduo 347 ao 397) e SEPT14 (UniProtKB: Q6ZU15 – do resíduo 360 ao 403). As construções dos genes foram clonadas no vetor de expressão pET24a(+) (*GenOne*), entre os sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*, e que apresenta como gene de seleção a resistência ao antibiótico canamicina. Em cada construção foi inserida a sequência codificante da *tag* de polihistidina (6xHisTag) que permite a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a níquel (Ni^{2+}).

As construções de SEPT6, SEPT7 e SEPT11 apresentaram a cauda de polihistidina no final da sequência (com os resíduos LEHHHHHH), já a construção de SEPT14 foi sintetizada com 6xHisTag no início da sequência seguida de adição de uma trinca de bases que codifica o triptofano. Para SEPT11 também foi adicionado um triptofano extra para facilitar a quantificação das amostras de proteína por espectrofotometria de absorção ($\text{Abs}_{280\text{nm}}$) após as etapas de purificação. Não foi inserido nenhum sítio de clivagem da *tag* de histidina nas construções. Abordagens anteriores em nosso grupo de pesquisa utilizaram construções que permitiram a clivagem da *tag*, permitindo a utilização de septinas clivadas para produzir cristais que difrataram a alta resolução (SEPT1c, SEPT5c, SEPT7c). Apesar da utilização de várias abordagens, até o momento a literatura não relata sobre a resolução do problema das fases para estas estruturas de *coiled coil*. Parte da dificuldade está relacionada com as limitações na identificação do início e fim de cada hélice e do registro das hélices no cristal. Desta forma, no presente projeto foi selecionada a estratégia de manter a cauda de histidina para criar uma separação física no fim de cada hélice. As construções das septinas utilizadas neste trabalho serão denominadas SEPT6c, SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c, indicando a região do C-terminal selecionada.

4.2. Preparo de células competentes

Células de *E. coli* foram previamente multiplicadas e induzidas a competência através de tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2) para facilitar a adsorção dos vetores de expressão pela membrana bacteriana. Na capela de fluxo laminar, um pré-inóculo foi preparado para reativação do metabolismo das células que estavam estocadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e para multiplicação celular, crescendo-as durante a noite a $37\text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 220 rpm. Uma alíquota de 100 μL de células estocadas com densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 1 ($\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 1$) foi adicionada a 5 mL meio Luria-Bertani – meio LB líquido (peptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1% (m/v), pH 7,0) num tubo cônico, juntamente com a adição do antibiótico cloranfenicol a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, considerando a resistência das cepas utilizadas. Posteriormente, 1 mL destas células foi inoculado em 50 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em frasco tipo Erlenmeyer. O meio foi levado à incubadora com agitação orbital a $37\text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 220 rpm para crescimento das células até a $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,6$ e depois o volume foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, previamente resfriado, que foi incubado por 15 minutos em banho de gelo.

Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 3.590 g durante 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante (fração líquida) foi descartado, o sedimentado de células foi ressuscitado com 20 mL de CaCl_2 estéril (100 mM) e a amostra foi novamente incubada em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada mais uma vez a 3.590 g durante 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento de células foi ressuscitado com 1,5 mL de solução estéril de CaCl_2 (100 mM) acrescida de glicerol 15% (v/v), que atua como crioprotetor atenuando os danos a células pelos cristais de gelo durante o congelamento para estoque. A amostra foi alíquotada em microtubos cônicos, contendo 100 μL em cada, que foram estocados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para uso posterior.

4.3. Produção heteróloga

4.3.1. Transformação das células

As células foram transformadas pelo método do choque térmico e foram realizadas com a adição de 2 μL os plasmídeos nas seguintes concentrações aproximadas: SEPT6c – 19,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, SEPT7c – 25,8 $\text{ng}/\mu\text{L}$, SEPT11c – 64,7 $\text{ng}/\mu\text{L}$, SEPT14c – 77,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. No fluxo laminar e em banho de gelo, os plasmídeos foram adicionados a microtubos rotulados

contendo 100 μL de células competentes com $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,6$. As amostras foram acondicionadas em gelo por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para o banho seco em um termobloco a 42 °C durante 90 segundos. Retornou-se as amostras ao gelo e, no fluxo laminar, foram adicionados 900 μL de meio LB ao tubo. Os tubos foram incubados a 37 °C, sob agitação de 220 rpm, durante 1 hora. Posteriormente, no fluxo laminar, 100 μL do meio com as células crescidas foi semeado com esferas de vidro em placas de Petri contendo 25 mL de meio LB-ágar – meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 2% (m/v) e os antibióticos necessários para a seleção das colônias. O meio foi suplementado com os antibióticos cloranfenicol (a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e canamicina (a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), considerando a resistência das cepas e dos plasmídeos respectivamente. As placas foram identificadas, vedadas e acondicionadas em estufa a 37 °C para crescimento das colônias durante a noite.

4.3.2. Ensaios de expressão e de solubilidade

Foram realizados ensaios de expressão heteróloga e de solubilidade em diferentes cepas de *E. coli* visando obter as proteínas SEPT6c, SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c na forma solúvel. Foram executados ensaios utilizando células BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Lemo21(DE3) e Rosetta(DE3), testando condições variadas de temperatura, tempos de expressão, agitação, uso de L-ramnose (para a cepa Lemo21), indução por IPTG ou autoindução. Amostras foram coletadas para monitoramento das frações proteicas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

No fluxo laminar, pré-inóculos foram preparados com colônias isoladas das placas previamente confeccionadas adicionando os isolados a tubos cônicos contendo 5 mL de meio LB com cloranfenicol a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e canamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células foram cultivadas durante a noite a 37 °C sob agitação de 220 rpm. No dia seguinte, os ensaios de expressão com as diferentes cepas foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 25 mL de meio de cultura LB ou meio autoindutor ZYM-5052 (STUDIER, 2014) inoculando 1 mL do pré-inóculo e suplementando com cloranfenicol (a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e canamicina (a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para os meios onde as células Lemo21(DE3) foram crescidas, adicionou-se L-ramnose a 500 mM. Todos os inóculos foram incubados a 37 °C sob agitação de 220 rpm.

Para os ensaios de expressão e solubilidade a 18 °C as amostras foram submetidas a crescimento prévio das células durante 2 h incubadas a 37 °C sob agitação de 220 rpm, depois foram imediatamente transferidas para incubadora climatizada a 18 °C. Amostras de 5 mL

foram coletadas em tempos selecionados e transferidas a tubos cônicos, para posterior análise da produção heteróloga. Nos ensaios de expressão e solubilidade a 37 °C, as células foram crescidas em temperatura constante e amostras de 5 mL foram coletadas nos tempos selecionados. As amostras coletadas foram centrifugadas a 7.030 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuscitado em 2 mL tampão de lise (Tris-HCl 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, 3 mM MgCl₂, glicerol 5% (v/v)). A lise das células ocorreu por sonicação utilizando ultrassonicador (*Qsonica*) por 1 min e 40 s (com períodos de 5 s de sonicação, intervalos de 55 s e amplitude de 20%), com as amostras mantidas em banho de gelo durante o processo. Imediatamente em seguida, uma fração de 90 µL foi coletada (representando o lisado bruto) para o preparo de amostra para análise em SDS-PAGE. O volume remanescente das amostras foi centrifugado a 14.400 g durante 15 minutos a 4 °C e, logo em seguida, também foram coletados 90 µL do sobrenadante para verificar a presença de proteínas solúveis. O material restante foi descartado.

4.3.3. Produção em larga escala

Analisadas as melhores condições de expressão e de solubilidade para cada proteína, fermentações em larga escala foram executadas. Foi preparados 5 mL de pré-inóculo, conforme mencionado anteriormente, com a cepa Lemo21(DE3) – cepa que obteve o melhor desempenho na expressão das proteínas. Foi preparado 1 L de meio autoindutor ZYM-5052 para cada gene, fracionado em 2 frascos Erlenmeyer (com 500 mL cada). No fluxo laminar, os meios de cultura foram inoculados com 1 mL de pré-inóculo, cloranfenicol a 34 µg/mL e canamicina a 50 µg/mL. A expressão foi realizada incubando os meios a 37 °C sob agitação de 220 rpm durante 10 horas. Em seguida, os meios foram centrifugados em frascos de 500 mL a 6.760 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos de células obtidos foram armazenados a - 20 °C.

4.4. Purificação das proteínas

4.4.1. Purificação por cromatografia de afinidade

No procedimento de purificação os sedimentos de células das expressões em larga escala foram ressuscitados separadamente até o volume de 50 mL com de tampão de lise (Tris-HCl 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, 3 mM MgCl₂, glicerol 5% (v/v)). A lise foi

realizada em ultrassonicador com as amostras em banho de gelo, durante 20 minutos (com períodos de 10 s de sonicação, intervalos de 50 s e amplitude de 30%). As amostras lisadas foram transferidas para um tubo cônico estéril e novo, previamente gelado, para centrifugação a 17.400 g durante 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para provetas onde foi adicionado 3% (v/v) do tampão de eluição da cromatografia (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM) – esta última etapa foi realizada no intuito de minimizar ligações inespecíficas à coluna de outras proteínas presentes no sobrenadante. As amostras foram filtradas em filtro com membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm para reter as partículas sólidas antes de injetar na coluna.

Após lavar o sistema de cromatografia ÄKTA Prime plus (*GE Healthcare*) com água Milli-Q, o tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM) foi injetado para equilibrar o sistema e as colunas de cromatografia. Foram utilizadas as colunas de afinidade HisTrap HP (*GE Healthcare*) de 1 mL, sob o fluxo de 1 mL/min de fluxo e com alarme de pressão máxima ajustado para 0,3 MPa. A amostra do sobrenadante foi injetada ao sistema com fluxo constante favorecendo a associação das moléculas por afinidade aos íons de metal imobilizados (IMAC), em que a captura das proteínas marcadas com a cauda de polihistidina é realizada pelos íons Ni²⁺ presentes na coluna. Da fração que atravessou a coluna contendo moléculas que não se ligaram a coluna (considerada o *flow through*) também foram coletadas amostras para analisar o perfil por SDS-PAGE.

Ainda sob o fluxo do tampão de ligação passando pelo sistema de cromatografia e pela coluna, uma primeira lavagem foi realizada automaticamente com o acréscimo de 10-16% do tampão de eluição ao fluxo (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM) para remover possíveis proteínas que se ligaram inespecificamente à coluna. Para a eluição total das proteínas de interesse, a injeção do tampão de eluição foi aumentada para 100% do tampão de eluição. A saturação do fluxo de imidazol na coluna favoreceu com que este competisse vigorosamente mais do que o grupo imidazol da cadeia lateral das histidinas, liberando as proteínas de interesse e o volume eluído foi coletado em tubos cônicos. As amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente evitando a precipitação de proteínas com armazenamento em gelo. Amostras de cada etapa foram coletadas para monitoramento em SDS-PAGE.

4.4.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular

Para a realização das cromatografias de exclusão molecular (SEC), uma coluna de purificação do tipo coluna HiLoad® 16/600 Superdex® 75 pg (*GE Healthcare*) foi acoplada ao sistema ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*). Ambos foram lavados com água Milli-Q, para retirada das soluções de armazenamento, e em seguida foram calibrados com o mesmo tampão utilizado na IMAC (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM). As proteínas foram injetadas no sistema e resultaram em perfis cromatográficos individuais. De cada pico obtido nas cromatografias foi separada uma amostra (aproximadamente 90 µL) para análise por SDS-PAGE, permitindo a identificação do volume morto da coluna (*void*) e do volume de eluição específico de cada proteína deste estudo. Sempre que houve a necessidade de concentrar as amostras, quando se obtinham grandes volumes, foram utilizados filtros de centrifugação Amicon® Ultra-15 (*Milipore*) com membrana de 3 kDa.

Realizada a verificação da amostra coletada da SEC na eletroforese em gel, as amostras correspondentes às proteínas de interesse foram quantificadas em espectrofotômetro V-530 (*Jasco*). A leitura do espectro foi feita com Abs_{280nm} (absorbância a 280 nm) utilizando cubetas de quartzo de 1x1cm (largura x comprimento). O branco foi anteriormente feito com a leitura do espectro do tampão de ligação utilizado na SEC. O cálculo da concentração das amostras foi realizado utilizando a equação de Beer-Lambert $c=Abs/(\epsilon.l)$, sendo c a concentração (em mol.L⁻¹), Abs a absorbância medida (em AU), ϵ o coeficiente de extinção teórico (em mol/L⁻¹.cm⁻¹) e l o comprimento do caminho óptico (em cm). O coeficiente de extinção teórico – e demais parâmetros – foi obtido utilizando o programa *ProtParam* (GASTEIGER, 2005), disponível online, utilizando a sequência de aminoácidos de cada construção.

Também foram realizados ensaios de purificação por exclusão molecular e caracterização dos estados oligoméricos com amostras puras de SEPT7c combinadas com as amostras de SEPT6c, SEPT7c e SEPT11c. As amostras foram misturadas em razões equimolares (estequiometria de 1:1) para verificar a formação de heterodímeros. Todas as amostras obtidas foram analisadas por SDS-PAGE após as injeções na coluna de exclusão molecular. Variações destes ensaios também foram realizadas submetendo a mistura das amostras a diferentes processos, como: aquecimento, agitação, incubação com ureia (com posterior diálise em filtros de centrifugação). Dados não apresentados, pois não foi identificada influência destes processos sob os resultados.

4.4.3. Calibração da coluna de cromatografia de exclusão molecular

A coluna HiLoad® 16/600 Superdex® 75 pg (*GE Healthcare*) foi calibrada com o uso de cinco padrões de proteínas globulares de massa conhecida e azul dextrano a fim de possibilitar o cálculo das massas das amostras utilizando o volume de eluição nos experimentos de gel filtração. A coluna foi equilibrada com tampão composto por Tris-HCl 20 mM pH 7,6 e cloreto de sódio 150 mM. O kit de calibração (*GE Healthcare*) utilizado de acordo com as instruções do fabricante contém os seguintes padrões: ribonuclease A (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa) e Blue Dextran (2.000 kDa). O azul dextrano foi empregado a fim de determinar o “volume morto (ou vazio)” da coluna de cromatografia, volume de eluição das moléculas que não interagem com a matriz da coluna, e para checar o empacotamento da coluna. O cálculo das massas relativas foi realizado com o coeficiente de partição (K_{AV}), conforme a equação 1:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (1)$$

onde V_e é o volume eluição de cada padrão molecular, V_o é o volume morto da coluna e V_t é o volume geométrico total da coluna. O gráfico da curva padrão foi construído com $K_{AV} \times \log(\text{Peso Molecular})$.

4.5. Técnicas eletroforéticas

4.5.1. Eletroforese SDS-PAGE Tris-Glicina

Para a eletroforese SDS-PAGE, géis de poliacrilamida foram preparados, sendo a gel separador 15% (m/v) [acrilamida 14,5% (v/v), bisacrilamida 0,5% (v/v), Tris-HCl 250 mM pH 8,8, SDS 0,3% (m/v), PSA 0,1% (m/v), TEMED 0,06% (v/v)] e o gel concentrador 5% (m/v) [acrilamida 4,84% (m/v), bisacrilamida 0,16 % (m/v), Tris-HCl 140 mM pH 6,8, SDS 0,3 % (m/v), PSA 0,1 % (m/v), TEMED 0,12% (v/v)]. As amostras coletadas dos ensaios, foram preparadas na capela adicionando de tampão de amostra 4x [azul de bromofenol 0,4% (m/v), SDS 8% (m/v), glicerol 40% (v/v), Tris-HCl 200 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 10% (m/v)] e fervidas durante 5 minutos. A cuba de eletroforese foi montada com o tampão de corrida [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (m/v), pH \approx 8,3], foram aplicados 15 μ L de

amostra em cada poço e 5 µL do marcador de peso molecular de proteínas (*Thermo Fisher Scientific*) (LAEMMLI, 1970). Para o gel de SDS-PAGE Tris-Glicina foi utilizado o marcador de peso molecular de proteínas *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (*ThermoScientific*), que apresenta os padrões: beta-galactosidase (116 kDa), soro albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), beta-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

A eletroforese foi executada com os parâmetros: 40 mA e 200 V – variando o tempo entre 1h e 2h 30 min. Após a finalização das corridas, os géis foram corados com solução de azul de *Coomassie* [*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v), 50% de metanol (v/v), 10% de ácido acético (v/v)] em recipiente adequado e ficaram sob agitação por aproximadamente mínimo 30 minutos. Logo após, a solução de azul de *Coomassie* foi retirada do recipiente e os géis foram decorados com solução de ácido acético 20% (v/v), que foi trocada várias vezes até se obter géis com maior nitidez, para posterior análise e fotodocumentação.

4.5.2. Eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina

A análise das proteínas também foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão Tris-Tricina. Originalmente a técnica de eletroforese em gel elaborada por Laemmli (1970) utiliza tampão glicina, no entanto a substituição por tricina permite uma migração mais rápida desta molécula em relação à proteína. O gel é submetido a um campo elétrico de menor voltagem, demorando mais tempo que a eletroforese convencional, e, além disso, seu preparado é realizado com a adição de glicerol. Tais características possibilitam que as proteínas que apresentam baixo peso molecular migrem mais rápido, favorecendo uma melhor resolução destas bandas no gel (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987).

O gel de resolução foi preparado com volume aproximado de 7 mL com poliacrilamida 16% (v/v) (acrilamida 15,5% e bisacrilamida 0,5%), Tris-HCl 1 M, SDS 0,1% (m/v), glicerol 13,5% (m/v), PSA 0,085% (v/v), tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,085% (v/v) e H₂O Milli-Q q.s.p. Para o gel de empilhamento foi preparado aproximadamente 1,7 mL contendo poliacrilamida 4% (v/v) (acrilamida 3,87% e bisacrilamida 0,13%), Tris-HCl 0,7 M, SDS 0,07% (m/v), PSA 0,12% (v/v), TEMED 0,12% (v/v) e H₂O Milli-Q q.s.p. Antes da aplicação no gel, as amostras foram aquecidas durante 10 minutos a 95 °C com a utilização de tampão de amostra (4x) contendo azul de bromofenol 0,4% (m/v), SDS 8% (m/v), glicerol 40% (v/v), Tris-HCl 200 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 20% (m/v) e H₂O Milli-Q q.s.p.

A corrida de eletroforese ocorreu com o aparato Mini-PROTEAN Tetra cell (*Bio-Rad*), sob a fonte de energia Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 (*GE Healthcare*). A corrida ocorreu com os parâmetros: 1ª etapa (1 h, 30 V, 90 mA), 2ª etapa (3h 30 min, 105 V, 105 mA). Na cuba foi utilizado o tampão da cuba Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1% e H₂O Milli-Q q.s.p. com pH \approx 8,25 – com volume suficiente para cobrir os géis no aparato de eletroforese. Foram pipetados 15 μ L de amostra por poço e 5 μ L de marcador de peso molecular. Para o gel de SDS-PAGE Tris-Tricina foi utilizado o marcador *SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen)*, que apresenta os padrões: miosina (198 kDa), fosforilase (98 kDa), BSA (62 kDa), desidrogenase glutâmica (49 kDa), álcool desidrogenase (38 kDa), anidrase carbônica (28 kDa), mioglobina vermelha (17 kDa), lisozima (14 kDa), aprotinina (6 kDa) e insulina - cadeia B (3 kDa). Ao término da corrida, o gel foi corado por no mínimo 30 minutos sob agitação constante em recipiente contendo solução de azul de *Coomassie* brilhante R-250 0,1% (m/v), 50% de metanol (v/v), 10% de ácido acético (v/v) e H₂O Milli-Q q.s.p. e descorado com diversas lavagens com 20% de ácido acético (v/v) e H₂O Milli-Q q.s.p. sob agitação, para revelar as bandas de proteína.

4.5.3. Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata

Em comparação com a sensibilidade obtida pela utilização do azul de *Coomassie* para corar géis de poliacrilamida, na escala de microgramas, a utilização de protocolos que utilizam nitrato de prata (AgNO₃) permite revelar proteínas em quantidades na escala de nanogramas. Assim sendo, o protocolo de coloração com AgNO₃ foi realizado após a visualização das bandas coradas com azul de *Coomassie* em gel de poliacrilamida e posterior descoloração do mesmo. Para descorar o *Coomassie* das bandas foi utilizada solução contendo ácido acético 10%, metanol 40% e água Milli-Q q.s.p. – que foi trocada várias vezes até obter o gel transparente, sem nenhuma impregnação visível do azul de *Coomassie*. A coloração com prata seguiu-se conforme abaixo e para cada etapa foram preparadas soluções de 60 mL para cada gel, seguindo o protocolo de Nesterenko, Tilley e Upton (1993).

Etapas da coloração:

- 1 – Fixação: solução contendo 60 mL de acetona 50%, 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% e 25 μ L de formaldeído 37% (em agitação durante 5 minutos).
- 2 – Enxague: água destilada (3 lavagens de 5 segundos).
- 3 – Lavagem: água destilada (em agitação durante 5 minutos).

- 4 – Enxague: água destilada (3 lavagens de 5 segundos).
- 5 – Pré-tratamento I: acetona 50% (em agitação durante 5 minutos).
- 6 – Pré-tratamento II: tiosulfato de sódio 0,017% (em agitação durante 1 minuto).
- 7 – Enxague: água destilada (3 lavagens de 5 segundos).
- 8 – Impregnação: nitrato de prata 0,27% e formaldeído 0,37% (em agitação durante 8 minutos).
- 9 – Enxague: água destilada (3 lavagens de 5 segundos).
- 10 – Revelação: solução contendo 0,67 g de carbonato de sódio anidro, 25 μ L de formaldeído 37% e 25 μ L tiosulfato de sódio 10% em 60 mL de água destilada (em agitação de 10 a 20 segundos).
- 11 – Interrupção: ácido acético 1% (em agitação durante 30 segundos).
- 12 – Enxague: água destilada.

4.5.4. Quantificação da pureza das bandas dos géis

Após a eletroforese e a revelação das bandas com os corantes, os géis de poliacrilamida foram fotodocumentados utilizando o sistema *Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad)* usando a bandeja branca do sistema. Os géis fotodocumentados foram avaliados no software *ImageLab* versão 6.0.1 (*Bio-Rad*) para análise do grau de pureza das amostras provenientes da SEC. O programa permite a detecção automática das faixas onde as amostras correram e também das bandas obtidas. O grau de pureza, em porcentagem, foi obtido utilizando a ferramenta *Relative Quantity*, tendo como referência a banda de SEPT7c.

4.6. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As proteínas foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular em comprimentos de onda distantes da região do ultravioleta (FAR-UV) – entre 260 e 195 nm. A técnica utiliza a radiação de luz elipticamente polarizada, resultante de dois feixes de luz circularmente polarizados de mesma frequência, mas com direções e fases diferentes, para analisar as biomoléculas. Os feixes de luz incidem sobre a amostra e a porção absorvida pelas moléculas de proteínas promove excitações eletrônicas, como acontecem nas ligações peptídicas, em que ocorrem as transições eletrônicas dos tipos $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Os espectros de emissão são obtidos em elipticidade (ângulo θ) e esta é utilizada para determinar a

conformação da cadeia polipeptídica em sua estrutura secundária (ADLER; GREENFIELD; FASMAN, 1973; JANES; WALLACE, 2009).

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em espectropolarímetro modelo Jasco J-815 (Jasco) equipado com sistema de controle de temperatura do tipo Peltier PTC-4235/15 (Jasco) e monitoradas pelo software Spectra Manager II. As amostras foram dispostas em cubetas de quartzo de 0,5 a 1 mm para a realização das leituras dos espectros. As amostras foram dialisadas previamente, em concentrador de centrífuga, para salina de NaCl 150 mM a fim de manter o equilíbrio iônico das proteínas em solução e de facilitar o ajuste dos pH desejados com agentes tamponantes que menos interferissem no sinal dicroico. Os ensaios foram realizados em condições básica, neutra e ácida, ajustando o pH das amostras imediatamente antes das leituras de CD com os tampões: acetato de sódio 5 mM (pH 4,0) e Tris-HCl 5 mM (pH 7,0 e 9,0) – mantendo a molaridade de sal. As concentrações de proteínas utilizadas foram adaptadas para cada construção e experimento realizado.

As leituras dos espectros iniciais foram realizadas a temperatura de 25 °C, nos comprimentos de onda (λ) de 260 a 195 nm (com intervalos de 0,2 nm). Foram acumulados 3 espectros para os tampões e 10 espectros para as amostras e obtidas as médias destes, com velocidade de escaneamento de 20 nm/min e tempo de resposta de 0,5 s. As médias dos espectros de cada amostra foram obtidas em elipticidade e destas foram subtraídas as linhas de base dos respectivos tampões, retirando a contribuição dos reagentes no sinal dicroico. A elipticidade obtida foi convertida para elipticidade residual média (do inglês, *mean residue ellipticity* – MRE) utilizando a equação (2), sendo θ a elipticidade (em miligraus), o peso residual médio - MRW (do inglês, *mean residue weight* – MRW), c a concentração (em mg/mL) e l o comprimento do caminho óptico da cubeta (em cm).

$$[\theta]_{\text{MRE}} = \frac{\theta \times 0,1 \times \text{MRW}}{c \times l} \quad (\text{em graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}) \quad (2)$$

O peso residual médio (MRW) foi obtido dividindo o peso molecular, em Daltons, pelo número de ligações peptídicas de cada proteína, conforme a equação (3). Foram utilizados os seguintes pesos residuais médios: SEPT7c – 126,9 Da, SEPT11c – 128,42 Da, SEPT14c – 128 Da.

$$\text{MRW} = \text{PM} / (n - 1) \quad (3)$$

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados para verificar o efeito da temperatura sobre a conformação das proteínas aquecendo-as e monitorando o sinal dicróico. As amostras foram analisadas de 5 a 75 °C, com variação de 0,2 °C, no comprimento fixo de onda de 222 nm, nos pH 4, 7 e 9 com os tampões citados anteriormente. Foram coletados espectros das amostras antes e após a variação térmica na temperatura de 25 °C. Para evitar a evaporação da amostra e consequente alteração na concentração, em todos os ensaios de desnaturação foram adicionados $\approx 100 \mu\text{L}$ de óleo mineral sobre o menisco da amostra nas cubetas de quartzo. Durante a variação térmica, foram coletados espectros a cada 10 °C (5, 15, 25, 35, 45, 55, 66, 75). Dos espectros das amostras e dos pontos coletados durante os ensaios de variação térmica foram subtraídas as linhas de base dos tampões e, em seguida, o ruído foi suavizado com o método de Savitzky-Golay utilizando o software Spectra Manager II.

4.7. Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a Espalhamento de Luz Multiangular (SEC-MALS)

Alguns fatores podem limitar a utilização de curvas de calibração em colunas de gel filtração para obter o peso molecular de proteínas em solução, a partir do volume de eluição. A calibração feita com padrões de proteínas globulares nos leva a assumir que a amostra também apresenta o mesmo perfil – diferentemente das proteínas trabalhadas neste projeto que apresentam perfil alongado, como observado na **Figura 7**. Além disso, cada proteína pode interagir de forma particular com a resina da coluna e assim interferir no volume de eluição das amostras. Estes processos são limitantes e, conseqüentemente, tornam a técnica imprecisa para a determinação experimental do peso molecular das amostras e a identificação dos estados oligoméricos. Desta forma, os ensaios de cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multiangular (SEC-MALS) surgem como uma alternativa, uma vez que a determinação do peso molecular não é dada pelo volume de eluição do analito e nem pela sua forma (FOLTA-STOGNIEW, 2016).

As análises foram feitas no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IFSC/USP), São Carlos - SP – sob a supervisão do professor Dr. Richard Garratt. Para a cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados os módulos Waters 600 Controller, Waters 600 Pump e Waters 2489 UV/Visible Detector (*Waters*) com uma coluna Superdex S200™ Increase 10/300 GL (*GE Healthcare*) conectada. Acoplados a estes estavam o detector de espalhamento miniDAWN TREOS (*Wyatt Technology*) – que mede o espalhamento da luz (LS, do inglês *light scattering*),

emitida pelo aparelho no comprimento de onda de 659 nm, em três ângulos simultaneamente (43,6°, 90° e 136,4°) – e o detector de índice de refração Optilab T-rEX (*Wyatt Technology*) – que quantifica a concentração das amostras pela refração diferencial (dRI, do inglês *differential refractive index*).

Para a exclusão molecular, foram injetadas 120 µL das amostras na concentração de 8 mg/mL. O tampão de corrida utilizado foi composto por Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e cloreto de sódio 300 mM. Para validar os ensaios de SEC-MALS, é realizada uma calibração prévia com proteínas de peso molecular bem definido na literatura. A calibração foi realizada com a injeção de 50 µL de albumina do soro bovino (BSA) a 2 mg/mL (66,5 kDa – em sua forma monomérica). Os resultados foram processados e normalizados com base na injeção de BSA utilizando o programa ASTRA 7.0.1 (*Wyatt Technology*).

4.8. Crosslinking químico

Foram realizados ensaios de *crosslinking* químico com as proteínas purificadas utilizando o reagente Bis (succinimidil-succinato) de Etileno Glicol (EGS) (*Sigma Aldrich*). O EGS promove ligações cruzadas entre as proteínas formando ligações covalentes de amida em pH 7-9. O reagente apresenta um braço espaçador de 16,1 Å e é homobifuncional, em que as duas extremidades reagem com os grupos aminas de N-terminais e de lisinas (ABDELLA; SMITH; ROYER, 1979). É importante que o EGS seja previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), pois a água promove a hidrólise do reagente, diminuindo sua eficiência na formação das ligações cruzadas.

Os ensaios foram realizados preparando reações com 60 µL com cada proteína a 50 µM adicionada de EGS a 2,5 mM, em concentrações finais (mantendo 50 vezes mais moléculas de reagente do que proteína). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente, durante 30 minutos, e no gelo, durante 2 horas. As reações de *crosslinking* químico foram interrompidas imergindo os tubos contendo as amostras em nitrogênio líquido durante 5 minutos, seguido da adição do tampão de amostra que contém aminas no agente tamponante (Tris-HCl pH 6,8). Em seguida as amostras foram aquecidas durante 10 minutos a 95 °C com posterior análise por eletroforese em gel SDS-PAGE Tricina.

Também foram realizados ensaios preliminares utilizando os *crosslinker* Disuccinimidil Suberato (DSS) (*Thermo Scientific*), que apresenta braço espaçador não clivável de 11,4 Å. O reagente além de ser homobifuncional, também reage com os grupos aminas de N-terminais e de lisinas, no entanto a eficiência de formar as ligações cruzadas

entre o C-terminais das septinas foi inferior. Os ensaios seguiram apenas com o *crosslinker* EGS.

4.9. Ultracentrifugação analítica – Velocidade de Sedimentação (SV-AUC)

A técnica de ultracentrifugação analítica baseia-se na aplicação de uma força centrífuga resultante do movimento circular, em velocidade angular constante, para a separação de amostras de acordo com seu coeficiente de sedimentação. O lançamento das partículas para o fundo do recipiente é efeito da força inercial centrífuga, pela tendência dos corpos se manterem em movimento numa trajetória tangencial ao movimento circular. A velocidade do movimento de partículas monodispersas no soluto é dada pelo coeficiente de difusão, que se relaciona diretamente com o tamanho e a forma das partículas, assim como a viscosidade e a temperatura do solvente. Ao se aplicar altas rotações, as forças que atuam no centro de gravidade das partículas são multiplicadas e o coeficiente de sedimentação que obtém está diretamente relacionado com a massa molecular da partícula. Estimar o volume parcial específico e a razão friccional dessa partícula permite conhecer o coeficiente de difusão e que resulta na distribuição do coeficiente de sedimentação. Desta forma, proteínas em solução em condições nativas podem ser estudadas por ultracentrifugação analítica a fim de determinar os estados de oligomerização e os parâmetros hidrodinâmicos (SHUCK, 2000; LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002).

A ultracentrífuga analítica é equipada com um sistema ótico do tipo monocromador, que monitora as partículas em tempo real, com a leitura da absorbância em comprimentos de onda do UV visível. O equipamento também dispõe de uma câmara de vácuo, para diminuir o atrito do rotor com os gases, o que ocasionaria aumento de temperatura em rotações elevadas, e também apresenta um sistema de refrigeração. Os ensaios realizados foram de velocidade de sedimentação, em que a sedimentação controlada das moléculas numa distância radial é monitorada até a total deposição destas ao fundo da célula.

Os experimentos foram realizados numa ultracentrífuga ProteomeLab XL-A (*Beckman Coulter*) que é equipada com um rotor de titânio, modelo *An-60 Ti* (*Beckman Coulter*), com 4 células de alumínio com janelas de quartzo com duas cavidades divididas por uma peça central. As células foram preparadas dispondo o tampão no compartimento esquerdo e a amostra no compartimento direito utilizando 3 concentrações sendo observada a densidades óticas aproximadas de: $OD_{280nm} \approx 0,50; 0,75; 1,00$. A quarta célula do sistema é utilizada como contrapeso para equilibrar o rotor. As amostras foram centrifugadas com o sistema

refrigerado a 20 °C com varredura de absorvância a 280 nm. A velocidade de rotação utilizada em cada ensaio foi determinada com base no peso molecular teórico das amostras (HOLLADAY, 1980), sendo: SEPT7c (45.000 rpm), SEPT7c+SEPT6c (44.000 rpm), SEPT11c (50.000 rpm) e SEPT14c (42.000 rpm). Foram realizados ensaios em condições neutras, com as proteínas SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c dispostas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 e NaCl 150 mM; já SEPT6c foi disposta em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0, NaCl 400 mM e glicerol 5%. Para os ensaios em condições ácidas as proteínas foram dispostas em tampão Acetato de sódio 20 mM pH 4 e NaCl 150 mM.

Para o tratamento dos dados, foram estimados o volume parcial específico (V_{bar}) e a hidratação da proteína, utilizando a sequência de aminoácidos, a densidade (ρ) e a viscosidade (η) do tampão com o uso do programa SEDNTERP (HAYES; LAUE; PHILO, 1995). Utilizando o programa SEDFIT (SCHUCK, 2000) os dados experimentais foram ajustados à equação de Lamm para determinar o coeficiente de sedimentação $c(s)$ pelo modelo de distribuição contínua. Ajustes também foram realizados alterando a disposição do menisco do conjunto de dados dentro do programa SEDFIT até a de um valor ideal de RMSD de aproximadamente 0,007. A razão friccional f/f_0 foi um parâmetro flutuante durante as análises, ficando livre o ajuste automático deste pelo programa. Para determinar os estados oligoméricos, os coeficientes de sedimentação obtidos foram normalizados para $S_{20,w}$ no programa SEDNTERP, convertendo os dados para condições padrões de sedimentação em água a 20 °C. Os gráficos exibem o perfil de sedimentação e a distribuição dos coeficientes de sedimentação foram plotados pelo programa GUSSEI, que produz os gráficos diretamente do programa SEDFIT.

4.10. Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização com as construções de septinas foram realizados com as proteínas puras e concentradas, em experimentos automatizados (*screenings*) e manuais (refinamentos). Condições para a cristalização das proteínas SEPT7c, SEPT6c, SEPT11c e SEPT14c foram exploradas tanto individualmente, quanto de forma combinada: SEPT7c+SEPT6c, SEPT7c+SEPT11c e SEPT7c+SEPT14c, utilizando concentrações equimolares. Os ensaios de *screening* de cristalização foram realizados no equipamento de pipetagem a nanolitros robotizado *Mosquito*® (*TTP Labtech*). Visando a identificação de condições de cristalização promissoras a triagem foi realizada utilizando microplacas com 96 poços (12x8), onde foram pipetados em cada poço 100 μL das soluções de cristalização de

kits comercialmente adquiridos (**Tabela 1**), que apresentam diferentes composições (variando agente precipitante, sal, tampão). Para promover a difusão de vapor e propiciar a cristalização das proteínas, o método de gota pendurada foi empregado, no qual a pipetagem robotizada produziu 3 nanogotas para cada um dos poços sobre filmes plásticos de cristalização específicos para a vedação das microplacas. As nanogotas produzidas apresentaram concentrações diferentes, onde o equipamento foi programado para misturar 100-200 nL de proteína com 100-200 nL da solução do reservatório. Após a selagem, as microplacas foram acondicionadas em sala climatizada, com temperatura constante de 20 °C. Para explorar mais ainda as condições de cristalização, algumas microplacas confeccionadas foram acondicionadas em refrigerador apropriado, com temperatura constante de 4 °C. Com base em abordagens anteriores do nosso grupo de pesquisa, as microplacas permaneceram inertes por 1 ou 2 semanas antes de serem analisadas em lupa para verificação do crescimento dos cristais.

Após a verificação de algumas condições promissoras de cristalização, ensaios manuais de refinamento foram realizados na tentativa de refinar as condições para obter melhores cristais, em forma e tamanho. Com base na amostragem por matriz esparsa, foram feitas pequenas variações ao redor das condições alterando sutilmente o valor pH do tampão, a molaridade do agente precipitante e a proporção da concentração de proteína a ser misturada com a solução do reservatório. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços (6x4) que continham um cálice ao centro, onde as gotas foram alocadas, executando a difusão de vapores pelo método de gota sentada.

Em colaboração com o Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IFSC/USP), São Carlos – SP, também foram realizados experimentos de *screening* de cristalização com as septinas SEPT7c, SEPT11c e SEPT7c+SEPT11c. Os ensaios foram realizados utilizando o equipamento de pipetagem robotizado *Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments)*, em microplacas de 96 poços que foram posteriormente acondicionadas em sala climatizada a 18 °C e também em refrigerador, a 4 °C. Em cada um dos 96 reservatórios foram adicionados 50 µL da solução de cristalização, foram misturados automaticamente 100-200 nL da solução com 100-200 nL de proteínas para a formação das nanogotas, que foram preparadas conforme a **Tabela 2**.

Os cristais obtidos que apresentavam tamanho suficiente foram submetidos a ensaios de difração de raios-X para verificar se estes reproduziriam padrões discretos de difração de proteína ou de sal. Alguns experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo; outros foram realizados *in house* em difratômetro *D8 Venture (Bruker)*.

Tabela 1 – Concentrações das proteínas (em mg/mL) utilizadas nos ensaios de *screening*. Os experimentos foram realizados com o método de gota pendura, com 3 nanogotas produzidas em concentrações diferentes para cada um dos 96 poços das microplacas.

Kit	SEPT7c	SEPT6c	SEPT14c	SEPT11c	SEPT7c+ SEPT6c	SEPT7c+ SEPT11c	SEPT7c+ SEPT14c
<i>PACT++ (Jena Bioscience)</i>	51,1	19,5	–	58,2	34,5	–	–
<i>JCSG++ (Jena Bioscience)</i>	51,1	–	16,57	58,2	34,5	–	–
<i>JBScreen Membrane (Jena Bioscience)</i>	51,1	–	16,57	58,2	34,5	–	–
<i>Crystal Screen (Hampton Research)</i>	51,1	19,5 / 130,0	28,1	66,0	34,5	–	–
<i>Morpheus (Molecular Dimensions)</i>	63,0	–	28,1	66,0	34,5	52,7	49,9
<i>JCSG-plus (Molecular Dimensions)</i>	63,0	–	16,57 / 71,0	–	34,5	52,7	49,9
<i>PACT Premier (Molecular Dimensions)</i>	63,0	–	28,1 / 71,0	66,0	34,5	52,7	49,9

Tabela 2 – Concentrações das proteínas (em mg/mL) utilizadas nos ensaios de *screening* realizados no IFSC/USP. Os experimentos foram realizados com o método de gota sentada, com 3 nanogotas diferentes (uma de cada proteína) misturadas com a solução de cada um dos 96 poços.

Kit	SEPT7c	SEPT11c	SEPT7c+ SEPT11c
<i>Index (Hampton Research)</i>	16,6 / 25,8	20,5	15,5 / 18,3
<i>SaltRx (Hampton Research)</i>	16,6	–	18,3
<i>SG1 (Molecular Dimensions)</i>	16,6 / 25,8	20,5	15,5 / 18,3
<i>JCSG (Molecular Dimensions)</i>	25,8	20,5	15,5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese dos genes

O estudo das regiões C-terminais de septinas humanas demanda novos dados experimentais, para ir além das inferências a partir de predições. As estratégias deste projeto para caracterizar as interações homo e heterotópicas entre SEPT7c, SEPT6c, SEPT11c e SEPT14c resultaram na seleção de fragmentos com potencial para a formação de *coiled coils*, como predito por Kinoshita (2003). O projeto teve início com os genes de SEPT6c e de SEPT7c, no entanto as dificuldades de trabalho com o gene SEPT6c levaram a seleção e síntese dos genes de SEPT11c e de SEPT14c, que pertencem ao subgrupo da septina 6. A seleção das sequências priorizou regiões preditas como *coiled coil*, e manteve a *tag* de histidina, resultando nas construções elencadas abaixo, cujas sequências primárias de aminoácidos apresentaram as seguintes características físico-químicas elucidadas na **Tabela 3**.

SEPT7c – MEQVFEMKVKEKVQKLKDSEAELQRRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFE
DEKANWEAQQRILEQQNSLEHHHHHH

SEPT6c – MRQMFVQRVKEKEAELKEAEKELHEKFDRLKKLHQDEKCKKLEDKCKKSLD
DEVNAFKQRKTAELLQSWLEHHHHHH

SEPT11c – MRVKEKEAELKEAEKELHEKFDLLKRTHQEEKCKKVEDKCKKELEEEVNNF
QKWLEHHHHHH

SEPT14c – MHHHHHHWVKEKEATFKEAEKELQDKFEHLKMIQQEEIRKLEEEKCKQLE
GEI

Tabela 3 – Características físico-químicas das construções utilizadas nesse estudo. Dados obtidos a partir da sequência primária das septinas pela ferramenta on-line *ProtParam (ExPASy)*.

Proteínas	Número de resíduos	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI) teórico	Coefficiente de extinção (280nm)	Abs 0,1% (280 nm)
SEPT6c	76	9,37	8,86	5.500	0,586
SEPT7c	75	9,39	6,44	5.500	0,586
SEPT11c	60	7,58	6,44	5.500	0,726
SEPT14c	52	6,53	5,94	5.500	0,842

5.2. Produção heteróloga

Os ensaios de expressão das construções de septinas incluíram cepas de *E. coli* Lemo21(DE3), BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysE que apresentam notável potencial para expressão de proteínas recombinantes em nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Biofísica Molecular (UnB). As cepas do tipo DE3 hospedam o profago λ DE3 que transporta o gene da RNA polimerase T7 e permite a expressão com indução por IPTG (análogo da alolactose) ou por autoindução (STUDIER; MOFFATT, 1986). A diferença entre as 3 cepas está no controle do nível de expressão, em que Lemo21 pode ser controlada com L-Ramnose atenuando a formação de corpos de inclusão, enquanto as cepas do tipo pLys reduzem os níveis de expressão basais, podendo ser utilizadas para expressar proteínas tóxicas. É interessante notar que células de Lemo21 crescidas sem L-ramnose atuam como pLysS.

Inicialmente, os ensaios de expressão e de solubilidade para as construções SEPT6c e SEPT7c apresentaram êxito utilizando meio autoindutor ZYM-5052. Esse tipo de meio foi escolhido por apresentar um conjunto de características favorece a expressão de vetores pET em meios com alta densidade celular, sendo propício para as construções dos C-terminais de septinas deste projeto. A autoindução é obtida com três principais fontes de carbono, a lactose, o glicerol e a glicose – ao tempo em que a glicose é consumida primeiramente, o glicerol garante um suprimento auxiliar as necessidades metabólicas caso a glicose seja totalmente depletada, permitindo o crescimento do número de células até a saturação. Esgotando-se os dois, a lactose é consumida em seguida com a ativação do *operon Lac* e consequente expressão do gene heterólogo. Além disto, a composição do meio dispõe vários sais e metais-traço que provém um conjunto de íons importantes para favorecer o metabolismo de *E. coli* (STUDIER, 2014).

O meio autoindutor inoculado com as cepas transformadas com SEPT6c e SEPT7c apresentou concentração proteica expressiva quando submetido a crescimento inicial a 37 °C durante 2h, seguido do acondicionamento a 18 °C com coletas de amostras em diferentes tempos (**Figura 10**). Pouco ficou evidente a diferença na concentração de proteínas nos diferentes tempos. A presença das proteínas foi observada tanto no extrato bruto quanto no sobrenadante, evidenciando a presença de proteínas solúveis após os processos de lise e centrifugação. A obtenção destes dados foi importante para delinear o escalonamento da expressão de 25 mL para 500 mL de meio, pois a facilidade operacional do meio ZYM-5052 distingue-se do processo com indução por IPTG que demanda atenção constante com a densidade celular OD_{600 nm} de 0,5 a 0,7 – o que mantém o pesquisador na dependência da taxa de crescimento da *E. coli*.

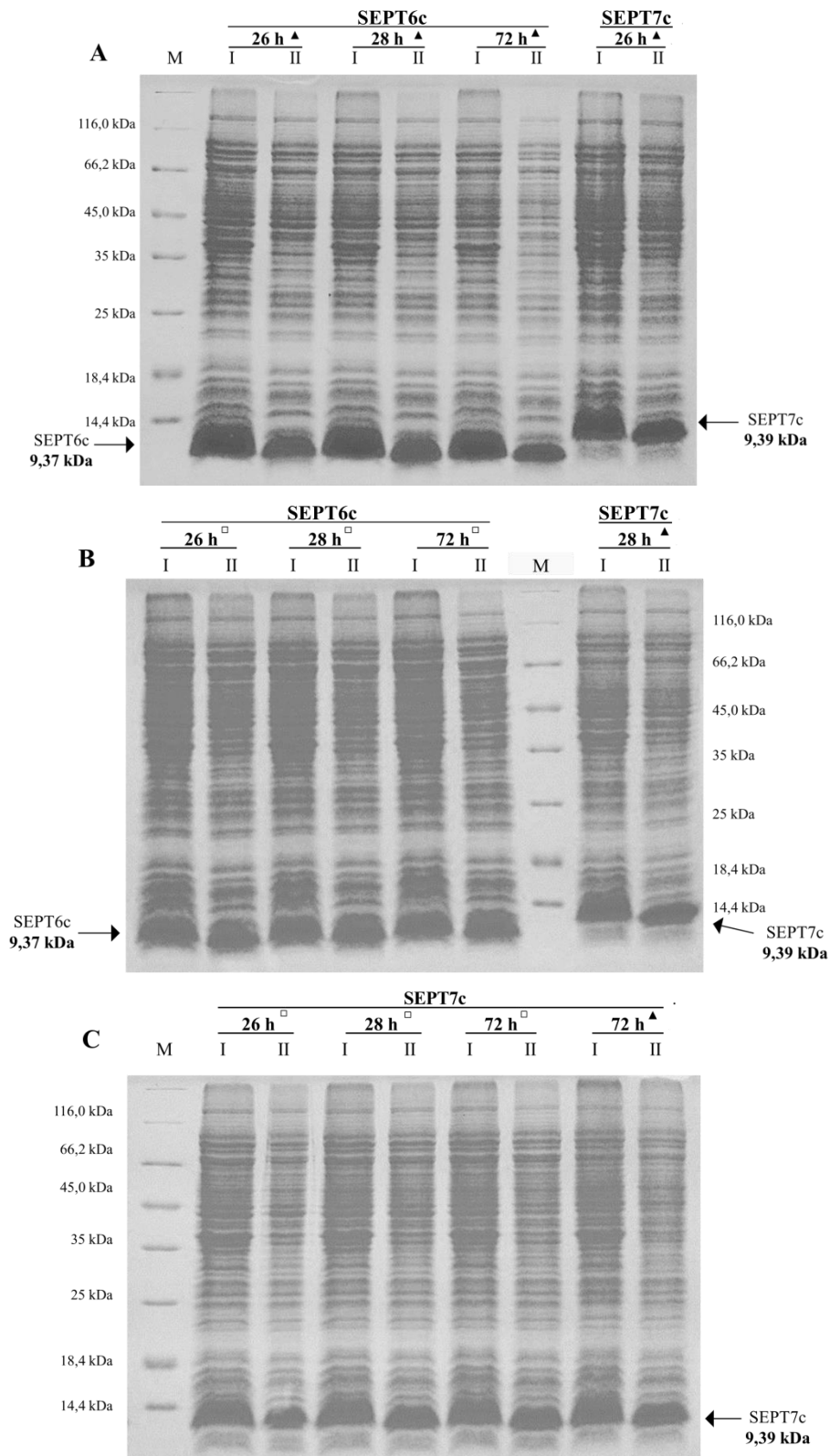


Figura 10. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT6c e SEPT7c em meio autoindutor a 18 °C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. Amostras I representam as frações lisadas, as amostras II representam o sobrenadante da lise. M: marcador de massa molecular.

▲ Amostras de expressões com a cepas Lemo21(DE3). □ Amostras de expressões com a cepa BL21(DE3)pLysE. Amostras da cepa Lemo21(DE3) foram adicionadas de L-ramnose 500 μ M.

Ao verificar a expressão das proteínas em meio autoindutor a 37 °C com redução do tempo de expressão, a cepa Lemo21 teve desempenho tão bom quanto nos ensaios por longos períodos de tempo a baixa temperatura. O inóculo preparado sem adição de L-ramnose e incubado por períodos de até 10h curiosamente revelou um perfil de expressão com notável redução no conteúdo total de proteínas de *E. coli* (**Figura 11**). Contudo, a colônia não teve sua replicação feita e armazenada em crioprotetor para a repetição do ensaio. Mesmo assim, ensaios posteriores continuaram ter bons desempenhos na expressão das construções em questão, como é mostrado nos ensaios de purificação na próxima sessão.

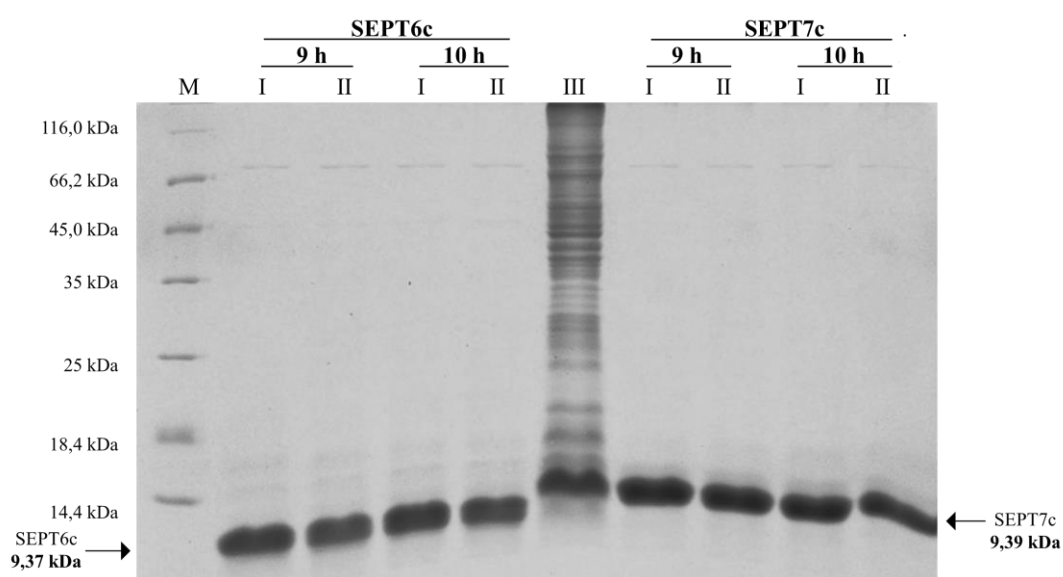


Figura 11. Ensaio de expressão e solubilidade de SEPT6c e SEPT7c em meio autoindutor a 37 °C. Eletroforese em gel de poliácridamida 15% corado com azul de *Coomassie*. Ensaios realizados com a cepa Lemo21(DE3) sem adição de L-ramnose. Amostras I representam as frações lisadas, as amostras II representam o sobrenadante da lise. M: marcador de massa molecular.

Com base nos resultados anteriores, os ensaios de expressão com as construções SEPT11c e SEPT14c realizados nas mesmas condições de tempo, agitação e temperatura revelaram ser promissoras apenas para a proteína SEPT11c, como visualizado na **Figura 12**. Interessante notar que nos ensaios realizados sem a adição de L-ramnose a concentração proteica apresentou relevante aumento, uma vez que os sedimentos celulares foram ressuspensos antes da lise para ter a mesma densidade ótica. Embora a cepa Lemo21(DE3) tenha sido desenvolvida para controlar com maior precisão a atividade da RNA polimerase T7 (WAGNER *et al.*, 2008), na ausência de L-ramnose o perfil de expressão assemelha-se ao perfil obtido por cepas BL21(DE3)pLysS. Os resultados obtidos da expressão em Lemo21(DE3) sem L-ramnose mostraram ser mais eficientes para três das quatro construções deste estudo.

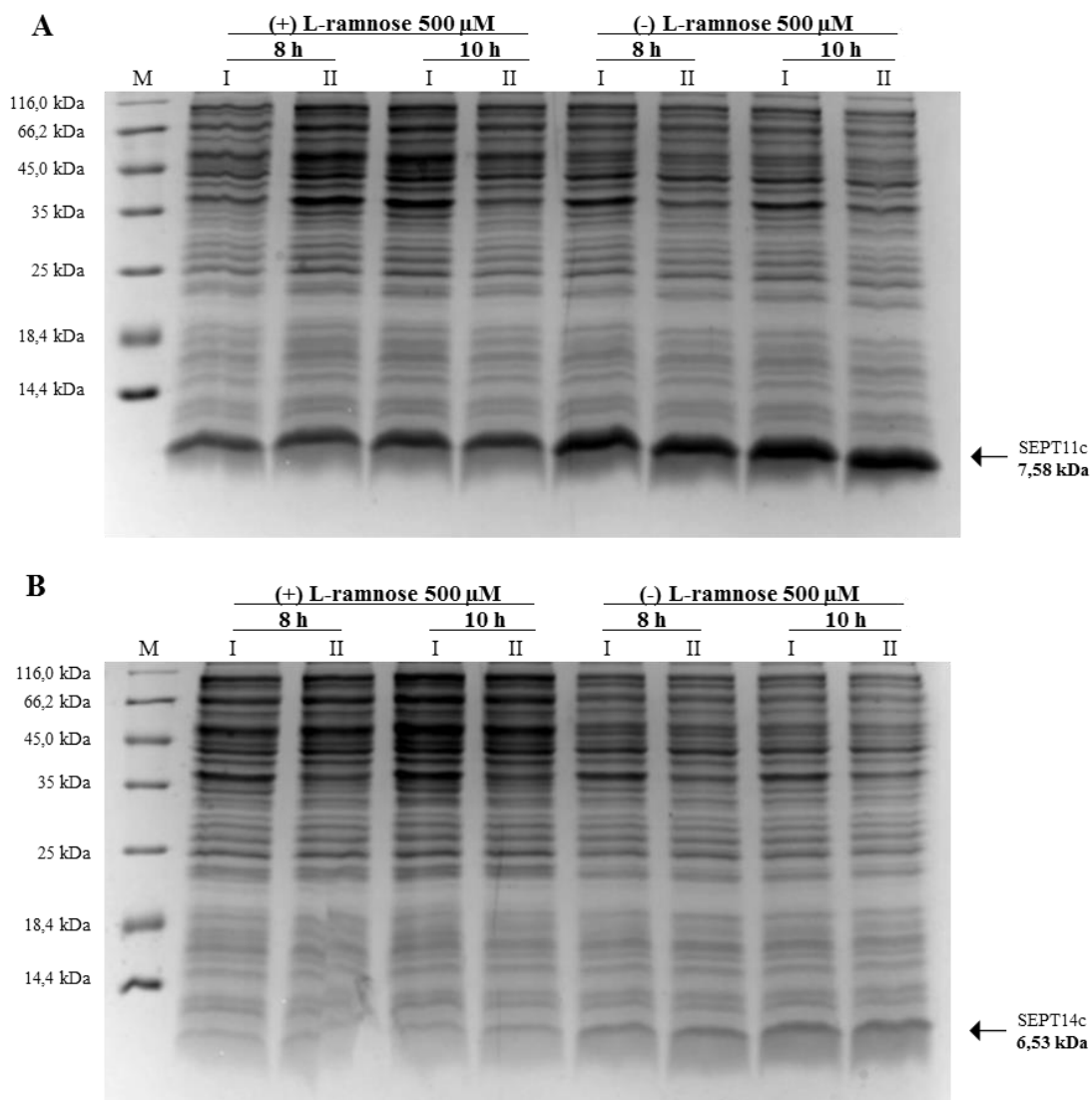


Figura 12. Ensaio de expressão e solubilidade de SEPT11c e SEPT14c em meio autoindutor a 37 °C. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. Amostras I representam as frações lisadas, as amostras II representam o sobrenadante da lise. M: marcador de massa molecular. **(A)** SEPT11c transformada em Lemo 21(DE3). **(B)** SEPT14c transformada em Lemo 21(DE3).

Melhor condição para expressão da construção SEPT14c foi obtida com transformantes de BL21(DE3)pLysE. Os ensaios realizados em baixa temperatura apresentaram menor rendimento, enquanto que os ensaios realizados a 37 °C tiveram mais sucesso, como visto na **Figura 13**. O que demonstrou ser a faixa de temperatura com maior rentabilidade proteica para expressão em meio autoindutor ZYM-5052 para todas as construções de septinas.

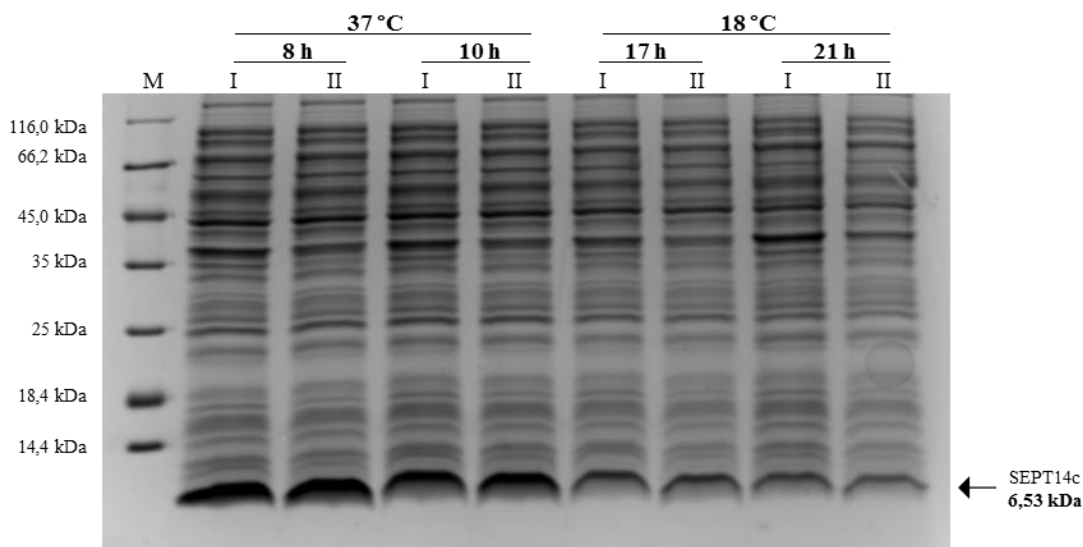


Figura 13. Ensaio de expressão e de solubilidade de SEPT14c em pLysE no meio autoindutor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. Amostras I representam as frações lisadas, as amostras II representam o sobrenadante da lise. M: marcador de massa molecular.

A cepa Rosetta(DE3) também foi testada devido à instabilidade de SEPT6c, que constantemente agregava e precipitava até mesmo em temperatura ambiente (problemas estes que serão melhor descritos no tópico 5.3. Purificação das proteínas). As cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) foram desenhadas para melhorar a expressão de proteínas de eucariotos. Esta cepa foi desenvolvida para suprir tRNAs para códons eucarióticos que são raramente utilizados pela *E. coli*. Estudos realizados por pesquisadores suecos do Projeto Atlas de proteínas humanas numa triagem de 69 proteínas, demonstraram que a expressão heteróloga de genes humanos em cepas Rosetta(DE3) apresentaram maior rendimento do que a expressão com a canônica cepa BL21(DE3). A utilização do conteúdo de tRNA raros presentes em Rosetta também mostraram melhoria no grau de pureza dos fragmentos de proteínas testados e, ao final, os protocolos de expressão foram modificados, alterando permanentemente a cepa utilizada no projeto para Rosetta (TEGEL, 2010).

Contudo, das condições testadas para as 4 construções de septinas, não foram obtidos resultados promissores de expressão na cepa Rosetta(DE3) (**Figura 14**). Quer fosse por expressão em meio LB com indução por IPTG, quer fosse em meio autoindutor, não foram detectadas a presença das proteínas de interesse por SDS-PAGE. Nem mesmo utilizando os parâmetros dos ensaios previamente citados, como temperatura e tempo de expressão.

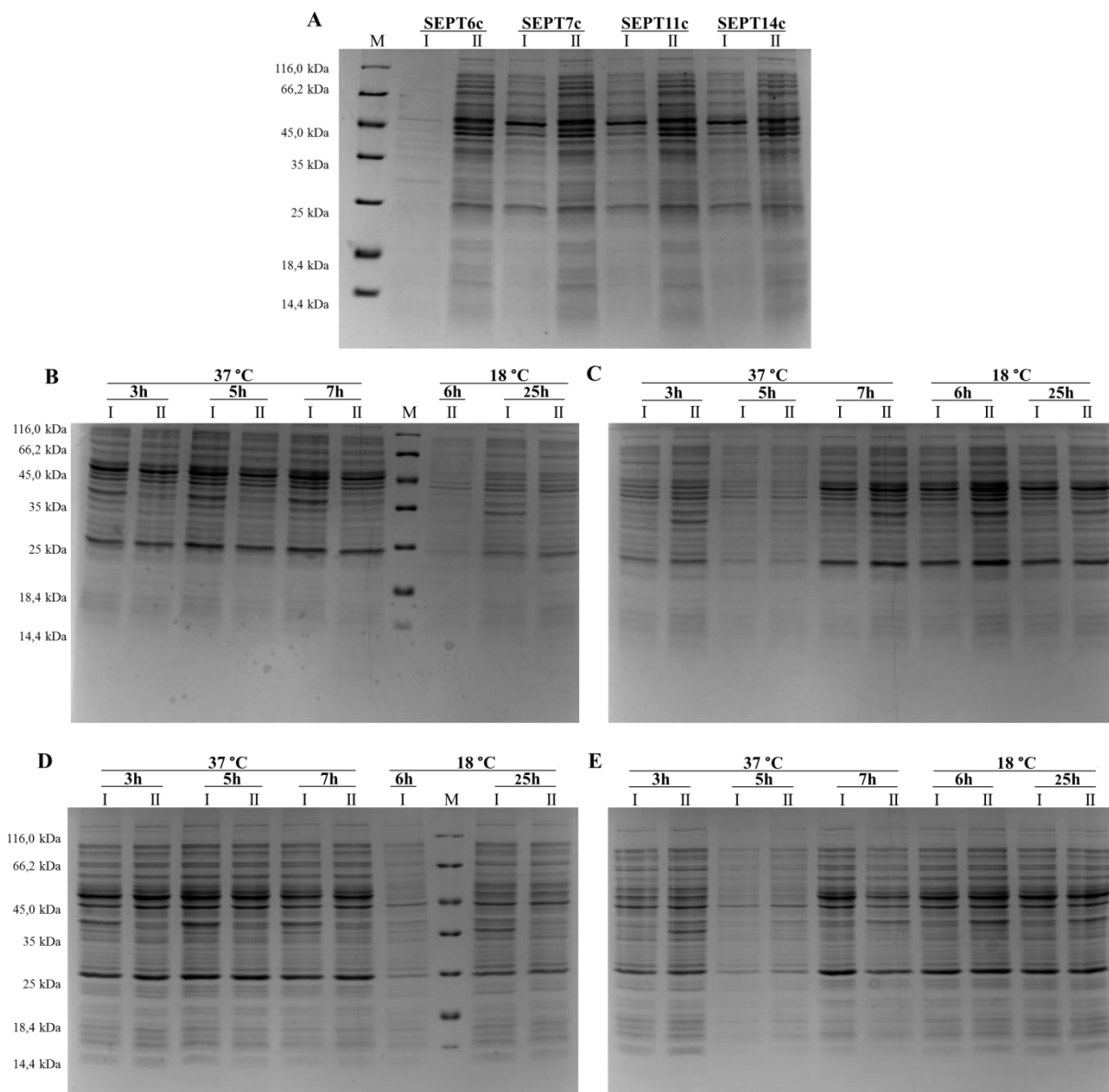


Figura 14. Ensaio de expressão e de solubilidade na cepa Rosetta(DE3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. Amostras I representam as frações lisadas, as amostras II representam o sobrenadante da lise. M: marcador de massa molecular. (A) Ensaio realizado em meio autoindutor durante 10h. As figuras B, C, D e E apresentam os ensaios realizados com SEPT6c, SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c, respectivamente. Estes foram realizados em meio LB, a expressão das células foi induzida com 0,5 mM de IPTG após alcançarem $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,7$.

Verificada a reprodutibilidade de expressão em meio autoindutor a 37 °C por 10h destes ensaios prévios (com volumes de 25 mL) nos ensaios em larga escala (com volumes de 500 mL), optou-se por dar prosseguimento com as cepas Lemo21 (para SEPT6c, SEPT7c e SEPT11c) e pLysE (para SEPT14c). A expressão em maior escala produziu grandes volumes celulares que possibilitaram a purificação das proteínas.

5.3. Purificação das proteínas

5.3.1. Purificação por cromatografia de afinidade

As proteínas foram inicialmente purificadas em cromatografias de afinidade sendo capturadas devido à presença da cauda de histidina em todas as construções. Imediatamente seguiram-se as cromatografias de exclusão molecular a fim de evitar a precipitação das proteínas, como no caso de SEPT6c que precipitava imediatamente ao ser armazenada em gelo ou após poucos minutos em temperatura ambiente. Inicialmente foi pensado que o alto rendimento proteico seria o motivo da agregação desta proteína, o que levou a alterar o método de coleta da fração eluída em tubos contendo aproximadamente 20 mL do tampão de ligação, porém o problema não foi solucionado.

Foi necessário realizar uma triagem de tampões e assim, a molaridade de sal na composição do tampão foi variada (de 150 mM até 400 mM de NaCl) para que em maior concentração este se dissociasse e interagisse com maior número de moléculas, aumentando a solubilidade da proteína em solução. Também foi adicionado ao tampão original glicerol 5% (v/v), um conhecido osmólito que favorece a estabilização proteica além de ser um agente crioprotetor prevenindo a agregação em processos de resfriamento. O pH do tampão foi diminuído de 7,6 para 7,0, evitando a proximidade com o ponto isoelétrico da proteína (8,86).

A literatura de septinas relata que a identificação de uma condição em que as amostras permaneçam estáveis é uma etapa crucial antes da realização de qualquer ensaio biofísico (VALADARES; GARRATT, 2016), contudo os resultados obtidos das purificações com SEPT6c contrastaram com a recomendação de acondicionar as septinas em gelo ou em salas refrigeradas. Numa outra abordagem, ao trabalhar apenas com o domínio G de SEPT6, frações solúveis foram identificadas apenas com a *tag* de histidina, pois quando fusionada a GST a proteína também agregava (ZENT; WITTINGHOFER, 2014). Estas observações demonstram que cada construção de septina é peculiar e demanda bastante trabalho, e até mesmo sorte, para identificar condições de estabilidade para as proteínas e assim dar sequência aos ensaios.

Ao definir o melhor tampão de purificação (Tris-HCl pH 7,0, 400 mM de NaCl e 5% de glicerol) e o acondicionamento em temperatura ambiente, as purificações por afinidade apresentaram perfis cromatográficos estáveis (**Figura 15**) e resultados de eletroforese empolgantes (**Figura 16**). Contudo, as amostras não podiam ser acondicionadas em gelo e nem permanecerem próximas de sistemas de ar-condicionado, pois ainda precipitavam. Além

disto, as amostras de SEPT6c também geraram dificuldades na purificação por exclusão molecular com o risco de precipitar dentro das colunas (algo prejudicial a matriz e a resolução das cromatografias seguintes, caso houvesse empacotamento da matriz de dextrano com agarose) e com o resultado final das amostras coletadas que permaneciam com bastantes contaminante proteicos (**Figura 21.B**).

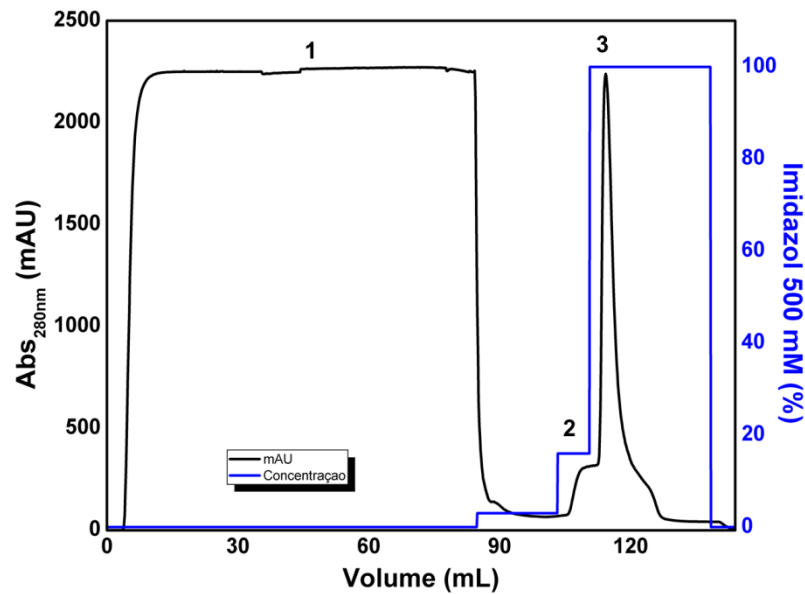


Figura 15. Perfil cromatográfico de SEPT6c em coluna de afinidade. Injeção da amostra com ligação da proteína de interesse e eluição de materiais não foram capturados – *flow through* (platô 1). Em azul está apresentada a concentração de imidazol 500 mM e os picos obtidos com lavagem de 18% (ombro 2) e eluição total com lavagem de 100% (pico 3).

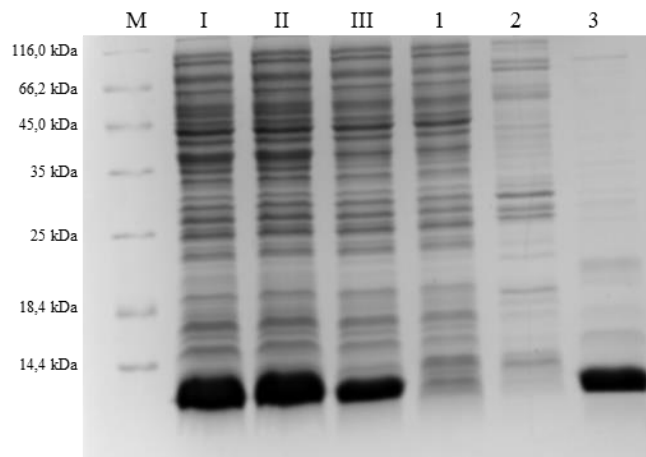


Figura 16. Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação de SEPT6c. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. M: marcador de massa molecular. Amostras: I. sedimento celular após

expressão (*pellet*), II. lisado bruto, III. sobrenadante da lise, 1. *flow through*, 2. eluição com 18% de imidazol, 3. eluição com 100% de imidazol.

As purificações das proteínas SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c não apresentaram o mesmo impasse de precipitação como SEPT6c, podendo ser purificadas e acondicionadas tanto em temperatura ambiente quanto em gelo. O rendimento proteico de SEPT7c e SEPT11c se apresentaram característicos (**Figuras 17 e 18**), que ao serem realizadas lavagens com 50 mM de imidazol para retirar contaminantes uma pequena fração das proteínas de interesse se desprendiam da coluna. Quando houve saturação da coluna foi possível notar a eluição de parte da fração proteica no *flow through* (**Figura 18**). Contudo, não ocorreram grandes perdas uma vez que foram recuperadas altas concentrações das proteínas na eluição com 500 mM de imidazol. Já as purificações de SEPT14c apresentaram rendimento mais ponderado, sem perda de material no *flow through* e nem nas lavagens com 50 mM de imidazol (**Figura 19**), ainda assim o rendimento foi suficiente para dar prosseguimento à purificação por gel-filtração e aos demais ensaios biofísicos.

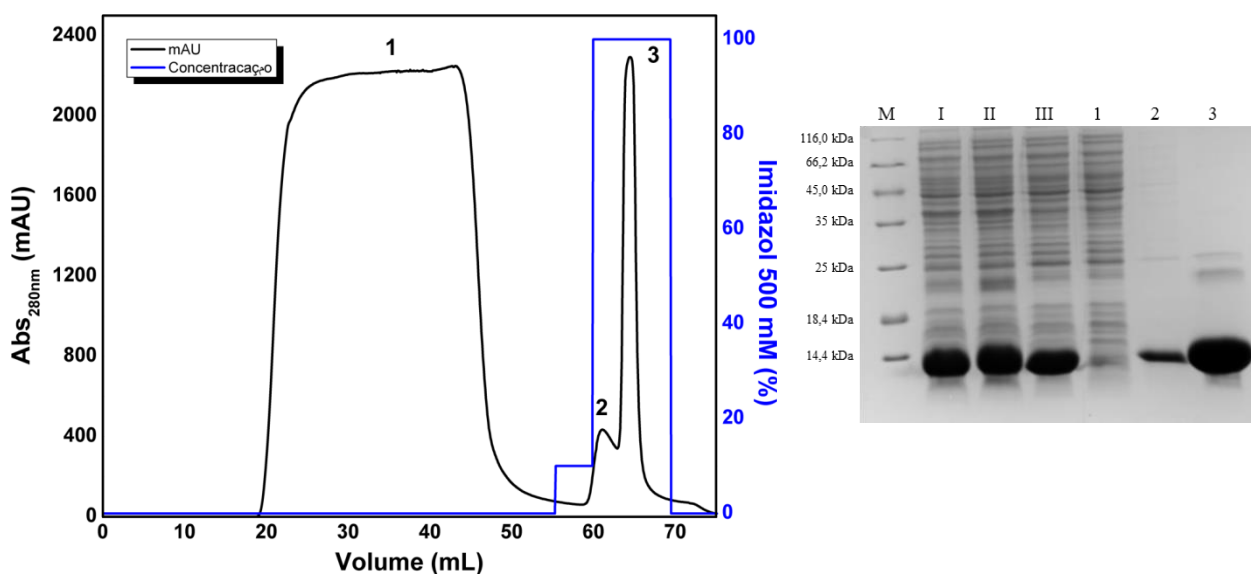


Figura 17. Purificação de SEPT7c em coluna de afinidade. (A) Perfil cromatográfico com injeção da amostra para ligação da proteína de interesse e eluição de materiais não foram capturados – *flow through* (platô 1). Em azul está apresentada a concentração de imidazol 500 mM e os picos obtidos com lavagem de 10% (pico 2) e eluição total com lavagem de 100% (pico 3). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. M: marcador de massa molecular. Amostras: I. sedimento celular após expressão (*pellet*), II. lisado bruto, III. sobrenadante da lise, 1. *flow through*, 2. eluição com 18% de imidazol, 3. eluição com 100% de imidazol.

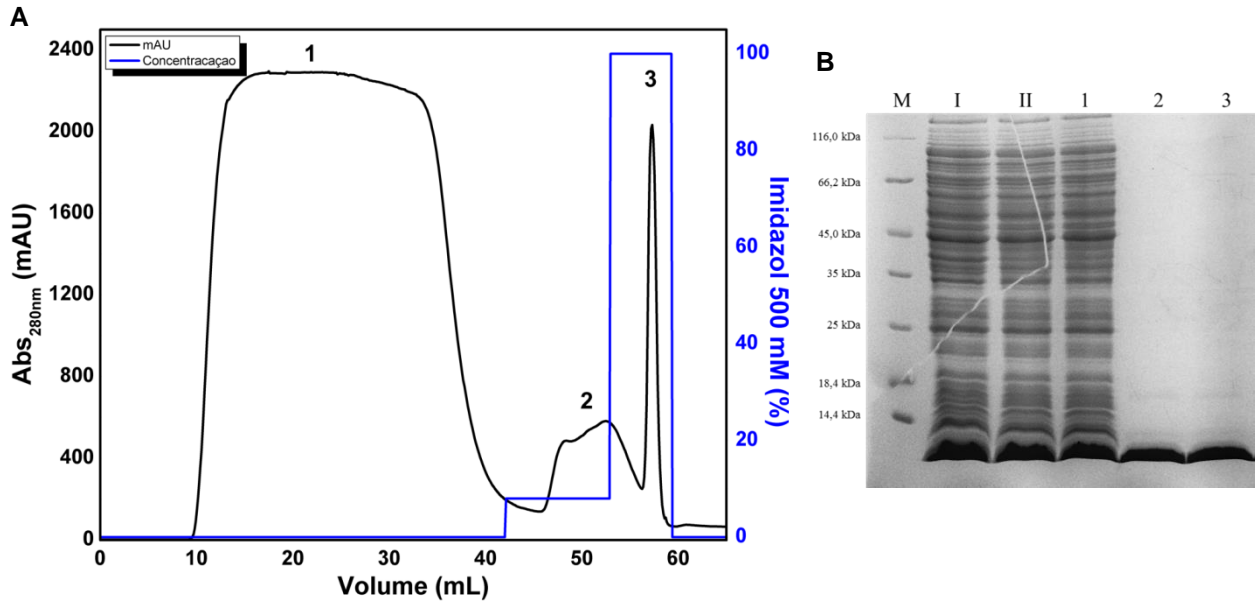


Figura 18. Purificação de SEPT11c em coluna de afinidade. (A) Perfil cromatográfico com injeção da amostra para ligação da proteína de interesse e eluição de materiais não foram capturados – *flow through* (platô 1). Em azul está apresentada a concentração de imidazol 500 mM e os picos obtidos com lavagem de 10% (pico 2) e eluição total com lavagem de 100% (pico 3). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. M: marcador de massa molecular. Amostras: I. lisado bruto, II. sobrenadante da lise, 1. *flow through*, 2. eluição com 10% de imidazol, 3. eluição com 100% de imidazol.

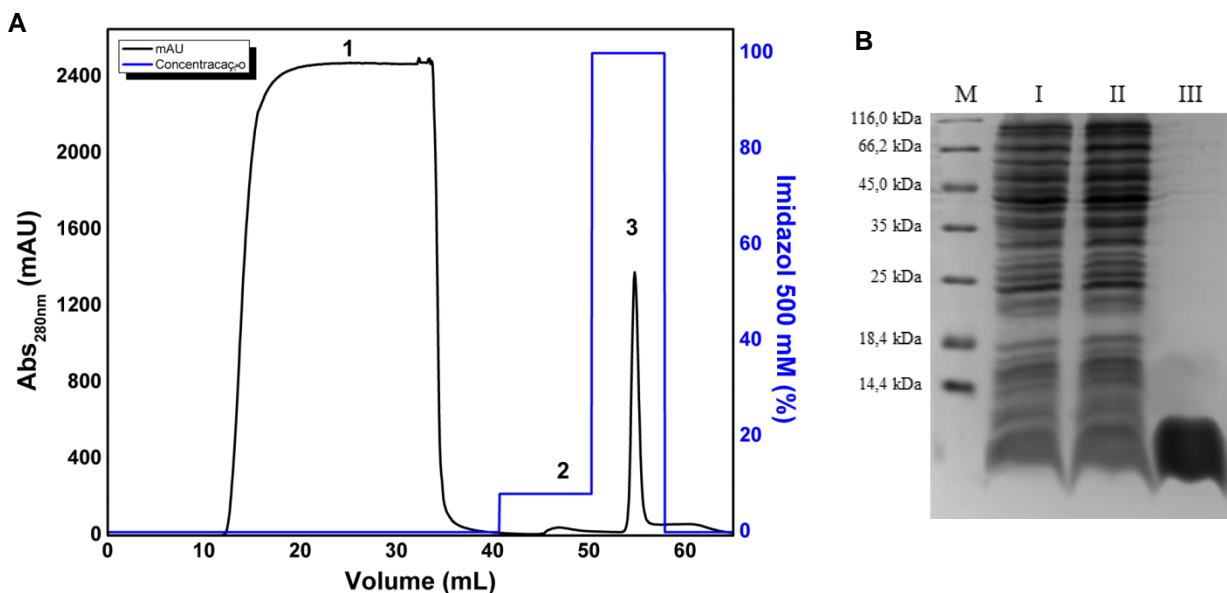


Figura 19. Purificação de SEPT14c em coluna de afinidade. (A) Perfil cromatográfico com injeção da amostra para ligação da proteína de interesse e eluição de materiais não foram capturados – *flow through* (platô 1). Em azul está apresentada a concentração de imidazol 500 mM e os picos obtidos com lavagem de 10% (pico 2) e eluição total com lavagem de 100% (pico 3). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie*. M: marcador de massa molecular. Amostras: I. lisado bruto, II. *flow through*, III. eluição com 100% de imidazol.

5.3.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular

Ao seguir para as cromatografias de exclusão molecular que, além de ter aumentado o grau de pureza das amostras, também se esperava caracterizar os estados oligoméricos das septinas. Os perfis de eluição das proteínas SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c se apresentaram similares com picos proeminentes e característicos, como indicados na **Figura 20**. Esporadicamente a presença de outros picos surgia além do *void* (dados não apresentados) na purificação destas, mas estes não representavam sequer fragmentos proteicos quando analisados em SDS-PAGE. Diferentemente das purificações de SEPT6c (**Figura 20.A**) que frequentemente apresentavam os mesmos picos peculiares de contaminantes em seus perfis cromatográficos.

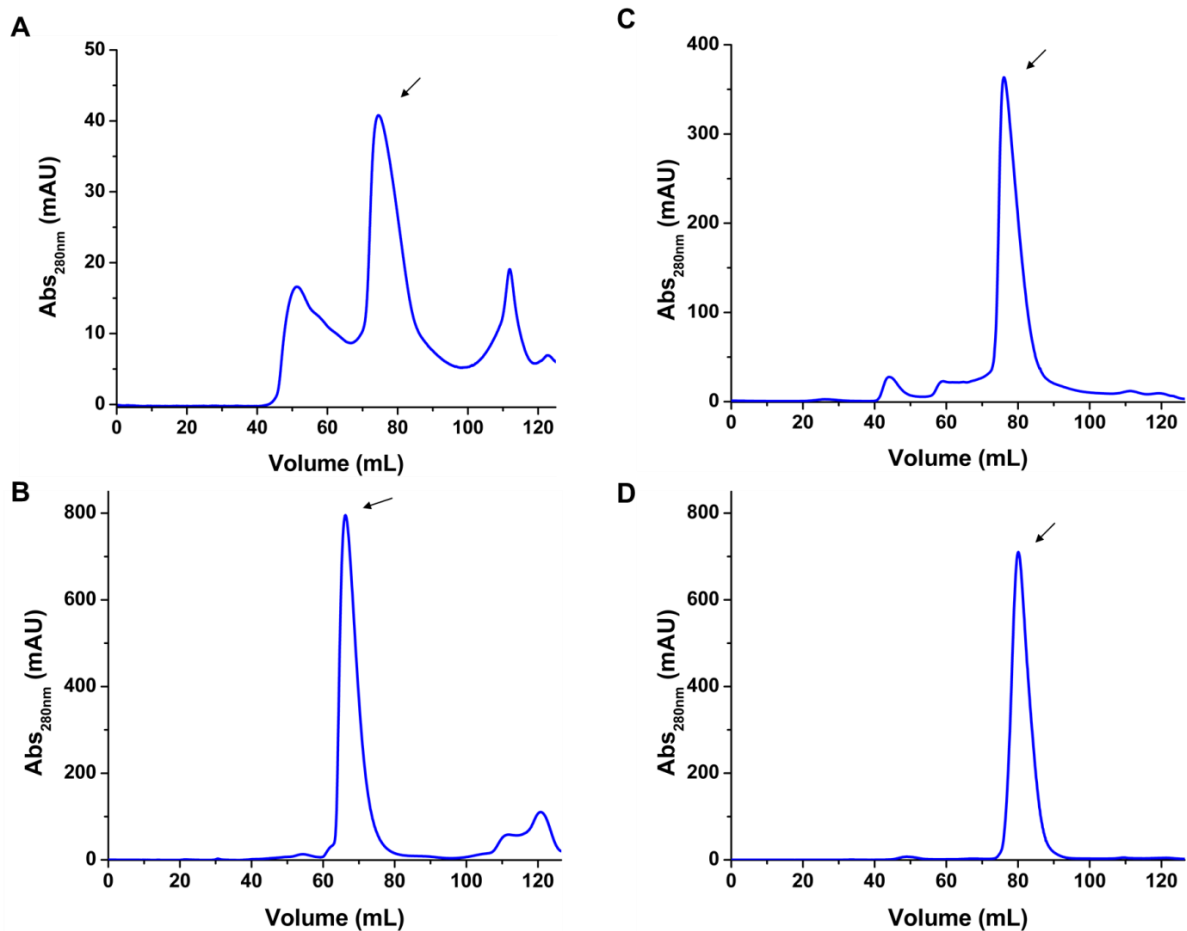


Figura 20. Purificações das construções de septinas por exclusão molecular. Os perfis cromatográficos foram obtidos utilizando coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. As setas indicam o ápice dos picos referentes ao volume de eluição das proteínas de interesse. (A) Cromatograma de SEPT6c. (B) Cromatograma de SEPT7c. (C) Cromatograma de SEPT11c. (D) Cromatograma de SEPT14c.

É interessante notar que, mesmo após a separação destes picos de contaminantes e com a coleta apenas da fração proteica correspondente a SEPT6c, indicado na figura, ainda assim a proteína precipitava e apresentava impurezas (**Figura 21.A**). A quantidade de impurezas desta fração ficou ainda mais nítida quando o gel de SDS-PAGE foi corado num protocolo mais sensível para detecção de proteínas utilizando nitrato de prata (**Figura 21.B**). Foi possível quantificar a pureza das bandas após fotodocumentar e analisar os géis no software *ImageLab* (*Bio-Rad*), onde a proteína SEPT6c foi observada com 67% de pureza após a SEC (**Tabela 4**). Mesmo assim as amostras de SEPT6c foram utilizadas neste projeto, principalmente nos ensaios de cristalização – tanto individualmente, quanto misturadas com SEPT7c. Contudo, os melhores e mais confiáveis resultados dos demais ensaios biofísicos foram obtidos com as construções das demais septinas, que apresentaram índices de pureza maiores que 90%.

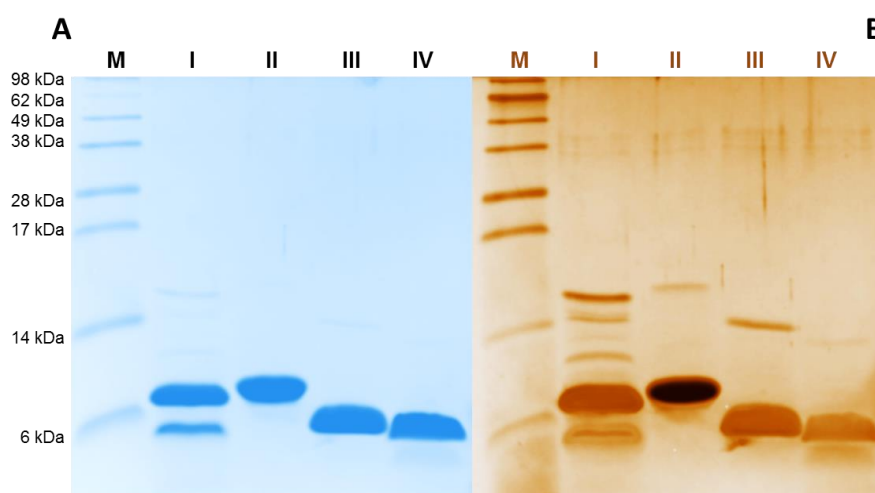


Figura 21. Eletroforese em gel SDS-PAGE Tris-Tricina 16% das septinas após exclusão molecular. As frações são referentes aos picos indicados na **Figura 20**. M: Marcador de peso molecular. Amostras: I. SEPT6c, II. SEPT7c, III. SEPT11c, IV. SEPT14c. (A) Gel corado com azul de coomassie. (B) Gel corado com nitrato de prata para maior sensibilidade na detecção das bandas de proteínas. Foi utilizado o mesmo gel apresentado em A após desimpregnar totalmente o corante azul coomassie.

Tabela 4 – Peso molecular e grau de pureza das frações purificadas após SEC das construções de septinas. *Peso molecular estimado pelo programa *ProtParam* (*ExpASy*).

Proteína	PM (kDa)*	Pureza após SEC
SEPT6c	9,37	67%
SEPT7c	9,39	98%
SEPT11c	7,58	93%
SEPT14c	6,53	96%

5.3.3. Calibração da coluna de cromatografia de exclusão molecular

Na tentativa de caracterizar as populações oligoméricas das amostras, a calibração da coluna de exclusão molecular foi a etapa inicial realizada (Figura 22). Pela calibração, as estimativas dos pesos moleculares dos picos obtidos da SEC foram de 16,86 kDa para SEPT6c e de 13,54 kDa para SEPT11c, o que caracteriza uma população de dímeros em ambas as amostras. Já o coeficiente de partição obtido para SEPT7c indicou a presença de entidades com 28,72 kDa, caracterizando uma população de tetrâmeros. Já para SEPT14c a estimativa do peso molecular de 10,56 kDa não possibilitou distinguir se a população seria monomérica ou dimérica.

Mesmo utilizando uma coluna de exclusão molecular de alta resolução, estes resultados são parcialmente condizentes com os esperados. Uma vez que, pela predição de estruturas em *coiled coil* das construções, populações de homodímeros eram previstas especialmente para SEPT7c – construção que apresentou bastante estabilidade e que seria importante para a associação nos ensaios subsequentes para caracterizar heterodímeros. Injeções com concentrações menores também foram realizadas, para avaliar se este fator interferia nos valores dos coeficientes. Todavia, é sabido que uma das limitações da técnica está na utilização de padrões de proteínas globulares para a caracterização do peso molecular de proteínas fibrosas, que possuem coeficiente de partição singular devido a sua conformação. Pela dinâmica destas proteínas em solução, seria mais adequado utilizar a técnica apenas para calcular o raio de Stokes, por exemplo.

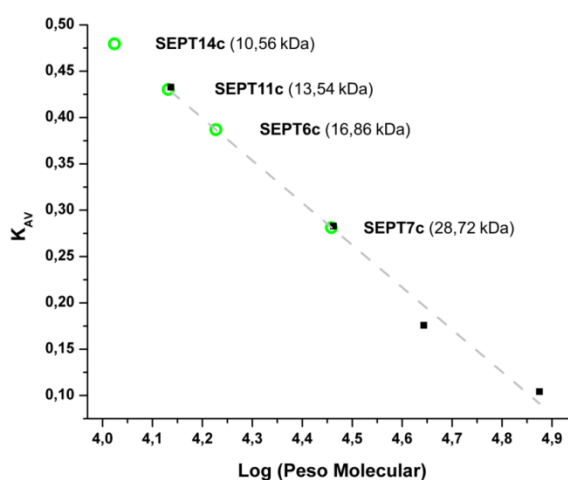


Figura 22. Calibração da coluna de exclusão molecular e estimativa dos pesos moleculares das septinas. Coeficiente de partição é em função do logaritmo do peso molecular. A calibração realizada na coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg com padrões de pesos moleculares (representados em preto) utilizados para o ajuste linear. Os círculos verdes representam as amostras septinas avaliadas.

As mostras de septinas também foram submetidas a diferentes processos na tentativa de melhor avaliar os estados oligoméricos e suas reorganizações através da SEC. Misturas equimolares de SEPT7c com as parceiras SEPT6c, SEPT11c e SEPT14c foram aquecidas e submetidas a agitação antes de serem injetadas na coluna de cromatografia. As amostras também incubadas com ureia durante períodos de tempo curtos (30 min) e longos (*overnight*) e com posterior diálise em filtros de centrifugação, a fim de que a desnaturação e o reordenamento das estruturas em hélices após a diálise permitisse a associação das septinas nos dímeros esperados.

Estes processos foram realizados para que as septinas se dissociassem e reordenassem em heterodímeros, visto que na literatura de septinas associação dos *coiled coils* ocorre preferencialmente numa interação heterotópica com parâmetros cinéticos de associação maiores do que em interações homodiméricas (MARQUES, 2012; SALA, 2016). Contudo, a técnica não foi suficiente para identificar a formação de heterodímeros nas amostras, que seriam ideais até mesmo para os ensaios de cristalografia. O pequeno tamanho das construções septinas originavam perfis cromatográficos semelhantes aos cromatogramas originais, não permitindo diferenciar se os picos seriam de homo ou de heterodímeros (dados não apresentados). Ao analisar as amostras por SDS-PAGE também não foi possível identificar a formação de dímeros, uma vez que a ação desnaturante do SDS atua sob as forças de interação do core hidrofóbico dos *coiled coils*. No entanto, esta situação foi contornada com a utilização de *crosslinkers*, abordada no tópico 5.6.

5.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A análise do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular foi empregada para avaliar a estabilidade e a conformação das amostras de septinas e mostrou que SEPT7c era a construção com maior estabilidade. O espectro obtido em pH neutro, condição de trabalho das proteínas, foi característico de estrutura rica em α -hélice – um espectro de CD típico desta estrutura é caracterizado pelos mínimos próximo a 208 nm e a 222 nm. Espectros dicroicos semelhantes foram obtidos quando a amostra foi avaliada nos valores de pH 4 e 9 (**Figura 23.A**). A diferença nos valores de elipticidade molar residual média em 208 nm e em 222 nm ficou mais nítida no pH 9 com incremento da elipticidade negativa, porém não causou alterações conformacionais severas na estrutura da proteína. Mesmo com as pequenas reorganizações moleculares nas hélices os espectros típicos de estruturas em α -hélice

condizem com o esperado e indicam que o microambiente do pH do tampão poderia ser explorado sem maiores receios.

Já para as construções de SEPT11c e SEPT14c mudanças conformacionais mais significativas associadas ao pH do microambiente foram detectadas com a transição de *coiled coils* organizados para estruturas do tipo *random-coil*. Nos espectros obtidos nos valores de pH 4 e 7, consideravelmente semelhantes em ambas as septinas (**Figuras 23.B e 23.C**), mostraram perda de estabilidade conformacional com alteração do sinal dicróico da banda em 222 nm. Esta banda é proeminente em estruturas ricas em α -hélice, resultado que sugere a presença de estruturas desordenadas no conteúdo das amostras. Já em pH 4 foi notado o ganho de estrutura para ambas as proteínas, com espectros dicróicos mais característicos de conformação em α -hélice. Este resultado do conteúdo de estrutura secundária mais ordenado em pH ácido também orientou as tentativas dos ensaios de cristalização.

As construções SEPT11c e SEPT14c, por serem menores foram mais suscetíveis a alterações conformacionais dependentes de pH. O rearranjo das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos dos heptads em pH 4, ao ficarem menos expostos ao solvente, é possivelmente o fator que promove a interação hidrofóbica das proteínas, especialmente pelos resíduos hidrofóbicos que se encontram nas posições *a* e *d*. O que propicia inferir a conversão de monômeros desestruturados em dímeros organizados em *coiled coils*. Isto fica evidente ao observar a razão da elipticidade molar residual média do sinal em 222 nm e 208 nm ($[\theta]_{\text{MRE } 222}/[\theta]_{\text{MRE } 208}$), que aproxima de 1 (**Tabela 5**). Em pH 7 SEPT7c obteve razão de 0,949, enquanto que SEPT11c obteve 0,833 e SEPT14c obteve razão de 0,847. Mesmo com a carência de estudos profundos para sequências pequenas de proteínas helicoidais, esta correlação entre os sinais obtidos quando ≥ 1 é indicativo de *coiled coils* estáveis (WALLIMANN, 2003). Nos demais valores pH, as razões de SEPT11c e SEPT14c foram menores que 0,7, indicando a presença de hélices isoladas.

Os ensaios realizados com SEPT6c (dados não apresentados) não possibilitaram caracterizar o conteúdo de estrutura secundária das amostras. Ora devido às disparidades de sinal, com bastante ruído mesmo após a troca de tampão Tris-HCl para fosfato de sódio; ora pelos dados serem mascarados pela forte contribuição do sinal dicróico de SEPT7c, quando ambas eram misturadas. Combinações de SEPT7c com SEPT11c e com SEPT14c foram lidas em pH 7, nos quais a contribuição do sinal da primeira se sobrepôs às demais, não possibilitando afirmar categoricamente que houve a associação destes em *coiled coils* heterodiméricos.

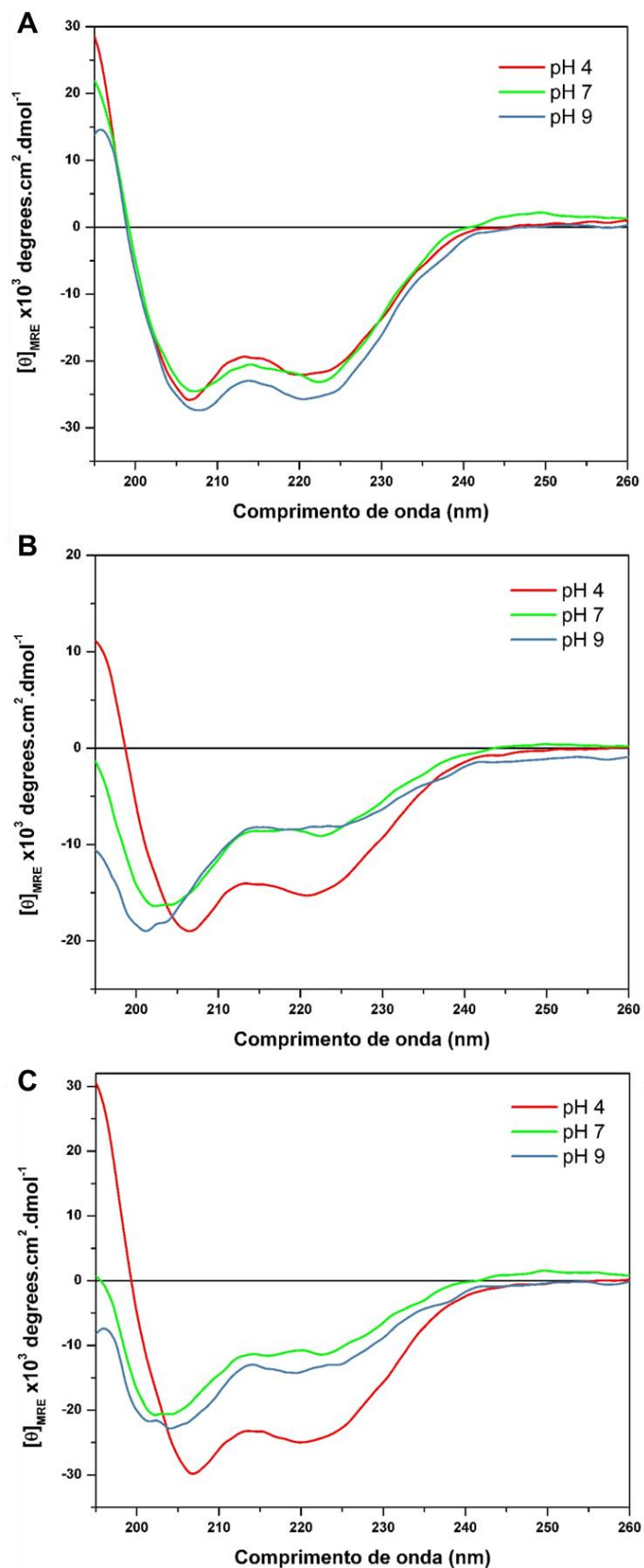


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular das septinas em diferentes pH. Ensaios realizados a 25 °C. A elipticidade obtida foi convertida para elipticidade molar residual média. **(A)** SEPT7c a 0,08 mg/mL (8,5 μ M). **(B)** SEPT11c a 0,15 mg/mL (20 μ M). **(C)** SEPT14c a 0,08 mg/mL (12 μ M).

Tabela 5 – Elipticidade molar residual média das septinas nas bandas características de α -hélice.

Valores obtidos dos espectros apresentados na Figura 23, no qual a elipticidade molar obtida foi convertida.

Proteína	pH	$[\theta]_{\text{MRE} \times 10^3} \text{ 222 nm}$	$[\theta]_{\text{MRE} \times 10^3} \text{ 208 nm}$	$\frac{[\theta]_{\text{MRE} \times 10^3} \text{ 222 nm}}{[\theta]_{\text{MRE} \times 10^3} \text{ 208 nm}}$
SEPT7c	4,0	-21,794	-24,771	0,880
	7,0	-23,111	-24,342	0,949
	9,0	-25,438	-27,377	0,929
SEPT11c	4,0	-15,098	-18,115	0,833
	7,0	-9,062	-13,636	0,665
	9,0	-8,152	-13,034	0,626
SEPT14c	4,0	-24,511	-28,922	0,847
	7,0	-11,351	-16,890	0,672
	9,0	-13,364	-20,023	0,667

A estabilidade térmica das construções também foi analisada por dicroísmo circular nos três valores de pH supracitados, variando a temperatura de 10 em 10 °C. Para SEPT7c, os espectros obtidos apresentaram comportamento semelhante, porém em pH 7 o sinal dicroico apresentou razões 222 nm/208 nm em temperatura ambiente. Houve incremento da banda de 222 nm quando as amostras foram submetidas a temperaturas mais baixas nos três pH. A **Figura 24.A** mostra os espectros em pH 4 estáveis até 25 °C e é possível notar a perda das bandas em 208 e 222 nm devido às alterações conformacionais a partir de 35 °C. Assim como visualizado em pH 4, o espectro coletado em 25°C após o processo de desnaturação térmica de SEPT7c mostra a volta das proteínas a sua conformação nativa, o que também ocorreu nas leituras em pH 7 e 9. Mesmo sendo termossensíveis, estes *coiled coils* de septinas apresentaram capacidade de renaturação sem apresentar agregação e precipitação.

Em pH 4, as construções SEPT11c e SEPT14c apresentaram estabilidade até a temperatura ambiente (25 °C) e com o aumento gradativo o sinal da banda de 222 nm foi reduzido até o desenovelamento das proteínas com espectro de estrutura desordenada a 75 °C (**Figuras 24.B e 24.C**). É interessante notar que, ao tornar as amostras a temperatura ambiente, estas proteínas também foram capazes de retornar a conformação helicoidal, com incremento de sinal de SEPT11c, indicando reorganização numa estrutura mais organizada. Já em pH 7 e 9, as proteínas que já apresentavam estrutura desordenada em temperatura ambiente, perderam ainda mais elipticidade em 222 nm (dados não apresentados).

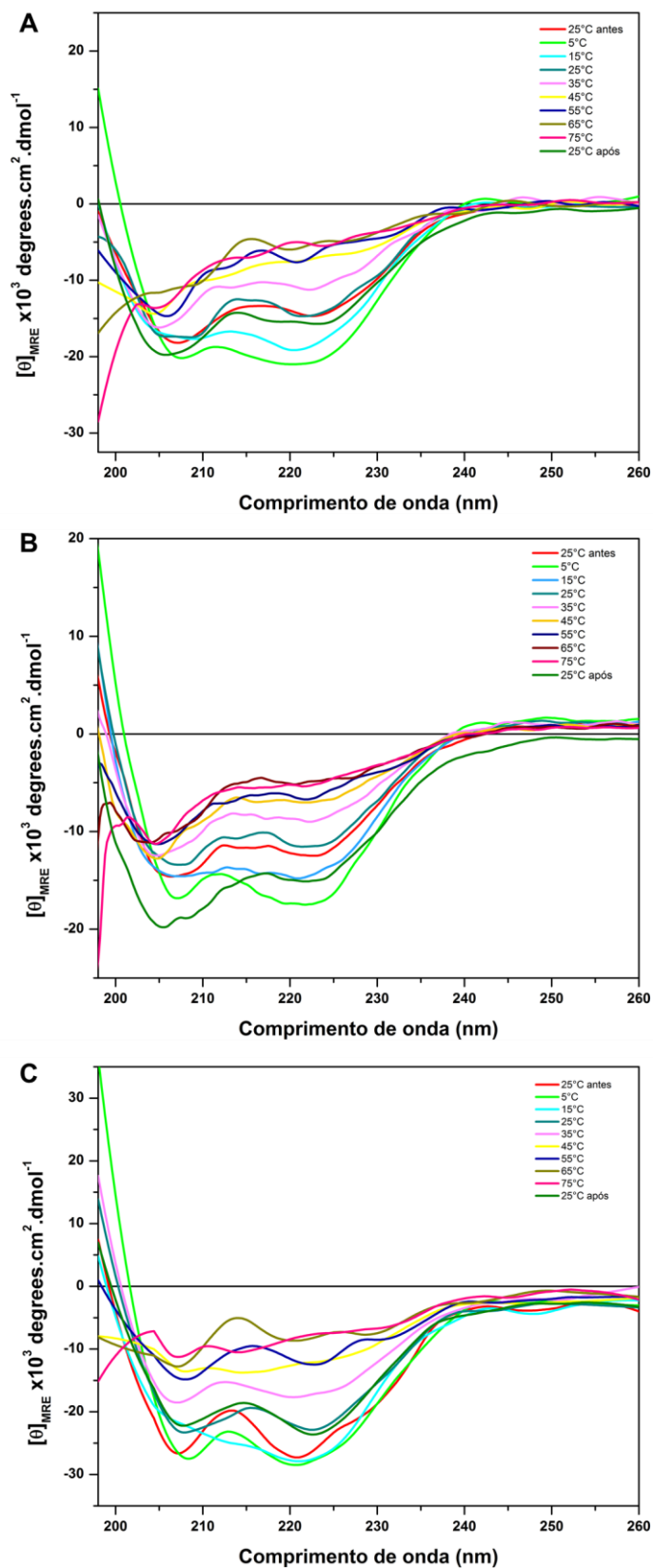


Figura 24. Estabilidade térmica das septinas em pH 4 por dicroísmo circular. Os espectros foram obtidos de 5 °C a 75 °C, com intervalos de 10 °C. A elipticidade obtida foi convertida para elipticidade molar residual média. (A) SEPT7c a 0,05 mg/mL (5,3 μM). (B) SEPT11c a 0,12 mg/mL (16 μM). (C) SEPT14c a 0,08 μg/mL (3,7 μM).

5.5. Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a Espalhamento de Luz Multiangular (SEC-MALS)

Os ensaios de exclusão molecular com monitoramento do espalhamento de luz multiangular acoplado ao sistema foram realizados para tentar caracterizar melhor os estados oligoméricos das construções de septinas em solução, uma vez que a técnica possibilita o cálculo das massas independente da estrutura que a proteína adquire em solução. A injeção feita com SEPT7c detectou a presença de 72,8% da amostra com espécies monoméricas com peso molecular de 9,2 kDa (**Figura 25**). A aproximação do PM corrobora com o peso molecular estimado teoricamente de 9,39 kDa e contrasta com peso molecular de 28,72 kDa obtido pela calibração da coluna de alta resolução, feita com padrões globulares.

Observar que as espécies de SEPT7c estavam dispostas na forma de monômeros em maioria, denota que a associação com as demais parceiras em heterodímeros poderia ser favorecida mais rapidamente, uma vez que dispensaria a dissociação de tetrâmeros para seguinte reorganização com as demais proteínas. A perspectiva desta conformação heterotípica é reflexo da formação de filamentos de septinas observados fisiologicamente, com a seletividade de parceiros, onde a interação hidrofóbica dos C-terminais em hétero *coiled coils* auxiliariam na manutenção da estabilidade destas estruturas (SALA *et al.*, 2016).

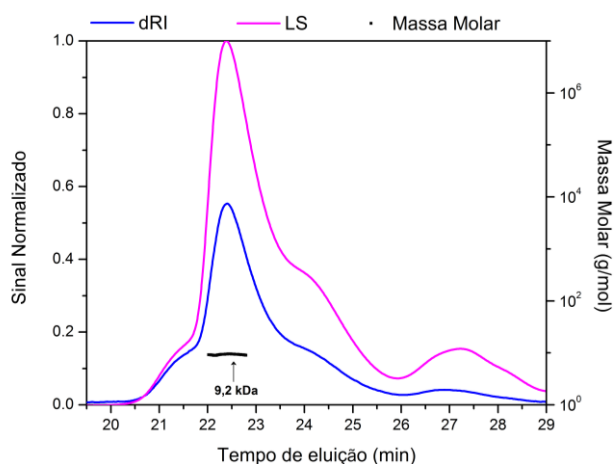


Figura 25. Perfil cromatográfico de SEPT7c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS. A linha azul representa a variação do índice de refração (dRI), a linha rosa o espalhamento de luz (LS) e os pontos pretos a massa molar de cada pico.

Na análise de SEPT11c foi observada uma população de 90,2% com peso molecular de 6,3 kDa, predominando espécies monoméricas assim como visto com SEPT7c. A caracterização deste peso molecular se aproximaria de uma das unidades dos dímeros de

13,54 kDa que foram estimados pela calibração da coluna de exclusão molecular. Resultados que salientam os impasses para caracterizar tais estruturas de septinas. No entanto, estes resultados corroboram com os dados obtidos por CD, em que o sinal dicróico com menor razão entre as bandas 222 nm e 208 nm em pH neutro seria indicativo da presença de hélices únicas. E, por sua vez, estes monômeros livres facilitariam a associação com a parceira para a formação de estruturas heterotípicas com maior estabilidade.

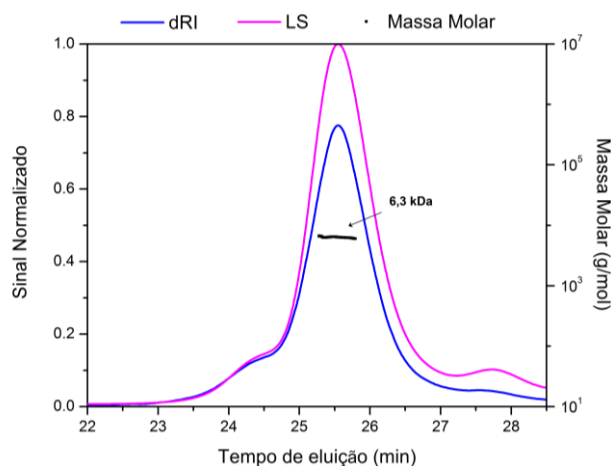


Figura 26. Perfil cromatográfico de SEPT11c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS. A linha azul representa a variação do índice de refração (dRI), a linha rosa o espalhamento de luz (LS) e os pontos pretos a massa molar de cada pico.

Ao misturar de forma equimolar as proteínas SEPT7c e SEPT11c numa concentração final de 8 mg/mL, a expectativa da identificação de heterodímeros culminou na identificação na identificação de três populações (**Figura 27**). Duas populações predominantes de 10 kDa (20%) e 7,2 kDa (71%), indicando respectivamente SEPT7c e SEPT11c, e uma população em menor concentração com peso molecular de 17,4 kDa (5,5%) – o que seria um indício da presença do heterodímero de SEPT7c-SEPT11c. Para melhor validar este dado pela técnica de SEC-MALS, seria importante a repetição dos ensaios variando as concentrações das misturas até que se encontrasse um a condição de equilíbrio entre as populações de SEPT7c e SEPT11c que favorecesse a formação de heterodímeros. Contudo, o tempo de utilização do equipamento e a localização do mesmo no IFSC/USP foram fatores limitantes para a repetição e o aprimoramento dos ensaios.

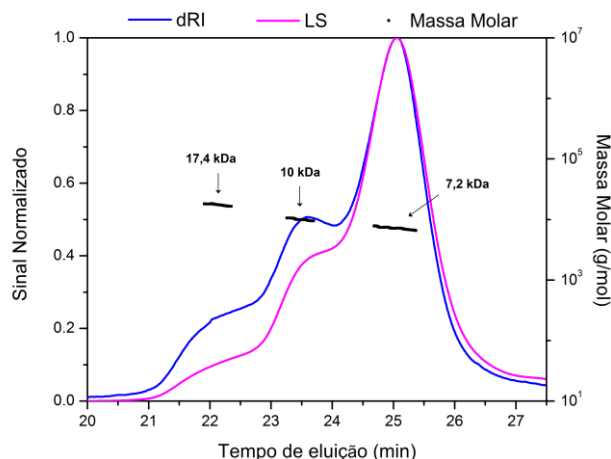


Figura 27. Perfil cromatográfico de SEPT7c + SEPT11c a 8 mg/mL obtido por SEC-MALS. Concentração final obtida por uma mistura equimolar das proteínas. A linha azul representa a variação do índice de refração (dRI), a linha rosa o espalhamento de luz (LS) e os pontos pretos a massa molar de cada pico.

Já para SEPT14c os resultados obtidos não foram tão assertivos, uma vez que foram identificadas duas populações predominantes: uma de 5,4 kDa (31%) e outra 3,8 kDa (64,7%), além de um população de 59,7 kDa (5,5%) (**Figura 28.A**). Com peso molecular teórico estimado de 6,53 kDa, a calibração da coluna de exclusão molecular estimou 10,56 kDa e também não permitiu caracterizar precisamente se a população seria monomérica. É interessante notar que, nestas mesmas condições, uma injeção feita com BSA (**Figura 28.B**) para calibrar a coluna utilizada nos experimentos de SEC-MALS permitiu identificar uma população de 91,2% com peso molecular de 65,2 kDa. O peso molecular da amostra adquirida comercialmente é de 66,5 kDa, assim o SEC-MALS apresentou erro de apenas 1,8%.

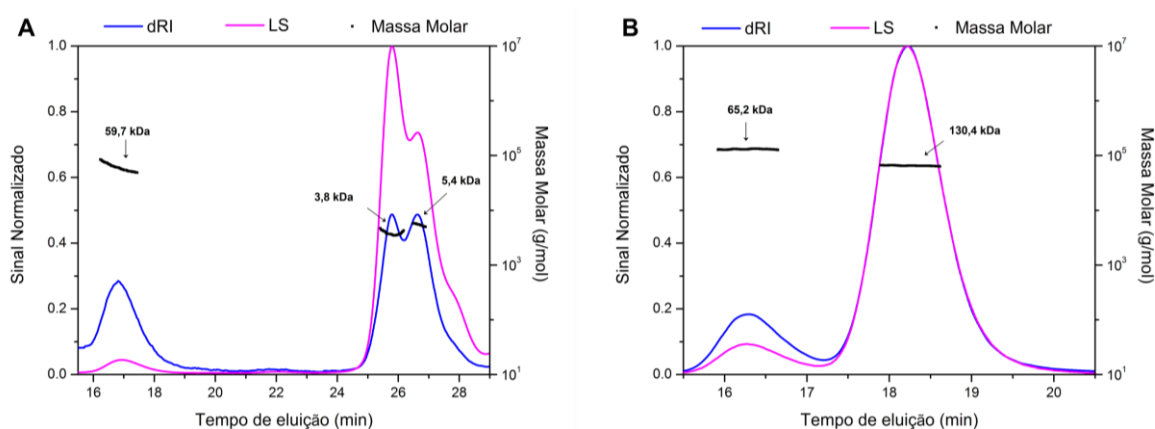


Figura 28. Perfis cromatográficos de SEPT14c e da calibração com BSA. Ambas as proteínas foram injetadas na concentração de 8 mg/mL. A linha azul representa a variação do índice de refração (dRI), a linha rosa o espalhamento de luz (LS) e os pontos pretos a massa molar de cada pico.

5.6. *Crosslinking* químico

Os ensaios de *crosslinking* químicos surgiram como uma alternativa para verificar a presença de dímeros nas amostras das construções de septinas. Mesmo em condições desnaturantes, as amostras tratadas com *crosslinkers* podem ser facilmente visualizadas por eletroforese em gel, pois estes agentes químicos promovem a formação de ligações cruzadas covalentes entre as proteínas que estejam interagindo as curtas distâncias (a depender do tamanho do braço espaçador que for utilizado). Nesta metodologia, a utilização de SDS-PAGE com Tris-Tricina viabiliza a melhor resolução das bandas de proteínas com menor peso molecular. Numa triagem inicial dois *crosslinkers* foram testados (dados não apresentados), DSS (com braço espaçador de 11,4 Å) e EGS (com braço espaçador de 16,1 Å), sendo que para as construções de septinas deste projeto o composto EGS mostrou maior habilidade para converter monômeros em gel desnaturante.

Ensaio para aprimorar a utilização da técnica foram realizados até a identificação de concentrações adequadas para visualização das bandas em gel de SDS-PAGE. Como resultado, o *crosslinking* químico permitiu a visualização da conversão de monômeros de SEPT7c em dímeros pela ação do agente EGS. Na **Figura 29** é possível observar as duas primeiras amostras de ambos os géis com a mesma concentração de SEPT7c, submetidas a mesma corrida de eletroforese e coloração com azul de *Coomassie* simultaneamente com perfis diferentes. A conversão em homodímeros de SEPT7c é visualizada, porém é nitidamente mais percebida no gel da **Figura 29.A**, com banda na altura aproximadamente 18 kDa.

A conversão de SEPT11c para dímeros também ficou evidente (**Figura 29.A**), e de forma mais discreta também foi possível notar a conversão de parte dos monômeros de SEPT14c em arranjos diméricos (**Figura 29. B**). Sugere-se que o tamanho da sequência da construção SEPT14c teve limitação para promover as ligações cruzadas com o uso do *crosslinker* EGS. Esta construção apresenta 52 resíduos de aminoácidos, destes 9 são lisinas – aminoácido que possui cadeia lateral com o grupo amina, onde o *crosslinker* se associa. É possível que mesmo SEPT14c estando organizada em *coiled coil*, o registro dos aminoácidos ou orientação da hélices, paralela ou antiparalela, não tenham sido propício para que o reagente tivesse acesso às lisinas de forma a uni-las covalentemente. Outros fatores que também podem ter contribuído seriam a concentração do *crosslinker*, o tempo e a temperatura de incubação das amostras.

A mistura equimolar de SEPT7c com SEPT11c resultou na observação de uma banda intermediária entre as bandas dos dímeros das duas proteínas, indicando a associação

heterodimérica das duas septinas. A presença da banda na altura de 17 kDa corrobora com as análises de SEC-MALS, onde foi observada a presença de populações com 17,4 kDa. Esta banda intermediária mostrou-se mais evidente na mistura equimolar na concentração de 25 μ M, já na mistura com concentração de 50 μ M também é possível notar a presença de 3 bandas que se sobrepõem, prejudicando a resolução.

A banda do heterodímero SEPT7c-SEPT11c observada na concentração de 25 μ M sugere que esta conformação é orientada pelo equilíbrio estequiométrico das amostras. Equilíbrio que é fisiologicamente importante para a correta seleção dos monômeros conferindo estabilidade aos filamentos de septinas humanas. Já as misturas equimolares de SEPT7c com SEPT14c resultaram em possíveis bandas de heterodímeros que necessitariam de outras análises, como espectrometria de massas, para validar a informação.

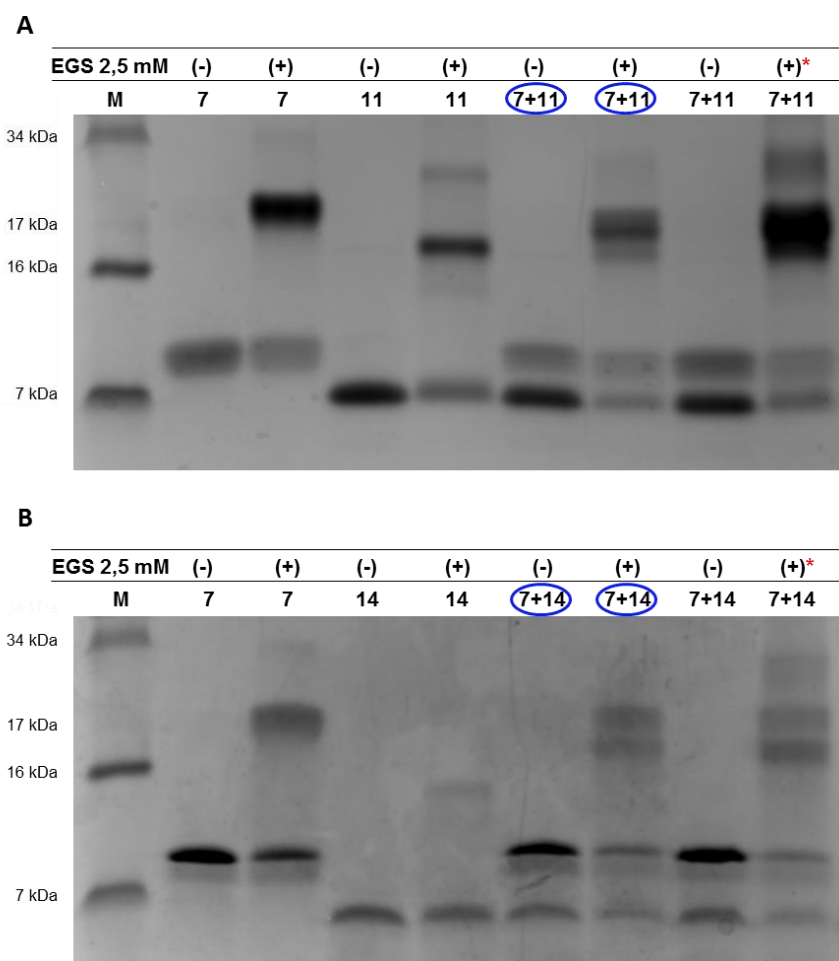


Figura 29. Crosslinking químico em gel desnaturante. Gel SDS-PAGE Tris-Tricina 16% corado com azul de *Coomassie*. Proteínas incubadas com o *crosslinker* Etileno Glicol Bis (EGS) a 2,5 mM durante 30 minutos em temperatura ambiente – a presença do EGS é indicada pelo símbolo (+). A concentração das proteínas foi de 50 μ M, exceto as circulasdas em azul que apresentaram concentração de 25 μ M. M: marcador de massa molecular. **(A)** *Crosslinking* entre SEPT7c e SEPT11c. **(B)** *Crosslinking* entre SEPT7c e SEPT14c. *Amostra com EGS a 5 mM.

5.7. Ultracentrifugação analítica – Velocidade de Sedimentação (SV-AUC)

A técnica de ultracentrifugação analítica foi utilizada para caracterizar os estados oligoméricos das proteínas e os parâmetros hidrodinâmicos em experimentos de velocidade de sedimentação. Após a realização dos ensaios nas condições definidas, os conjuntos de dados obtidos foram analisados e ajustados individualmente conforme os parâmetros hidrodinâmicos teoricamente obtidos com o programa SEDNTERP para as construções de septinas e para o tampão utilizado conforme **Tabela 6** e **Tabela 7**. A sequência de aminoácidos da cadeia monomérica e a composição do tampão foram utilizadas para obter dados importantes como volume parcial específico das construções de septinas, enquanto proteínas fibrosas, e assim conhecer a fluutuabilidade destas, que pode ser afetada pela composição do tampão utilizado e das interações com a água na camada de solvatação (COLE *et al.*, 2008). Com estes parâmetros foi possível ajustar os dados coletados das leituras de sedimentação à equação de Lamm.

Tabela 6. Características hidrodinâmicas das construções de septinas.

Parâmetros	SEPT7c	SEPT11c	SEPT14c
V_{bar} (mL/g)	0,72214	0,734965	0,735839
Hidratação	0,513737	0,585827	0,555727

Tabela 7. Características hidrodinâmicas dos tampões utilizados.

Tampão	Densidade – ρ (g/mL)	Viscosidade – η (mPa.s)
Acetato de sódio 20 mM pH 4 + NaCl 150 mM	1,0055	0,0102109
Tris-HCl pH 7 + NaCl 150 mM	1,0050	0,0102139

O perfil de sedimentação de SEPT7c é mostrado na **Figura 30** em duas faixas de pH analisadas, ilustrando a absorbância versus a distância radial da amostra na célula de quartzo durante a 300 leituras coletadas na absorbância $Abs_{280 \text{ nm}}$. Os valores de pH foram selecionados com base nos experimentos de CD, que indicaram ganho de estrutura para as septinas parceiras em condições ácidas. A partir destes foi possível determinar a razão friccional (f/f_0) de aproximadamente 1,6 em pH 4, que indica que a forma das moléculas analisadas não corresponde a estruturas globulares, mas sim estruturas alongadas como no caso de proteínas fibrosas. Contudo, em pH 7 a razão friccional obtida com valor aproximado

de 1,2 indicando uma alteração na conformação das proteica dependente do pH. A figura também apresenta os resíduos que são fornecidos pelo programa SEDFIT e indicam a qualidade do ajuste realizado, que pela distribuição uniforme das curvas experimentais resultou num bom ajuste dos dados.

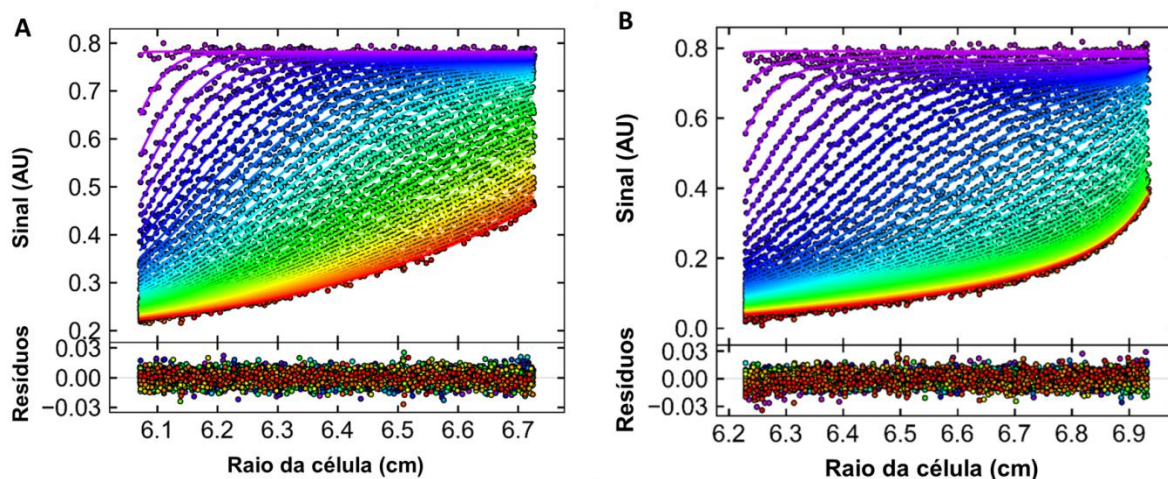


Figura 30. Perfil da sedimentação contínua de SEPT7c a 0,82 mg/mL. As curvas de sedimentação foram monitoradas na absorvância de 280 nm. O sinal é mostrado em relação ao raio da célula de leitura. Os resíduos do ajuste dos dados são ilustrados na parte inferior e indicam a qualidade dos dados. (A) SEPT7c em pH 4,0. (B) SEPT7c em pH 7,0.

A análise dos dados de SEPT7c em pH 4,0 resultou num pico discreto que indica uma única população (**Figura 31**). O coeficiente de sedimentação obtido foi de 1,03 S e o raio de Stokes de 2,28 nm. Ao corrigir o coeficiente de sedimentação para condições padrão $S_{20,w}$ (água a 20 °C) o programa conseguiu estimar o peso molecular de 9,73 kDa, corroborando com o peso teórico estimado de 9,23 kDa. Desta forma, nestas condições as espécies de SEPT7c estão organizadas predominantemente em formas monoméricas, em consonância com os dados de dicroísmo circular em pH 4.

Em contrapartida, em pH 7,0 as amostras de SEPT7c revelaram outros arranjos que são visualizados na **Figura 31**, onde ilustra a presença de dois picos com coeficientes de sedimentação distintos do obtido em condições ácidas. O primeiro pico resultou no coeficiente de sedimentação 0,76 S e raio de Stokes 0,75 nm. Já o segundo pico, que representa uma população de 74% da amostra, resultou no coeficiente de sedimentação 1,64 S e no raio de Stokes 1,82 nm. A estimativa dos pesos moleculares foi de 3,18 kDa e 16,93 kDa para os picos 1 e 2, respectivamente. Estes dados indicam a predominância de espécies de SEPT7c organizadas na forma de dímeros.

A partir destas análises é possível identificar a correlação dos estados oligoméricos de SEPT7c diretamente ligados ao pH do solvente em que se encontram as amostras. A influência do microambiente em pH 7,0 sobre as cargas superficiais SEPT7c favoreceu a interação dos resíduos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* dos *heptads* e consequente organização das moléculas em *coiled coils*. Nesta conjuntura, a obtenção de cristais em pH neutro para estas construções do C-terminal da septina 7 seria o passo inicial para viabilizar a resolução de estrutura de homodímeros SEPT7c-SEPT7c para assim conhecermos o registro e a fase das hélices. Assim, é pertinente considerar tanto o valor de pH quanto a concentração das amostras para a realização de outros experimentos em condições diferentes, pois estes fatores influenciam diretamente no padrão de oligomerização destas proteínas.

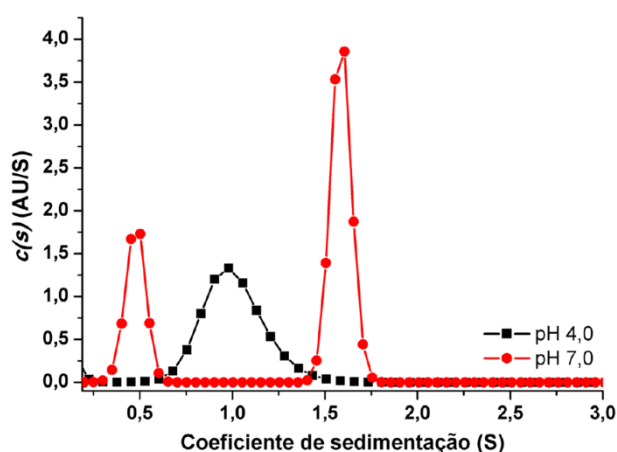


Figura 31. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT7c a 0,82 mg/mL. Os dados dos coeficientes foram obtidos a partir dos perfis de sedimentação ilustrados na **Figura 30**. A distribuição em pH 4,0 é indicada em preto e em vermelho, a distribuição em pH 7,0.

Os dados obtidos com as análises de ultracentrifugação de SEPT11c em pH 4,0 resultaram na razão friccional de 1,552 coeficiente de sedimentação 0,902 S e peso molecular estimado de 6,88 kDa. Quando dispostas em tampão de pH 7,0, as amostras de SEPT11c apresentaram razão friccional de 1,516 coeficiente de sedimentação 0,977 S e peso molecular estimado de 7,86 kDa, resultados que são ilustrados nas **Figuras 32 e 33**. Os valores de razão friccional obtidos revelam que a estrutura das moléculas sedimentadas apresenta conformação alongada, caracterizando α -hélices preditas para o domínio C-terminal das septinas humanas.

A presença de apenas um pico na distribuição contínua do coeficiente de sedimentação mostra que, nestas condições avaliadas, as espécies de SEPT11c se comportam como monômeros de modo não dependente do valor de pH, uma vez que os pesos moleculares

estimados se aproximam do PM teórico de 7,58 kDa. Segundo as análises em pH 7,0, esta população monomérica é predominante com 84%, enquanto que em pH 4,0 essa porcentagem diminui para 55%. Resultados estes intrigantes, uma vez que o grau de confiabilidade dos ajustes consideraram valores de RMSD inferiores a 0,007. É importante notar que outros parâmetros, tais como temperatura e concentração, podem influenciar diretamente no equilíbrio estequiométrico do estado oligomérico observado e induzir a formação de homodímeros – uma vez que estes foram demonstrados nos ensaios de *crosslinking* químico.

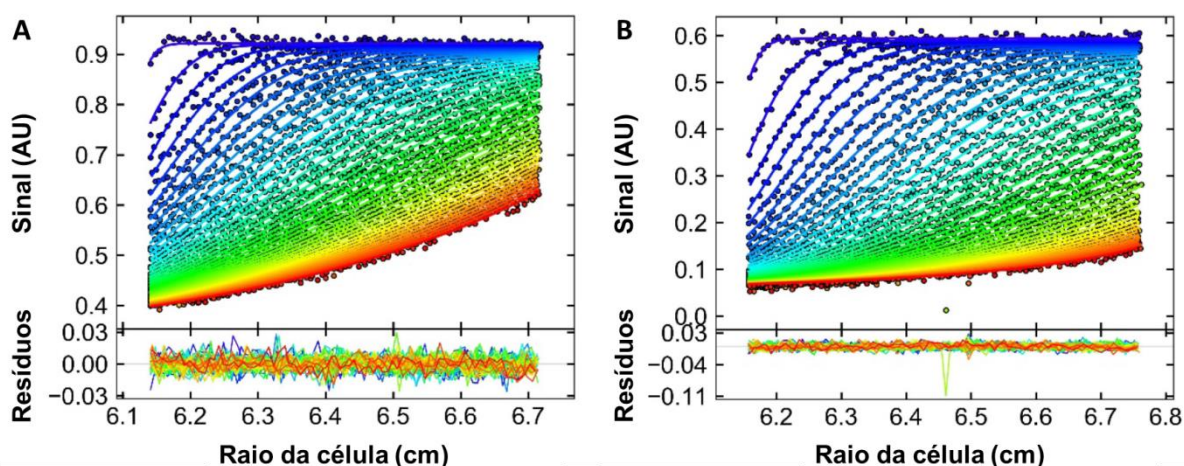


Figura 32. Perfil da sedimentação contínua de SEPT11c a 0,75 mg/mL. As curvas de sedimentação foram monitoradas na absorvância de 280 nm. O sinal é mostrado em relação ao raio da célula de leitura. Os resíduos do ajuste dos dados são ilustrados na parte inferior e indicam a qualidade dos dados. (A) SEPT11c em pH 4,0. (B) SEPT11c em pH 7,0.

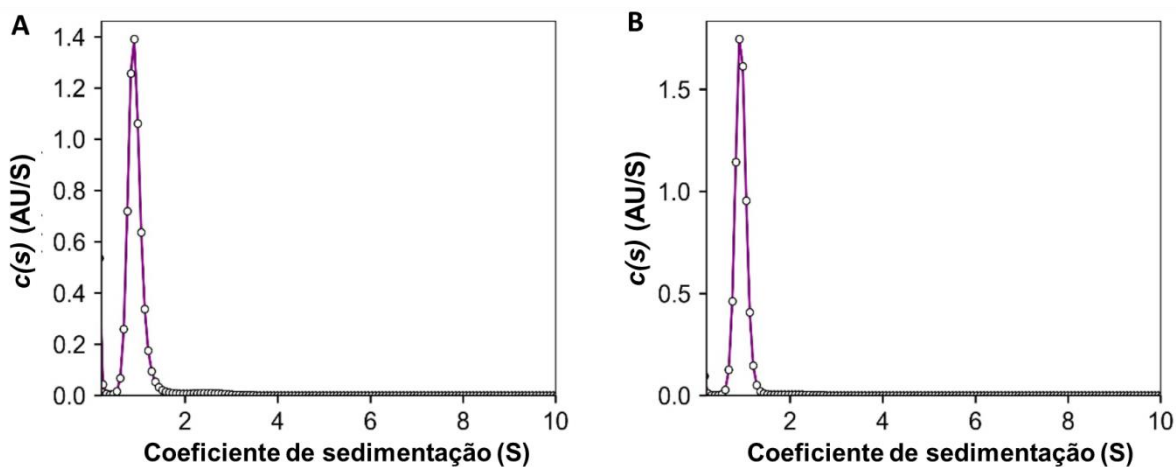


Figura 33. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT11c a 0,75 mg/mL. Os dados dos coeficientes foram obtidos a partir dos perfis de sedimentação ilustrados na **Figura 32**. (A) Distribuição do coeficiente em pH 4,0. (B) Distribuição do coeficiente em pH 7,0.

Os resultados obtidos para SEPT14c destoaram consideravelmente do esperado adversamente aos ensaios anteriores. Os ajustes e as análises da sedimentação das amostras são mostrados na **Figura 34**, onde perfis de sedimentação diferenciados são facilmente notados dos demais apresentados anteriormente e que salientam a resistência destas pequenas moléculas de sedimentarem nas condições que foram submetidas. Em pH 4,0 foi obtida a razão friccional 1,332, sendo que o pico 1 apresentou coeficiente de sedimentação de 0,43 S e peso molecular estimado de 1,84 kDa e o pico 2 apresentou coeficiente de sedimentação de 1,30 S e peso molecular estimado de 13,07 kDa – conforme ilustrado na **Figura 35.A**. O pico 2 coincide com arranjos diméricos de SEPT14c, considerando o peso teórico da construção 6,53 kDa. Contudo, o sinal deste pico correspondeu a apenas 6% da amostra, enquanto que o pico 1 correspondeu a 37% das espécies detectadas pelos ajustes da técnica.

Em pH 7,0 a razão friccional foi de 1,238, coeficiente de sedimentação 0,50 S e peso molecular 2,30 kDa. O único pico, que é ilustrado na **Figura 35.B**, foi descrito representar 78% da amostra. Considerando uma provável instabilidade da construção de SEPT14c, que não se mostrou plenamente apta a formar dímeros nos ensaios de *crosslinking* químico, é possível que a presença de regiões desordenadas nestas proteínas não favoreceram a exatidão das análises nas condições testadas. A imprecisão na estimativa do peso molecular da possivelmente ocorreu devido à razão friccional, um parâmetro essencial para o cálculo de massa, que é ajustada pelo SEDFIT como uma média de peso entre todas as moléculas em solução (CHATON; HERR, 2015).

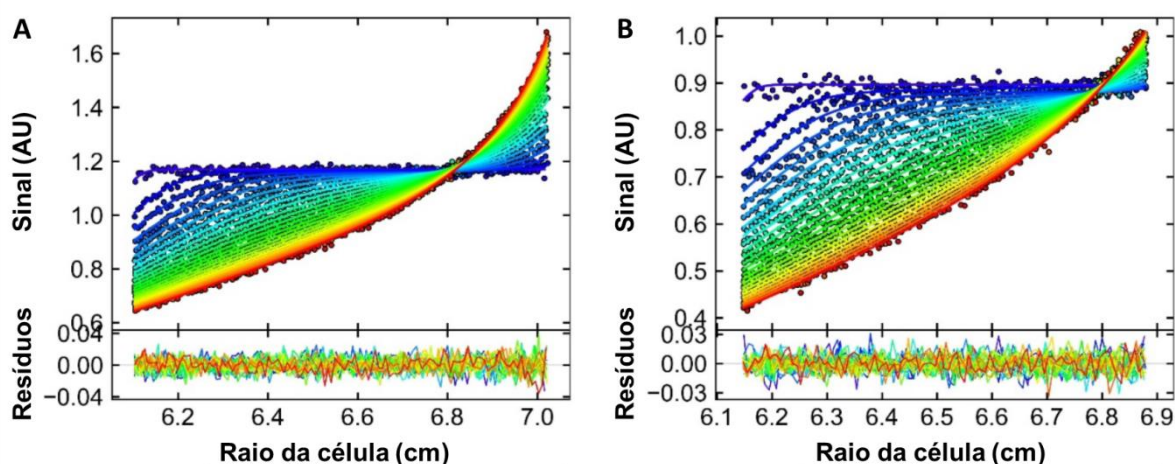


Figura 34. Perfil da sedimentação contínua de SEPT14c a 0,82 mg/mL. As curvas de sedimentação foram monitoradas na absorvância de 280 nm. O sinal é mostrado em relação ao raio da célula de leitura. Os resíduos do ajuste dos dados são ilustrados na parte inferior e indicam a qualidade dos dados. (A) SEPT14c em pH 4,0. (B) SEPT14c em pH 7,0.

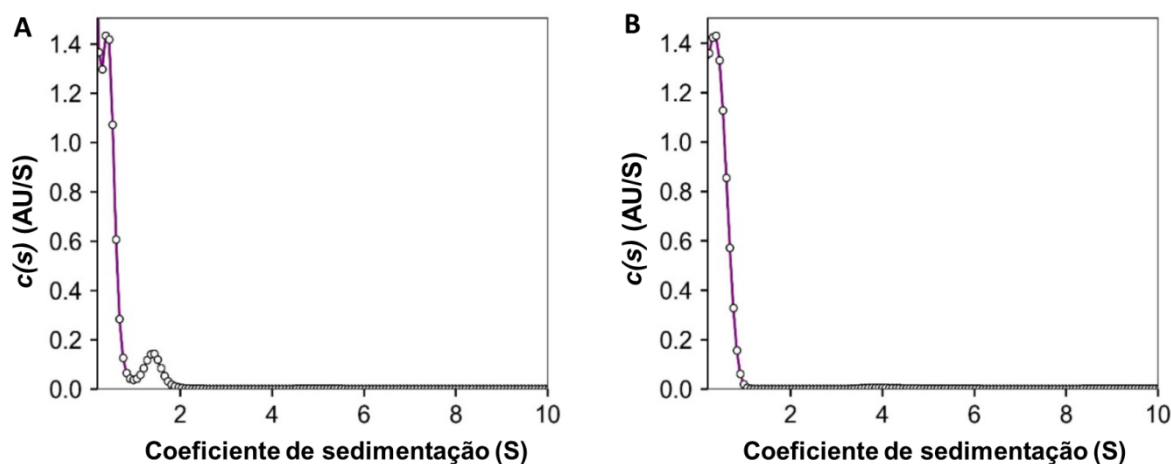


Figura 35. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação de SEPT14c a 0,82 mg/mL. Os dados dos coeficientes foram obtidos a partir dos perfis de sedimentação ilustrados na **Figura 34**. **(A)** Distribuição do coeficiente em pH 4,0. **(B)** Distribuição do coeficiente em pH 7,0.

As amostras de SEPT6c foram conduzidas aos ensaios de ultracentrifugação analítica em ensaios individualmente e em misturas equimolares com SEPT7c antes das técnicas de eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e da coloração com nitrato de prata serem realizadas. Como as amostras de SEPT6c apresentaram grau de pureza de apenas 67%, os conjuntos de dados apresentam qualidade questionável. Para evitar resultados tendenciosos, os conjuntos de dados não foram tratados.

5.8. Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados após a obtenção de frações puras das proteínas SEPT6c e SEPT7c. Logo após a cromatografia de exclusão molecular as amostras foram concentradas e direcionadas para ensaios automatizados de cristalização utilizando o nanopipetador Mosquito[®]. Foram testados diversos kits comerciais de cristalização, em ensaios com diferentes concentrações de proteína utilizando as septinas isoladas e em misturas equimolares, para a formação de cristais de heterodímeros. A proteína SEPT7c foi a que apresentou melhores resultados nos ensaios iniciais de cristalização, em que se obtiveram algumas condições com micro cristais. Experimentos de difração de raios X foram realizados em Síncrotron (LNLS), contudo não foram obtidos conjuntos de dados de resolução maior que 10 Å, como ilustrado na **Figura 36**.

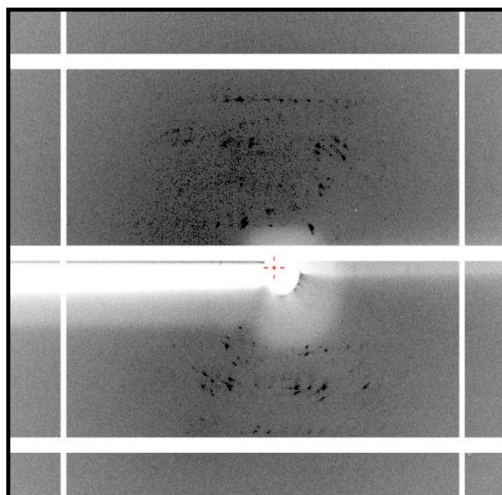


Figura 36. Representação do padrão de difração de cristal de SEPT7c com resolução a 10 Å. Nos experimentos de cristalografia, resoluções menores (3 Å ou 2 Å) exibem melhor qualidade de densidade eletrônica, o que permite localizar os aminoácidos nas conformações adequadas para tentar resolver a estrutura tridimensional da proteína.

Mesmo com as dificuldades de purificação e com a qualidade das amostras, ensaios de cristalização também foram realizados com SEPT6c e com misturas equimolares desta com SEPT7c. No entanto, nenhum deles apresentou condições promissoras de cristalização. Quando as microplacas de cristalização foram observadas em lupa semanas ou meses depois, as gotas se apresentavam líquidas ou com precipitados amorfos, conforme ilustrado nas **Figuras 37 e 38.**

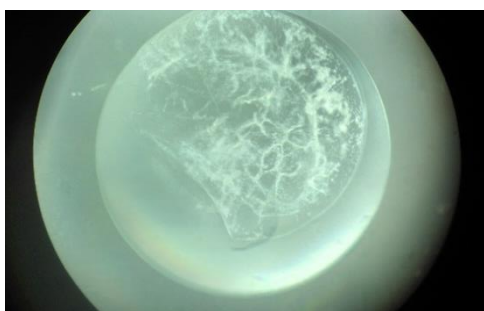


Figura 37. Gota com precipitado de SEPT6c. A concentração da proteína foi de aproximadamente 120 mg/mL. Gota do ensaio de *screening* com a solução com 20% (m/v) PEG 3.350 e 200 mM nitrato de sódio.

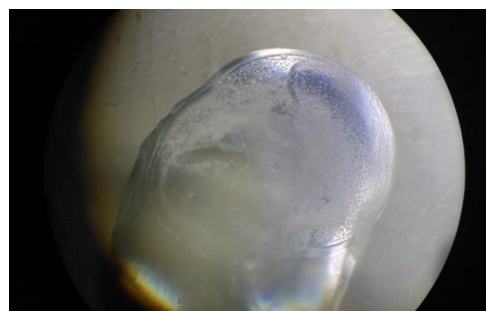


Figura 38. Gota com precipitado de SEPT6c+SEPT7c. A concentração da proteína foi de aproximadamente 34,5 mg/mL. Gota do ensaio de *screening* com a solução com a 20% (m/v) PEG 8.000, 100 mM citrato fosfato de potássio e 200 mM NaCl.

Uma alteração na metodologia para promover a formação de núcleos dos cristais e o crescimento destes de forma mais lenta foi realizada. Em vez das microplacas serem

acondicionadas em sala climatizada a 20 °C, novos ensaios de *screening* foram realizados e as microplacas foram acondicionadas a 4 °C. Cristais de SEPT7c maiores foram observados após 53 dias de acondicionamento, conforme apresentados na **Figura 39**. Esta metodologia de cristalização a baixa temperatura também foi empregada para os ensaios com SEPT7c e SEPT11c, onde cristais foram observados em alguns poços. Demonstrando a importância da temperatura no processo de cristalização destas construções. Contudo, quando as caixinhas foram retiradas do resfriamento para serem inspecionadas em sala acondicionada a 20 °C, os cristais se desfizeram em poucos minutos. Ao notar a perda dos cristais, as caixinhas foram imediatamente realocadas no resfriamento a 4 °C, porém os cristais não foram detectados novamente.

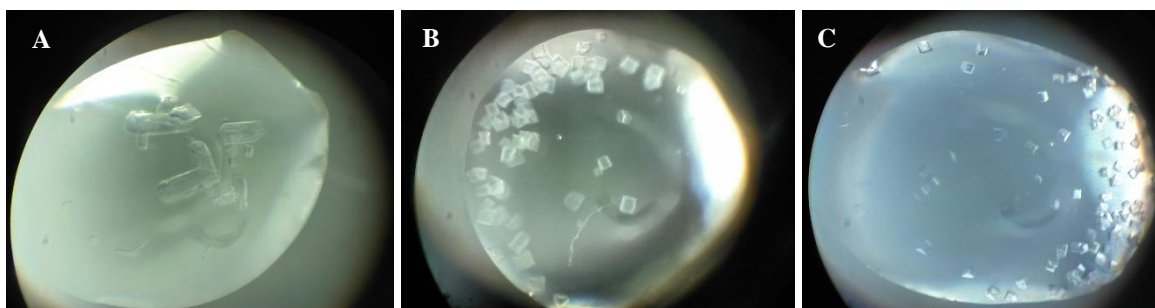


Figura 39. Cristais de SEPT7c visualizados após 53 dias de acondicionamento a 4 °C. A concentração da proteína foi de aproximadamente 51,08 mg/mL. Os ensaios de *screening* foram realizados com as soluções (A) PEG 4.000 22% (p/v), Tris 50 mM pH 8,5, Cloreto de sódio 500 mM; (B) HEPES 0,1 M pH 7,5, PEG 6.000 10% (p/v), hexileno glicol 5% (v/v); (C) HEPES 0,1 M pH 7,5, PEG 8.000 10% (p/v), Etileno glicol 8% (v/v).

Os ensaios de cristalização de SEPT11c e de SEPT14c também foram realizados utilizando kits comerciais. As condições para a cristalização foram triadas utilizando proteínas recém-purificadas, assim como nos demais ensaios. Mesmo utilizando altas concentrações de proteínas, como 71 mg/mL para SEPT11c e 66 mg/mL para SEPT14c, praticamente nenhuma das gotas apresentavam precipitados de imediato. As caixinhas de cristalização foram inspecionadas periodicamente e alguns cristais puderam ser observados após aproximadamente 1 mês da confecção, como visualizados na **Figura 40**.

Ensaios com misturas equimolares das duas proteínas combinadas com SEPT7c também foram realizados, porém não foram obtidos resultados promissores. Usualmente as gotas apresentavam precipitados amorfos, nos quais a cristalização ordenada das moléculas não foi obtida. Estes resultados demonstram que as proteínas passavam da zona de

insaturação para a zona de precipitação durante a difusão de vapores dentro dos poços, conforme o diagrama de fases de cristalização de proteínas (CHAYEN, 1998).

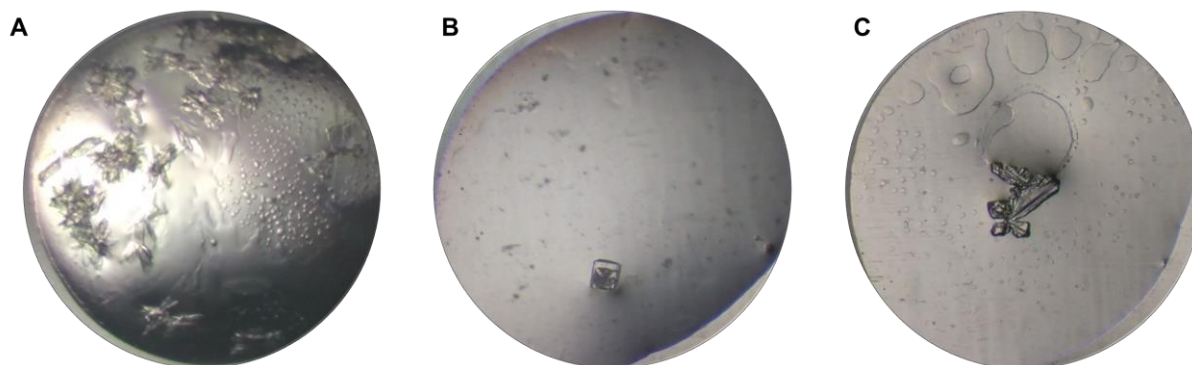


Figura 40. Cristais de SEPT11c e SEPT14c obtidos em acondicionamento a 20 °C. (A) Cristal de SEPT11c em pH 4,0 a 66 mg/mL. Solução da gota: cloreto de sódio 0,2 M, acetato de sódio 0,1 pH 5,0, PEG 6000 20% (m/v). (B) Cristal de SEPT14c em pH 4,0 a 16,57 mg/mL. Solução da gota: acetato de magnésio 0,1 M pH 5,6, citrato de sódio 0,1 M, PEG 10.000 8% (m/v). (C) Cristal de SEPT14c em pH 4,0 a 16,57 mg/mL. Solução da gota: acetato de sódio 0,1 M pH 4,6 e cloreto de sódio 1,5 M.

Nenhum dos possíveis cristais de SEPT11c e de SEPT14c puderam ser submetidos a difração de raios-X no LNLS para avaliar a qualidade dos cristais, uma vez que as linhas de luz do LNL não estavam mais disponíveis para utilização dos usuários. A fonte de luz síncrotron UVX teve sua operação encerrada com a promessa da nova fonte de luz síncrotron do Brasil, o Sirius, seja inaugurada em meados de 2020. Mesmo assim ensaios de difração de raios-X foram realizados em difratômetro *in house*, na própria Universidade de Brasília (**Figura 41**). Inúmeros cristais foram submetidos a difração de raios-X, sendo que nenhum deles apresentou padrões de difração característicos de proteína, sendo apenas compostos por sal – padrões com poucos pontos de difração e de qualidade ruim, média-alta resolução.

Para explorar um número ainda maior de condições de cristalização, diferentes kits comerciais foram testados em experimentos realizados no Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo. A colaboração com o maior grupo de septinólogos do país possibilitou ensaios com as construções SEPT7c, SEPT11c, SEPT7c+ SEPT11c e SEPT14c. Algumas das caixinhas confeccionadas apresentaram gotas com precipitados logo após a confecção e foram acondicionadas em sala climatizada a 18 °C e também sobre refrigeração a 4 °C. Durante o período de aproximadamente 1 mês (entre junho e julho de 2019) que o

presente autor deste permaneceu no IFSC/USP, nenhum cristal foi detectado. Meses depois, após contatar alguns colaboradores no Instituto, nenhum cristal havia sido identificado.

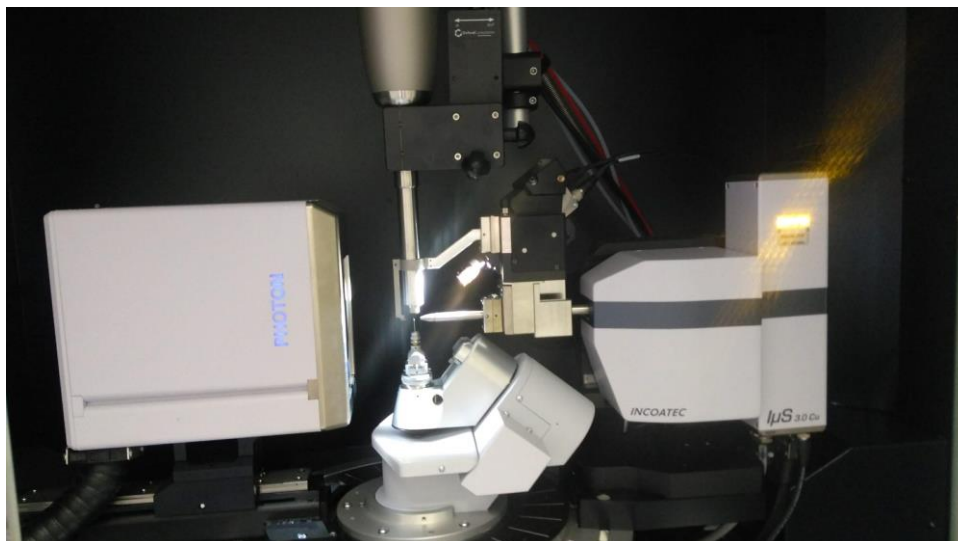


Figura 41. Representação dos ensaios de difração de raios-X realizados na UnB. A imagem foi capturada durante emissão de raios-X sobre possíveis cristais de proteína para avaliar a qualidade de difração dos mesmos. Experimento realizado utilizando difratômetro *D8 Venture (Brucker)*.

6. CONCLUSÕES

Compreender os mecanismos envolvidos na seletividade e na organização de septinas humanas de diferentes grupos é uma etapa fundamental para melhor caracterizar estas proteínas recém-classificadas como componentes do citoesqueleto. Formando filamentos e outras estruturas com alto grau de organização, estas proteínas mostram sua importância nos processos de divisão celular e com diversas patologias, no entanto pouco se conhece sobre estes mecanismos. Desta forma, a seleção das regiões C-terminais para a determinação estrutural permitiria preencher uma das instigantes lacunas da literatura de septinas.

Obtivemos sucesso em expressar 4 construções de septinas na forma solúvel: SEPT6c, SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c. Dificuldades foram encontradas para manter a estabilidade de SEPT6c durante os ensaios de purificação, o que levou a avaliação de outras metodologias, fazendo triagem de condições de tampão e expressão em diferentes cepas de *E. coli*. Mesmo com estes impasses, tivemos êxito na purificação das demais construções, o que permitiu a realização de diferentes ensaios biofísicos para caracterizar essas proteínas.

Sobre os ensaios de caracterização da formação de heterodímeros foi possível concluir que a técnica de cromatografia de exclusão molecular, mesmo utilizando uma coluna de alta resolução, não foi suficiente para caracterizar as amostras deste projeto. Amostras individuais e combinadas das septinas, em concentrações equimolares foram analisadas, contudo os picos e pesos moleculares obtidos pela calibração não foram precisos. Isto provavelmente ocorreu devido a conformação alongada das construções utilizadas neste projeto, esta conformação diverge dos padrões utilizados para a calibração (que são proteínas globulares) e podem ter gerado resultados imprecisos.

Com os ensaios de dicroísmo circular foi possível constatar que as construções apresentam maior tendência a adotar uma conformação helicoidal a baixos pHs. Ensaios de estabilidade térmica não permitiram a caracterização dos parâmetros termodinâmicos para as construções, visto que as proteínas prontamente perdiam a conformação nativa quando submetidas ao aumento de temperatura.

As amostras de septinas submetidas a ensaios de cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multiangular revelaram populações monoméricas de SEPT7C e SEPT11c, e também indícios da formação de heterodímeros entre estes. Enquanto que os amostras de SEPT14c mostraram resultados imprecisos.

Com o auxílio de *crosslinkers* químicos foi possível concluir que as amostras de SEPT7c, SEPT11c e SEPT14c apresentavam espécies organizadas em homodímeros (em menor quantidade para SEPT14c). Também foi evidenciada a formação de heterodímeros de SEPT7c+SEPT11c, mostrando a habilidade das construções de se organizarem hétero *coiled coils* que poderiam ser revelados também nos estudos de cristalografia.

Pelos estados oligoméricos observados por ultracentrifugação analítica concluiu-se que o pH influencia no equilíbrio entre espécies monoméricas e diméricas de SEPT7c, nas condições testadas. Enquanto para a construção de SEPT11c foram identificados apenas monômeros, resultados sem muita precisão foram observados para SEPT14c.

Diversos ensaios de cristalização foram realizados com amostras individualmente e combinando SEPT7c com as demais construções deste estudo, até mesmo com amostras de SEPT6c. Nas condições testadas, muitas gotas límpidas foram observadas e outras com precipitados amorfos. Microcristais também foram identificados em algumas condições e estes serviram como bases para alguns ensaios de refinamento para explorar o espaço amostral das condições de cristalização, entretanto os cristais obtidos não resultaram em padrões de difração com qualidade suficiente para processar os dados e resolver as estruturas cristalográficas. Muitos dos cristais obtidos não apresentaram padrões de difração característicos de proteína.

7. PERSPECTIVAS

Para continuar investigando os domínios C-terminais estudados neste projeto, seria necessário realizar mais ensaios de cristalização com a utilização de outros kits comerciais, explorando mais condições. Outras construções destas mesmas septinas podem ser consideradas, adicionando ou reduzindo resíduos que talvez promovessem maior estabilidade aos *coiled coils*, assim como também alterar a *tag* de purificação ou até mesmo o sistema de expressão. Além disto, avaliar o equilíbrio dos estados oligoméricos em outras faixas de pH, temperaturas e concentrações aumentaria o conhecimento sobre o comportamento destas construções, para assim determinar melhores parâmetros para os ensaios de cristalização.

REFERÊNCIAS

ABDELLA, P. M.; SMITH, P. K.; ROYER, G. P. A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 87, n. 3, p. 734-742, 1979.

BERGER, B. *et al.* Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 8259-8263, 1995.

BERTIN, A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 8274-8279, 2008.

BROWN, J. H.; COHEN, C.; PARRY, D. A. D. Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 26, n. 2, p. 134-145, 1996.

BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2001.

CHATON, C. T.; HERR, A. B. Elucidating complicated assembling systems in biology using size-and-shape analysis of sedimentation velocity data. **Methods in enzymology**, ed. 562, p. 187-204, 2015.

CHAYEN, N. E. Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. **Acta Crystallographica**, v. D54, p. 8-15, 1998.

COLE, J. L. *et al.* Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. **Methods in Cell Biology**, v. 84, p. 143-179, 2008.

DELORENZI, M.; SPEED, T. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. **Bioinformatics**, v. 18, p. 617-625, 2002.

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, p. 485-492, 2010.

FOLTA-STOGNIEW, E. Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. **Methods in Molecular Biology**, v. 328, p. 97-112, 2006.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Serve. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. United States: Humana Press, 2005. p. 571-607. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>. Acesso em: 12 mar. 2019.

HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. R. Expression profiling the human septin gene family. **The Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269-278, 2005.

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.

HAYES, D.; LAUE, T. M.; PHILO, J. Program Sednterp: Sedimentation Interpretation Program. **Alliance Protein Laboratories**, Thousand Oaks, CA, USA. 1995.

HOLLADAY, L. A. Simultaneous rapid estimation of sedimentation coefficient and molecular weight. **Biophysical Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 303-308, 1980.

HSU, S. C.; HAZUKA, C. D.; ROTH, R.; FOLETTI, D. L.; HEUSER, J.; SCHELLER, R. H. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain Sec6/8 complex and septin filaments. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1111-1122, 1998.

HU, Q.; MILENKOVIC, L.; JIN, H.; SCOTT, M. P; NACHURY, M. V.; SPILIOTIS, E. T.; NELSON, W. J. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436-439, 2010.

IHARA, M. *et al.* Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 343-352, 2005.

JANES, R. W.; WALLACE, B. A. An Introduction to Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy. *In*: JANES, R. W.; WALLACE, B. A. (Ed.). **Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy**. Netherlands: IOS Press, 2009.

JIA, Z. *et al.* Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. **Journal of neuro-oncology**, v. 98, n. 3, p. 329-340, 2010.

KIM, S. K. *et al.* Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1337-1340, 2010.

KIM, M. S., *et al.* SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815-826, 2011.

KINOSHITA, A. *et al.* Identification of septins in the neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551-1560, 1998.

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

KINOSHITA, M. The septins. **Genome Biology**, v. 4, n. 11, p. 236, 2003.

KINOSHITA, M. *et al.* Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes & Development**, v. 11, p. 1535-1547, 1997.

KINOSHITA, M. *et al.* Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.

KREMER, B. E.; ADANG, L. A.; MACARA, I. G. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of nck mediated by SOCS7. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 837-850, 2007.

KUHLENBAUMER, G. *et al.* Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. **Nature Genetics**, v. 37, n. 10, p. 1044–1046, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, p. 2067-2079, 2002.

LIU, J. *et al.* A seven-helix coiled coil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 42, p. 15457-14562, 2006.

LJUBETIČ, A. *et al.* Design of coiled-coil protein-origami cages that self-assemble in vitro and in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1094-1101, 2017.

LONGTINE, M. S. *et al.* The septins, roles in cytokinesis and other processes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 106-119, 1996.

LOW, C.; MACARA, I. G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697-30706, 2006.

LUPAS, A. N.; GRUBER, M. The structure of alpha-helical coiled coils. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 37-78, 2005.

LUPAS, A. *et al.* Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-1164, 1991.

MACARA, I. G. *et al.* Mammalian septins nomenclature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4111-4113, 2002.

MARQUES, I. A. *et al.* C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, p. 317-328, 2012.

MARTÍNEZ, C. *et al.* Platelet septin form rings and associate with the microtubular network. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, p. 1388-1395, 2006.

MASON, J. M.; ARNDT, K. M. Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. **ChemBioChem**, v. 5, n. 2, p. 170-176, 2004.

MBInfo. Mechanobiology Institute, National University of Singapore. **What are septins?** Disponível em: [https:// https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-the-cytoskeleton/what-are-septins/](https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-the-cytoskeleton/what-are-septins/). Acesso em: 16 dez. 2019.

MEGONIGAL, M. D. *et al.* t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6413-6418, 1998.

MENDONÇA, D. C. *et al.* Repositioning septins within the core particle. **bioRxiv**, 2019. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/569251v1.full.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.

MOSTOWY, S. *et al.* Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 5, p. 433-444, 2010.

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

MÜLLER, K. M.; ARNDT, K. M.; ALBER, T. Protein fusions to coiled-coil domains. **Methods in Enzymology**, v. 328, p. 261-282, 2000.

NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.

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.

ONISHI M.; PRINGLE J. R. The nonopisthokont septins: how many there are, how little we know about them, and how we might learn more. **Methods in Cell Biology**, v. 136, p. 1-19, 2016.

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

RAMAN, S. *et al.* Structure-based design of peptides that self-assemble into regular polyhedral nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 95-102, 2006.

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

SANDERS, S. L.; FIELD, C. M. Cell division. Septins in common? **Current Biology : CB**, v. 4, n. 10, p. 907-910, 1994.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCHUCK, P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1606-1619, 2000.

SELLIN, M. E. *et al.* Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 17, p. 3152-3164, 2011.

SHEFFIELD, P. J. *et al.* Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.

SHUCK, P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1606-1619, 2000.

SILVERMAN-GAVRILA, R. V; SILVERMAN-GAVRILA, L. B. Septins: new microtubule interacting partners. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 611-620, 2008.

SIRAJUDDIN, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311-315, 2007.

SOROOR, F. *et al.* Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. **bioRxiv**, 2019. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/07/569871.full.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.

STUDIER, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. In: CHEN, Y. W. **Structural Genomics: General Applications**. Methods in Molecular Biology (v. 1091). United States: Humana Press, 2014. p. 17-32.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, p. 113-130, 1986.

TADA, T. *et al.* Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology: CB**, v. 17, n. 20, p. 1752-1758, 2007.

TRANG, V. *et al.* A coiled-coil masking domain for selective activation of therapeutic antibodies. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 761-765, 2019.

TANAKA, M. *et al.* Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 286, n. 3, p. 547-553, 2001.

TOKHTAEVA, E. *et al.* Septin dynamics are essential for exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5280-5297, 2015.

VALADARES, N. F. *et al.* Septin structure and filament assembly. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017.

VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. **Methods in Cell Biology**, v. 136, p. 321-338, 2016.

VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299-1304, 2001.

WAGNER, S. *et al.* Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14371-14376, 2008.

WALLIMANN, P. *et al.* Dual Wavelength Parametric Test of Two-State Models for Circular Dichroism Spectra of Helical Polypeptides: Anomalous Dichroic Properties of Alanine-Rich Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 5, p. 1203-1220, 2002.

WOLF, E.; KIM, P. S.; BERGER, B. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. **Protein Science**, v. 6, p. 1179-1189, 1997.

XIE, Y. *et al.* The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. **Current Biology: CB**, v. 17, n. 20, p. 1746-1751, 2007.

YAMAZAKI, T., *et al.* Localization and evolution of septins in algae. **Plant Journal**, v. 74, p. 605-614, 2013.

ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the gdp-gtp cycle. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 169-180, 2014.

ZHANG, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458-1467, 1999.

ZHANG, Y. *et al.* Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13354-13359, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A – *Abstract* submetido ao congresso *64th Annual Meeting of the Biophysical Society*, realizado nos dias 15-19 de fevereiro de 2020, em San Diego, EUA.



“BIOPHYSICAL ANALYSIS OF THE C-TERMINAL DOMAINS OF
HUMAN SEPTIN 7, 11 AND 14”

**Conceição, W. V. O.¹ *; Garay, A. V.¹; Cavini, I. A.²; Souza, A. A.¹; Sala, F. A.²; Freitas, S. M.¹;
Garratt, R. C.²; Valadares, N. F.¹ ***

¹Molecular Biophysics Laboratory, Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasilia-DF, Brazil; ²Sao Carlos Institute of Physics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Septins are cytoskeleton components that form heterofilaments and play an important role in the final stages of cell division. Initially identified in yeast, septins are also present in other eukaryotes, with plants being a notable exception. Septins are associated with human pathological conditions like leukemia, Parkinson's and Alzheimer's disease. Most septins present three characteristic domains, an N-terminal domain, a central guanine nucleotide binding domain and C-terminal domain predicted to form a coiled coil whose role in filament assembly is poorly understood. Although limited studies highlight their importance in filament formation, currently there is no deposited septin C-terminal domain crystal structure. Here we present the heterologous expression and subsequently purification of the C-terminal domains of human septins 7, 11 and 14. Circular dichroism spectroscopy shows that SEPT11c and SEPT14c only display high helical content at pH 4, while SEPT7c adopts helical conformation at pHs 4, 7 and 9. In these conditions, the dichroic ratio of 222 nm/208 nm (closer to 1) suggests that these proteins are present as coiled coils. Chemical crosslinking assays were employed to corroborate the CD data, revealing that SEPT7c, SEPT11c and SEPT14c form dimers in solution, and that an equimolar mixture of SEPT7c-SEPT11c forms heterodimers. In agreement with these data, SEC-MALS analysis revealed the presence of SEPT7c dimers and SEPT7c-SEPT11c heterodimers, while monomeric populations were observed for all septin samples. Automated crystallization assays employing pure septin samples as well as SEPT7c together with SEPT11c and SEPT14c were performed exploring hundreds of conditions. Some conditions yielded crystals and the chemical space around these conditions are being explored. The crystals were subject to X-ray diffraction using an in house D8 Venture diffractometer yielding low resolution datasets. Using this information more crystallization assays are being developed.

BIOPHYSICAL ANALYSIS OF THE C-TERMINAL DOMAINS OF HUMAN SEPTIN 7, 11 AND 14



Conceição, W. V. O.^{1*}; Garay, A. V.¹; Cavini, I. A.²; Souza, A. A.¹; Sala, F. A.²; Freitas, S. M.¹; Garratt, R. C.²; Valadares, N. F.^{1*}
¹Molecular Biophysics Laboratory, Cell Biology Department, University of Brasília, Brasília-DF, Brazil; ²Sao Carlos Institute of Physics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.
 *Corresponding authors: napo@unb.br / wallace.ex@gmail.com

Introduction
 Septins are cytoskeleton components that form heterofilaments and play an important role in the final stages of cell division. Initially identified in yeast, septins are also present in other eukaryotes, with plants being a notable exception. Septins are associated with human pathological conditions like leukemia, Parkinson's and Alzheimer's disease. Most septins present three characteristic domains, an N-terminal domain, a central guanine nucleotide binding domain and C-terminal domain predicted to form a coiled coil whose role in filament assembly is poorly understood. Although limited studies highlight their importance in filament formation, currently there is no deposited septin C-terminal domain crystal structure.

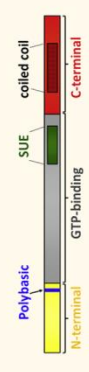


Figure 1. Schematic representation of septin domains. Human septins display N- and C-terminal flanking the GTP-binding domain. G domain is represented in grey and present the conserved GTP-binding motif. The N-terminal domain is represented in yellow and the C-terminal domain in blue. The coiled coil region that might play a role in maintaining filament stabilization and correct oligomerization.



Figure 2. Interaction model in the septin filament. The monomers of septin 6, 7 and 2 groups (blue, yellow and red, respectively) display high order of organization. The interaction by SEPT6 and SEPT7 C-terminal forms coiled coil structures that might assume various positions.

Objective
 Characterize C-terminal constructions of the human septin 7, 11 and 14 by biophysical, chemical and crystallization assays in order to evaluate the interactions between septins of the SEPT6 and SEPT7 groups.

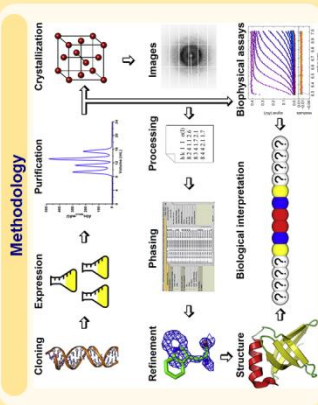


Figure 3. Arrangements of human septins in hexamers and heptamers. (A) Septin monomers (SEPT6, SEPT7, SEPT11, SEPT14) and (B) Septin hexamers and heptamers (SEPT6, SEPT7, SEPT11, SEPT14) based on cryo-electron microscopy and electron microscopy.

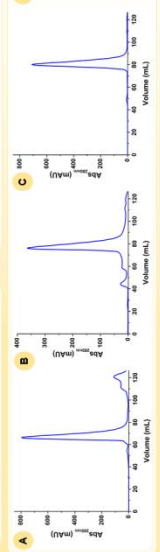


Figure 4. Model of the coiled coil formed by SEPT7C, SEPT11C, SEPT14C, SEPT6C, SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (A) SDS-PAGE and SEC chromatograms of the native and recombinant SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (B) SEC chromatograms of the native and recombinant SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (C) SEC chromatograms of the native and recombinant SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (D) SEC chromatograms of the native and recombinant SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (E) SEC chromatograms of the native and recombinant SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C.

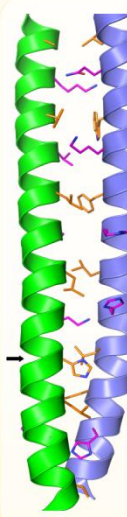


Figure 5. Several pairings are possible in a parallel SEPT6C-SEPT7C arrangement. Helical sequences allow a number of phases that satisfy the presence of hydrophobic residues in positions "A" and "D". Possibilities for a parallel structure (in the same section) are presented, but an antiparallel topology in opposite directions is also possible.

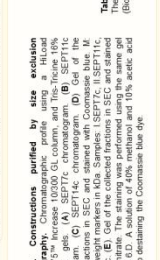


Figure 6. Constructions purified by size exclusion chromatography. Chromatographic profiles using a HPLC SEC-PAGE gel. (A) SEPT7C, (B) SEPT11C, (C) SEPT14C, (D) SEPT7C-SEPT11C, (E) SEPT7C-SEPT14C, (F) SEPT11C-SEPT14C. Molecular weight markers in kDa. Samples: I. SEPT7C, II. SEPT11C, III. SEPT14C. (E) Gel of the collected fractions in SEC and stained from Figure 6 D. A solution of 40% methanol and 10% acetic acid was used to destain the Coomassie blue dye.

Division	MW (kDa)	Purity after SEC
SEPT7C	8.30	98%
SEPT11C	7.58	98%
SEPT14C	6.53	98%

Table 1. Molecular weight and purity after SEC. The level of purity was estimated using ImageLab software (Bio-Rad). Molecular weight theoretically estimated.



Figure 8. Chemical crosslinking. By using a crosslinker SEPT7C, SEPT11C and SEPT14C dimers and heterodimers with SEPT11C and SEPT14C were crosslinked. (A) SEPT7C, (B) SEPT11C, (C) SEPT14C. (D) SEC chromatograms of SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (E) SEC chromatograms of SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C. (F) SEC chromatograms of SEPT7C, SEPT11C, and SEPT14C.



Figure 10. Crystallization assays and X-ray diffraction patterns. (A) SEPT7C crystal in pH 7.0 at 5.1 mg/ml. Drop solution: MES, Tris buffer, pH 7.6, 100 mM PEG 1500. (B) SEPT14C crystal in pH 4.0 at 16 mg/ml. Drop solution: 0.2 M sodium acetate pH 5.0, 20% (w/v) PEG 8000. (C) X-ray diffraction pattern of a SEPT7C crystal collected in the MX2 beamline at the LNS, Campinas-Sp, Brazil. Crystals typically diffracted to 10 Å of resolution.

Conclusions
 Biophysical assays revealed dimers of all constructions and SEPT7C-SEPT11C heterodimers. Higher helical content was observed at pH 4. Although CD and SEC-MALS analyses indicate that monomeric states are favored for SEPT11C and SEPT14C in these experimental conditions, dimeric and heterodimeric assemblies were confirmed by chemical assays. Hundreds of crystallization conditions were explored and additional attempts are being performed. To keep investigating, other crystallization kits are required and other C-terminal constructions are being considered.

Acknowledgements
 FAPESP, CNPQ, CAPES, FINECIA, FINEP, FINEX, FINEV, FINEZ, FINEG, FINEI, FINEP, FINEV, FINEZ, FINEG, FINEI.

References
 VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. *Methods in Cell Biology*, v. 100, p. 481-500, 2017.

VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. *Methods in Cell Biology*, v. 100, p. 481-500, 2017.

VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. *Methods in Cell Biology*, v. 100, p. 481-500, 2017.

VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. *Methods in Cell Biology*, v. 100, p. 481-500, 2017.

VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. *Methods in Cell Biology*, v. 100, p. 481-500, 2017.