UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TATIANA DE ARRUDA CAMPOS BRASIL DE SOUZA

"ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DAS SEPTINAS

HUMANAS 6, 8 E 10"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) TATIANA DE ADRUDA CAMPOS DIASE DE 40028 Notes Jackora e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética e Biologia Molecular Animal.

i

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. 8.

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89e	Souza, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Estudos funcionais e estruturais das septinas humanas 6, 8 e 10 / Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.
	Orientador: João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Septinas. 2. GTP Fosfohidrolases. 3. Ciclo celular. I. Barbosa, João Alexandre Ribeiro Gonçalves. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Functional and structural studies of human septin 6, 8 and 10.
Palavras-chave em inglês: Septins; GTP Phosphohydrolases; Cell cycle.
Área de concentração: Genética Animal e Evolução.
Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.
Banca examinadora: João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, Débora Foguel, Paulo Sérgio Rodrigues Coelho, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Jörg Kobarg.
Data da defesa: 05/03/2010.
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, cinco de março de dois mil e dez

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . João Alexandre Ribeiro Gonçalves Ribeiro Barbosa

Profa. Dra. Debora Foguel

Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Prof. Dr Jörg Kobarg.

Assinatura

Assinatur

ubilillo

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que através de seus exemplos e ações repletas de sonhos, generosidade, entusiasmo, ética e esforço, me mostram todos os dias que viver é uma dádiva.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho só foi possível porque desde sempre sou uma pessoa de muita sorte.

• Sorte por ter Tereza Cristina e Sergio como pais, sempre presentes, que foram capazes de me mostrar que os êxitos não são alcançados facilmente, mas que através de muito trabalho, com muita alegria e com muito amor nas nossas ações, os obstáculos são transponíveis.

• Sorte por ter uma irmã companheira, a Dra. Rafaela. Que alegra os meus dias com seu jeito extrovertido e por ter uma personalidade tão diferente da minha, me mostra como agir em momentos quando não sei por onde começar.

• Sorte por ter um namorado companheiro, que sabe compreender quando o "doutorado" rouba o tempo que deveria ser dedicado a ele. Raphael, muito obrigado por sempre estar ao meu lado, por me incentivar, me dar força e nunca deixar que eu desista.

• Sorte por ter sempre em meu caminho "científico" pessoas generosas, competentes e de diferentes personalidades, que foram responsáveis pelo meu amadurecimento e crescimento profissional. Gostaria de agradecer a todos os meus orientadores: Dra. Sílvia Ponzoni e Dra. Shiduca Itow Jankevicius (iniciação científica), Dra. Sueli Ogatta (mestrado) e Dr. João Alexandre Barbosa (doutorado).

Sorte também por ter tantos amigos e ter conhecido tantas pessoas especiais nestes últimos quatro anos. Há quatro anos, quando deixei a minha cidade natal possuía algumas pessoas fundamentais na minha vida, como a minha irmã Rafaela, minhas amigas Viviane, Narjara, Jesi, Talita, Fabrício e Sérgio e o meu cachorro Duque. Hoje, ao término deste trabalho, posso dizer que nunca antes na minha vida profissional eu tinha estado cercada de tantos alunos generosos e que a harmonia e amizade que encontrei no LNLS são únicas. Gostaria de deixar meu agradecimento em especial aos meus amigos:

V

Alexandre Quaresma, Andres Cernadas, Andrea Balan, Camila Ramos dos Santos, Carolina Santacruz, Celisa Tonoli, Daniel Lanza, Daniel Trindade, Gabriela Meirelles, Gustavo Bressan, José Geraldo Carvalho, Germanna Righetto, Marcos Alborghetti, Mariane Domingues, Nádia Martins, Natália Perez, Priscila Giuseppe, Tiago de Souza, Vanessa Pegos e a Penélope.

Gostaria de agradecer a Dra. Ana Paula Uilian de Araújo, e ao Dr. Richard Charles Garratt, Dr.
 Nilson Ivo Tonin Zanchin, Dr. Jörg Kobarg pela contribuição ao longo do desenvolvimento deste projeto.

• À professora Ana Paula Uilian de Araújo por disponibilizar a realização de experimentos em seu laboratório e à Joci Neuby pela ajuda em executá-los.

Àos Drs. Nilson Ivo Tonin Zanchin, Paulo Sérgio Rodrigues Coelho, Dr. Jörg Kobarg e Dra.
 Débora Foguel pela correção desta tese e participação na defesa de doutorado.

• Gostaria de agradecer à minha avó Lourdes e meu padrinho José Roberto e em especial aos meus avôs Olavo e Alminda, que permitiram que a viagem de Campinas à Londrina fosse tão fácil como ir de Paulínia à Campinas com seu apoio financeiro.

• Agradeço à FAPESP e UNICAMP pelas bolsas concedidas, mas não concomitantes.

• Agradeço ao LNLS pela infra-estrutura.

• E à Deus, Nossa Senhora, anjos e santos que iluminam e abençoam o meu caminho, o tornando sempre especial.

"Tanto mar, invés de nos separar, nos uniu. Em 141 dias de ausência, do início ao fim, o Paratii fez a sua volta e retornou a Jurumirim. A Terra é mesmo redonda. Ao longo do caminho, pensando bem, nem vento, nem ondas, nem gelos tão ruins, porque no fim, nada impediu meu veleiro de voltar inteiro à sua baía. E nada foi melhor do que voltar para descobrir, abraçando as três, que o mar da nossa casa não tem mesmo fim.

Pior do que passar frio, subindo e descendo ondas ao sul do oceano Índico, seria não ter chegado até aqui. Ou nunca ter deixado as águas quentes e confortáveis de Parati. Mesmo que fosse apenas para descobrir o quanto elas eram quentes e confortáveis. Eu senti um estranho bem estar ao contornar gelos tão longe de casa.

Hoje entendo bem o meu pai. Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou tv. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é, que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver".

Amyr Klink – Mar sem fim

ÍNDICE

A. L	ista de figuras	X
B. L	ista de tabelas	xii
C. R	lesumo	xiii
D. Summary		
I.	Introdução	1
	1. Ciclo celular em eucariotos	1
	1.1. Proteínas G	3
	2. Septinas	6
	2.1. Septinas na Polaridade celular	9
	2.2. Septinas na citocinese	10
	2.3. Septinas na sinalização celular	12
	2.4. Septinas humanas	14
II.	Objetivos	24
III.	Resultados	25
	3. Artigos	
	3.1. Artigo I	25
	3.2. Artigo II	48
	3.3. Artigo III	64
IV.	Resultados complementares	84
	4. Ensaios de cristalização	84
	4.1. Testes de cristalização com septina 6	85
	4.2. Testes de cristalização com septina 8	88
	4.3. Screening de solubilidade	91
	4.4. Metilação redutiva de lisinas	94

5. O papel da ligação de GTP na formação de filamentos

de	e septina 6	98
	5.1 Ensaio de ligação a GMP – agarose	99
	5.2 Espectroscopia de dicroísmo circular	100
	5.3 Desnovelamento térmico	102
	5.4 Espectroscopia de fluorescência	103
	5.5 Microscopia Eletrônia de Transmissão (MET)	105
V.	Conclusão	108
VI.	Referências	110

Lista de figuras

Figura 1. Representação do ciclo celular	1
Figura 2. Mecanismo geral da citocinese em eucariotos	2
Figura 3. Estrutura de proteínas G.	5
Figura 4. Septina em S. cerevisiae.	6
Figura 5 - Ilustração esquemática da estrutura primária de septinas.	7
Figura 6. Localização das septinas.	8
Figura 7. Localização de septinas durante a divisão celular em S. cerevisiae	9
Figura 8. Papel das septinas humanas na citocinese.	12
Figura 9. Papel das septinas na sinalização celular.	13
Figura 10. Splicing alternativo em septinas humanas.	14
Figura 11. Subgrupos de septinas humanas.	15
Figura 12. Complexo formado pelas septinas.	17
Figura 13. Estrutura da septina 2 humana e do complexo formado pelas	
septinas 2, 6 e 7 humanas.	18
Figura 14. Alinhamento estrutural entre septinas e outras GTPases.	19
Figura 15. Alinhamento seqüencial de SEPT1-SEPT12.	20
Figura 16. Análise dos resíduos presentes no sítio ativo de SEPT2.	21
Figura 17. Estrutura de SEPT2·GppNHp.	22
Figura 18. Cristais de septina 6.	86
Figura 19. Cristais obtidos a partir do refinamento descrito na tabela VII.	87
Figura 20. Cristais de SEPT8GC.	89

Figura 21. Resultado do <i>screening</i> de solubilidade com as septinas 6 (SEPT6G	
e SEPT6GC) e 8 (SEPT8I e SEPT8GC).	92
Figura 22. Estrutura de septinas humanas 8 e 6.	95
Figura 23. Cristal obtido em testes iniciais de cristalização com os	
domínios GTPase+C-terminal da septina 8 humana.	97
Figura 24. Resultados de SAXS	98
Figura 25. Purificação de septina 6.	99
Figura 25. Ensaio de ligação de septina 6 ao GMP.	100
Figura 26. Espectro de dicroísmo circular de SEPT6G purificada com e sem GTP.	102
Figura 27. Desnaturação térmica de SEPT6GC purificada com e sem GTP.	103
Figura 28. Triptofano presente na estrutura da septina 2.	104
Figura 29. Experimento de microscopia eletrônica de transmissão.	106
Figura 30. Microscopia eletrônica de transmissão.	107

Lista de tabelas

TABELA I. Proteínas constituintes do anel de actomiosina.	4
TABELA II – Localização e função das septinas.	7
TABELA III. Septinas em organismos modelos.	16
TABELA IV. Resumo dos testes realizados com SEPT6, SEPT8 e SEPT10.	78
TABELA V. Refinamento I de cristais de SEPT6I.	79
TABELA VI. Condições de refinamento de SEPT6I.	80
TABELA VII. Refinamento de SEPT6G.	81
TABELA VIII. Refinamento I de SEPT8GC.	83
TABELA IX. Concentrações dos aditivos utilizados no Screening de solubilidade.	86
TABELA X. Amostras analisadas por MET.	97

Resumo

Para que a divisão celular ocorra é necessário que uma célula passe por algumas etapas que possibilitem esta divisão. Ao conjunto destes processos denomina-se ciclo celular. A regulação espacial e temporal destes processos é fundamental para a preservação celular e do material genético. Falha neste processo pode levar à morte celular ou a alterações genéticas causando divisão desregulada e crescimento de tumores.

Dentre diversas proteínas envolvidas no ciclo celular, encontram-se as septinas. Até o momento, foram encontrados em humanos 14 diferentes genes para septinas. Septinas são proteínas ligadoras de GTP, primeiramente caracterizadas em leveduras, que estão associadas a eventos biológicos importantes em eucariotos.

Neste trabalho foram selecionadas três septinas humanas para estudos funcionais e estruturais: septina 6, septina 8 e septina 10. Nossos resultados deram origem a três artigos que descrevem: I) estratégias de clonagem, expressão, purificação e caracterização preliminar da septina humana 8; II) a capacidade das septinas 2, 6, 8 e 11 em ligar e hidrolisar GTP, mas com diferentes níveis de atividade GTPásica, sendo a septina 2 humana capaz de hidrolizar GTP mais rapidamente que as demais septinas e III) a interação entre a septina 10 humana e a proteína *Promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF), cuja expressão em linhagens celulares hematopoiéticas resultam na supressão do crescimento e interrupção do ciclo celular. A interação da septina 10 com a proteína PLZF foi confirmada *in vitro* por experimento de *pull-down* e a localização celular da septina 10 mostra que esta septina é expressa no citoplasma da célula.

Além disso, resultados preliminares mostram a relação da ligação de GTP e formação de filamentos pela septina 6 e diversas estratégias para a cristalização das septinas estudadas como: *micro-seeding*, *streak-seeding*, variações de pH, precipitantes e aditivos, metilação de lisinas e *screening* de tampões, cujos resultados não foram satisfatórios para a resolução de uma estrutura de septina humana.

Summary

A cell passes through some steps to enable for cell division and all these processes are called Cell Cycle. The spatial and temporal regulation of this process is crucial to maintaining cellular and genetic material. Failure in this process can lead to cell death or genetic changes causing division and unregulated growth of tumors.

Among several proteins involved in cell cycle, there are the septins. To date, 14 different human genes coding for septins were found. Septins are GTP binding proteins first characterized in yeast, which are associated with important biological events in eukaryotes.

In this study we selected three human septins to study functionally and structurally: septin 6, septin 8 and septin 10. Our results led to three articles that describe: i) strategies for cloning, expression, purification and preliminary characterization of human septin 8; ii) the ability of septin 2, 6, 8 and 11 to bind and hydrolyze GTP, but with different levels GTPase activity, human septin 2 is capable of hydrolyzing GTP faster than the other septins and III) the interaction between the human septin 10 and promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF), whose expression in hematopoietic cell lines results in growth suppression and cell cycle arrest. The interaction between septin 10 and PLZF was confirmed by *in vitro pull down* assay and the cellular localization of septin 10 shows that this septin is expressed in the cell cytoplasm.

Furthermore, our studies preliminary results show the relation of GTP binding and filament formation of the septin 6 and several strategies for the crystallization of septins as micro-seeding, streak-seeding, variations in pH, precipitants and additives, methylation of lysine and screening of buffers, but the results were not satisfactory for the resolution of a human septin structure.

I. INTRODUÇÃO

1. Ciclo celular em eucariotos

O ciclo celular compreende uma série de eventos pelo qual uma célula passa durante a divisão celular e é formado pelas fases S e M. Durante a fase S, também chamada fase de síntese de DNA, ocorre duplicação do genoma. Na fase M, ocorre segregação cromossomal, divisão nuclear (mitose) e divisão citoplasmática (citocinese). As células somáticas contêm fases adicionais denominadas "fases de intervalos", conhecidas como G1, que conecta o término da fase M ao início da fase S do próximo ciclo e a fase G2 que separa as fases S e M (Figura 1).



Figura 1. Representação do ciclo celular. Ciclo celular típico (células somáticas) que pode ser dividido em quatro fases sequênciais: G1, S, G2 e M.

Devido a sinais ambientais, células em G1 podem, temporariamente ou permanentemente, deixar o ciclo celular e entrar numa fase quiescente denominada G0. Sinais extracelulares e informações intrínsecas determinam quando as células devem entrar no ciclo de divisão. Em geral,

sinais externos afetam está decisão apenas na etapa G1, a partir da progressão do ciclo celular o controle é realizado intrinsecamente pela maquinaria do ciclo celular e seus componentes básicos são conservados em todos os eucariotos (Van den Heuvel, 2005).

No final da fase M ocorre a divisão citoplasmática cujo objetivo final é comum a todos os organismos: separar fisicamente a célula-mãe em duas células-filhas. O mecanismo pelo qual isto acontece difere entre os organismos, mas os eventos principais são universais (Figura 2).



Figura 2. Mecanismo geral da citocinese em eucariotos. Apesar de o processo resultar na divisão física de uma célulamãe em duas células-fílhas, os acontecimentos que ocorrem para a divisão celular diferem entre os vários organismos. A – Plantas superiores, após a separação do núcleo, direcionam vesículas para a região equatorial da célula. As vesículas se fundem para formar o fragmoplasto, que através da fusão contínua de vesículas, cresce até o córtex celular construindo uma barreira entre as células filhas chamada parede celular. B, C, D – Fungos e células animais se dividem através da formação de um anel contrátil de actomiosina. B – Em células de leveduras que se multiplicam por brotamento, o anel é posicionado na interface entre a célula mãe e o broto em crescimento. C e D – Em leveduras que se dividem por divisão celular e células animais, o anel contrátil é formado no centro da célula. Em leveduras ocorre a formação de um septo de divisão próximo à borda anel contrátil, que é eventualmente degradado, resultando na divisão celular. D – Em animais, o anel de actomiosina se contrai, gerando uma barreira entre a região citoplasmática das duas células filhas. O ingresso da maquinaria contrai componentes do eixo mediano em uma estrutura conhecida como sulco de clivagem.

<u>Introdução</u>

Nas células animais, o sítio de divisão celular é primeiramente escolhido e subsequentemente, a maquinaria de clivagem é montada no sítio de divisão. A maquinaria de divisão contém actina, miosina e outras proteínas que se organizam em um anel contrátil denominado anel de actomiosina. Este anel se contrai gerando uma barreira entre a região citoplasmática das duas células filhas. O ingresso da maquinaria contrai componentes do eixo mediano em uma estrutura conhecida como sulco de clivagem. O evento final da citocinese compreende a separação das duas células-filhas com o corte e ligação da região de divisão pela maquinaria de divisão celular (Figura 2D) (Guertin *et al*, 2002).

Embora a escolha do sítio de clivagem compreenda mecanismos distintos entre leveduras e células animais, a formação do anel de actomiosina é essencial para a citocinese em ambos. A presença de actina e miosina são fundamentais na composição deste anel. No entanto, outras proteínas, como algumas proteínas G, são necessárias para a sua montagem (Tabela I).

1.1 Proteínas G

As proteínas G compartilham um cerne estrutural comum e uma identidade de sequência significante, sugerindo que estas proteínas tenham uma origem evolucionária comum (Bourne *et al*, 1990; Kjeldgaard *et al*, 1996). Proteínas G ligam e hidrolisam nucleosídeos trifosfatos e são cruciais para quase todos os aspectos da vida.

Estruturalmente, o enovelamento do domínio de ligação ao nucleotídeo de guanina das proteínas G consiste de uma folha β central composta de seis fitas rodeada por hélices α . Os cinco loops que formam o sítio de ligação ao nucleotídeo de guanina são os elementos mais conservados neste domínio e definem a superfamília de proteínas G. O cinco loops são designados G-1 à G-5 (Kjeldgaard *et al*, 1996) (Figura 3).

Família	Nome da proteína	Organismos
Cadeia pesada de Miosina II	Myo2	D. discoideum
	myo2	S. pombe
	myo3/myp3	S. pombe
	Miosina II	Echinoderm embryos
	MYO1	S. cerevisiae
Miosina RLC	RMLC	D. discoideum
	rlc1	S. pombe
	Spaghetti squash	D. melanogaster
Miosina ELC	ELC	D. discoideum
	cdc4	S. pombe
	MLC1	S. cerevisiae
Septina	CDC3, -10, -11, 012	S. cerevisiae
	Peanut, Sep1, Sep2	D. melanogaster
	Nedd5, H5, Diff6	Camundongo
	Spn1-6	S. pombe
	Unc-59, unc-61	C. elegans
Proteína Cdc15-like	cdc15	S. pombe
	imp2	S. pombe
	HOF1/CYK2	S. cerevisiae
	PSTPIP/PSTPIP2	Camundongo
IQGAP	IQGAP	Bovinos
	IQGAP1	Humano
	CYK1/IQG1	S. cerevisiae
Pequenas GTPase	Rho	X. laevis, camundongo, echinoderm
	Cdc42	X. laevis
	racE	D. discoideum
Formina	Diaphanous	D. melanogaster
	BNI1	S. cerevisiae
	cdc12	S. pombe
	sepA	A. nidulans
	cyk-1	C. elegans

TABELA I. PROTEÍNAS CONSTITUINTES DO ANEL DE ACTOMIOSINA

Fonte: Guertin et al, 2002



Figura 3. Estrutura de proteínas G. Primeira proteína G cuja estrutura foi resolvida em 1988: Fator de elongação EF-TU de *Escherichia coli* (PDB ID:1ETU, La cour et al, 1985). Observar o cerne conservado e formado por seis fitas rodeada por hélices- α . Regiões conservadas do domínio GTPase G1-G5 estão destacadas em azul.

O loop de ligação ao nucleosídeo (P-loop ou G1 box), possui a sequência consenso de GXXXXGK(S/T), conecta a fita β 1 à helice α 1 e interage com os fosfatos α e β do nucleotídeo de guanina. A conexão entre a hélice α 1 e a fita β 2 (G-2) contém um resíduo de treonina envolvido na coordenação do ion Mg²⁺. A sequência DXXG (G-3) localiza-se no N-terminal da hélice α 2 e liga os subsítios para a interação do íon Mg²⁺ e o fosfato γ do GTP. O reconhecimento do anel de guanina é realizado, em parte, pela sequência conservada NKXD (G-4) que liga a fita β 5 à hélice α 4. G-5 está localizado entre a β 6 e a hélice α 5 e estabiliza G-4 (Figura 3).

A superclasse GTPase das proteínas G pode ser dividida em duas classes: TRAFAC (*translation factor related*) e SIMIBI (*signal recongnition particle, MinD and BioD*). A classe TRAFAC inclui enzimas envolvidas na tradução (iniciação, elongação, e fatores de liberação), transdução de sinais, mobilidade celular e transporte intracelular (Leipe *et al*, 2002). Dentro da superfamília de fator de tradução encontramos uma família de proteínas denominada septinas.

2. Septinas

Septinas compreendem uma família de proteínas assim denominadas devido ao seu papel na septação e divisão celular. Foram primeiramente observadas no sítio de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 4) (Hartwell, 1971) e são encontradas em fungos, animais e microsporídeos. Apesar do genoma de *Chlamydomonas* codificar um gene relacionado às septinas, estas proteínas estão ausentes em plantas. O número de diferentes septinas em cada organismo varia desde duas septinas em *Caenorhabditis elegans* a catorze em humanos (Weirich *et al*, 2008).



Figura 4. Septina em *S. cerevisiae*. Septinas (em verde) no sítio de divisão celular em *S. cerevisiae*. Fonte: Philippsen Lab, Biozentrum Basel. Barra: 10 μm.

As septinas possuem massa molecular entre 40 e 60 kDa, possuem os domínios N e C-terminal variáveis e um domínio central conservado característico de GTPases. Na porção C-terminal existe a presença de um domínio coiled-coil que pode estar envolvido em interações proteína-proteína (Longtine *et al.*, 1996) (Figura 5).



Figura 5 - Ilustração esquemática da estrutura primária e de domínios das septinas.

As septinas estão envolvidas em processos tais como: citocinese, formação de barreiras de difusão, manutenção e determinação da polaridade celular, movimento celular, tráfico vesicular, exocitose e apoptose (Hall & Russel, 2004; Martinez & Ware, 2004).

As septinas se localizam na célula basicamente em três regiões principais: (a) projeções celulares; (b) partições entre células; (c) por toda a célula (na periferia ou citoplasma) em padrões filamentosos ou pontuais (Figura 6).

Dados experimentais parecem sugerir uma relação entre a função e a localização das septinas (Tabela II).

TABELA II - LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO DAS SEPTINAS

Localização	Função
Projeções celulares	Barreira de difusão
	Coordenação do ciclo celular
Partições	Compartimentalização do citoplasma
	Coordenação do ciclo celular
Periferia celular ou citoplasma em padrões pontuais	Tráfego de membranas,
	Desenvolvimento de organelas
Periferia celular ou citoplasma (filamentos)	Co-localização com actina ou tubulina
• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	Organização do cito-esqueleto ou são organizadas por ele

(Lindsey e Momany, 2006).



Figura 6. Localização das septinas. As septinas se localizam em três regiões principais na célula de fungos e animais. (a) na ponta, na base ou em toda a projeção celular; (b) em partições entre células e (c) na periferia celular, por todo o citoplasma ou em padrões filamentosos ou pontuais no citoplasma. Fonte: Lindsey e Momany, 2006 com modificações.

O papel das septinas na manutenção e determinação da polaridade celular, citocinese, formação de barreiras de difusão, sinalização celular será detalhado nos tópicos seguintes.

2.1. Septinas na polaridade celular

O papel das septinas na polaridade celular em leveduras é evidente. Nestes organismos, as septinas contribuem para os eventos de polarização celular e delimitam onde ocorrerá o crescimento do broto no processo de divisão celular (Figura 7A).



Figura 7. Localização de septinas durante a divisão celular em *S. cerevisiae*. A – Anel de septinas no broto incipiente B – C – duplo anel de septinas, um anel por célula filha D – O anel de septinas se matem visível por um período após a citocinese. Fonte: Longtine *et al*, 1996 com modificações.

Em leveduras, septinas são recrutadas para o sítio de crescimento do broto onde polimerizam e formam uma rede bem ordenada de filamentos, os anéis de septina (Byers & Goetsch, 1976; Hartwell, 1971; Longtine *et al*, 1996). Temporalmente, a montagem deste anel está associada especificamente aos sinais da fase G1 e é regulado por moduladores de sinais *Ras like* (Gladfelter *et al*, 2002; Longtine & Bi, 2003).

Em *S. cerevisiae*, um anel de septina forma-se no futuro sítio de brotamento aproximadamente 15 minutos antes que a emersão do broto seja observada (Ford & Pringle, 1991; Haarer & Pringle, 1987; Longtine *et al*, 1996). Com o progresso do processo de brotamento, as septinas passam a ter um papel essencial na citocinese.

O anel de septinas persiste durante o ciclo celular, atuando na localização apropriada de muitas proteínas necessárias para o crescimento polarizado da membrana, posicionamento do fuso, citocinese, síntese da parede celular e a seleção de novo sítio de crescimento do broto após a divisão celular (Faty *et al*, 2002; Gladfelter *et al*, 2001, Kusch *et al*, 2002).

2.2 Septinas na citocinese

As septinas são necessárias para uma citocinese apropriada tanto em fungos quanto em animais. Seu papel na citocinese parece estar dividido em duas etapas: no início, as septinas funcionam como um esqueleto para o recrutamento e estabilização da maquinaria contrátil; já no término da citocinese, as septinas ajudam a limitar os fatores associados à membrana à região de clivagem através da formação das barreiras de difusão (Scmidt & Nichols, 2004a; Scmidt & Nichols, 2004b, Caudron & Barral, 2009).

Com o progresso do brotamento, o anel de septinas estende-se em células filhas e forma uma estrutura similar a uma ampulheta que é usualmente descrita como colar (Figura 7 B-C). O colar passa de um estado fluído, onde existe troca das subunidades de septinas que formam o anel, para um estado congelado durante as fases S, G2 e M, onde as subunidades das septinas são estáveis (Caviston *et al*, 2003; Dobbelaere *et al*, 2003). Estudos ultraestruturais sugerem a possibilidade dos filamentos de septina serem mais compactos no estado congelado (Rodal *et al*, 2005).

O estado congelado nos estágios G2/M do ciclo celular de leveduras favorece a função das septinas como barreiras de difusão para a compartimentalização da membrana celular (Caviston *et al*, 2003; Dobbelaere *et al*, 2003).

Durante a citocinese, com a contração do anel de actomiosina, o anel de septinas é quebrado e

seu estado torna-se fluído novamente (Dobbelaere *et al*, 2003; Lippincott *et al*, 2001). O anel de septinas rompido adquire um estado congelado novamente e depois é desmontado para que suas subunidades estejam disponíveis na fase G1 para o próximo ciclo celular.

O período de alternância entre estados fluídos e congelados permite que o anel de septinas altere sua forma de acordo com as mudanças na morfologia do broto durante a sua emergência e citocinese (Douglas *et al*, 2005). Esta troca é coordenada por proteínas quinases e fosfatases, o que indica que o estado de fosforilação das septinas pode regular a polimerização em estruturas bem ordenadas (Dobbelaere *et al*, 2003). Nas células de mamífero, os filamentos e anéis contendo septina 2 são estruturas altamente dinâmicas que exibem rápida troca com moléculas de SEPT2 citoplasmática (Schimidt & Nichols, 2004b).

Septinas de mamíferos se localizam não apenas na membrana plasmática, mas também no citoplasma com o microtúbulo e citoesqueleto de actina (Figura 8). Estudos sugerem que as septinas de mamíferos funcionam como um esqueleto para a ligação de proteínas ligadoras do citoesqueleto (Spiliotis & Nelson, 2006).

O anel serve como um molde para a organização de miosina tipo II, Myo1, em um segundo anel (Epp & Chant, 1997; Bi *et al*, 1998; Lippincott & Li, 1998). A estrutura da miosina é requerida para o recrutamento de filamentos de actina durante a mitose para formar o anel contrátil de actomiosina (Bi *et al*, 1998). A contração deste anel permite que a citocinese aconteça (Bi *et al*, 1998; Lippincott & Li, 1998). As septinas não são requeridas para a manutenção do anel de actomiosina durante a citocinese e sua subsequente contração, mas são necessárias para a sua correta excisão (Dobbelaere & Barral, 2004).



Figura 8. Papel das septinas humanas na citocinese. Septina 2 humana (verde) colocalizando com a actina (vermelho) (A) Fonte: Scmidt & Nichols, 2004b.

Proteínas adicionais, como algumas quinases dependentes de septinas, estão associadas com o anel de septinas e serão detalhadas no tópico seguinte.

2.3 Septinas na sinalização celular

Em leveduras, septinas recrutam e ativam quinases dependentes de septinas (SDKs) (Barral *et al*, 1999, Hanrahan & Snyder, 2003; Keaton & Lew, 2006), que promovem a sinalização a partir de septinas para outros fatores regulados por elas. SDKs atuam como sensores para a correta montagem do colar de septinas sobre o sítio de crescimento do broto e para sinalizar o posicionamento do microtúbulo durante o eixo de crescimento.

As quinases Hsl1 e Gin4 (*Growth inhibitory protein 4*) interagem fisicamente com as septinas e são estritamente dependentes da localização e atividade das septinas para sua função (Carroll *et al*, 1998; Longtine *et al* 1998a, Barral *et al*, 1999). Por isso são chamadas de quinases dependentes de septinas. Hsl1, e possivelmente Gin4, estão envolvidas no controle da transição da fase G2 para M (Barral *et al*, 1999).

As proteínas Nim1 (Mitosis inducer protein kinase cdr1) e MARK (microtubule affinity

regulatory kinase), encontradas em *S. pombe* e eucariotos superiores (Kanoh & Russel, 1998; Barral *et al*, 1999), são homólogas de SDKs e estão envolvidas com o controle da dinâmica do microtubulo (Drewes *et al*, 1998; Barral *et al*, 1999) e posicionamento do eixo (Guo & Kemphues, 1995). Com base nesta homologia, Hsl1 e Gin4 podem também ter função relacionada às das proteínas Nim1 e MARK.

O papel das septinas na sinalização celular para a coordenação dos eventos nucleares e citoplasmáticos na divisão celular está esquematizado na figura 9. As septinas estão envolvidas em pelo menos três processos independentes: (1) recrutamento de Bnr1 e Myo1 (*Type II myosin*), proteínas envolvidas com a citocinese; (2) recrutamento e ativação de Hsl1 e Gin4 e (3) captura dos microtúbulo dependente de kar9 (*Karyogamy protein*). A captura e contração do microtúbulo são necessárias para o posicionamento do eixo relativo ao aparato de clivagem. Após a correta segregação cromossomal, a rede de sinais para a saída da mitose (MEN) induz a citocinese.



Figura 9. Papel das septinas na sinalização celular. Três processos independentes que são dependentes de septinas e induzem a citocinese: (1) recrutamento de Bnr1 e Myo1; (2) recrutamento e ativação de Hs11 e Gin4 e (3) captura dos microtúbulo dependente de kar9.

2.4 Septinas Humanas

Existem 14 septinas humanas, denominadas SEPT1-14, que são expressas em todos os tecidos. Algumas septinas mostram uma super expressão no tecido linfóide (SEPT1, 6 e 9) ou no sistema nervoso central (SEPT3, 4, 5, 7, 8, 11) (Hall *et al.*, 2005). Muitos genes de septinas geram um ou mais polipeptídeos por *splicing* alternativo e/ou múltiplos sítios de iniciação da tradução. O número de variantes ainda não está estabelecido para muitos dos genes (Kinoshita, 2003), sendo que algumas variantes de *splicing* alternativo parecem ser tecido específico (SEPT8 e 11) (Hall *et al.*, 2005) (Figura 10).



Figura 10. *Splicing* alternativo em septinas humanas. Organização gênica da septina 8 humana capaz de gerar diferentes transcritos que codificam para proteínas com massas moleculares distintas e são expressas em diferentes regiões do organismo. Fonte: Bläser *et al.*, 2003

Segundo Hall *et al* (2005), as septinas humanas podem ser divididas em quatro grupos de acordo com a sua estrutura primária. A figura 11 mostra a divisão dos grupos feita através do alinhamento e comparação de suas estruturas primárias com o programa *ClustalW2* (Larkin *et al*, 2007). As septinas selecionadas para este estudo pertencem ao grupo II das septinas: grupo de septinas com domínio C-terminal extenso.



Figura 11. Subgrupos de septinas humanas. Filograma obtido através de alinhamento das seqüências primárias com o programa *ClustalW2* (Larkin *et al*, 2007), mostrando a relação de grupos entre as septinas humanas.

Análise filogenética de todas as septinas que possuem sua sequência conhecida sugere a divisão em cinco grupos baseados na sua similaridade sequencial: grupos I e II alocam septinas encontradas em fungos e animais, grupos III, IV e V, septinas encontradas apenas em fungos (Weirich *et al*, 2008) (Tabela III).

A expansão do número de septinas nos grupos IA, IB e IIA aliado à diversificação da função das septinas em mamíferos, como funções especializadas em células que não estão em processo de divisão celular, sugerem que estas proteínas fornecem uma ampla gama de funções organizacionais (Weirich *et al*, 2008).

Dentre as funções especializadas das septinas humanas em células que não estão em processo de divisão celular podemos citar o papel das septinas 2, 4, 5, 6, 7 na exocitose e tráfego vesicular (Hsu *et al*, 1998) e a capacidade de um transcrito de SEPT4 denominado ARTS de induzir apoptose (Larish *et al*, 2000). Devido ao seu papel em processos importantes como ciclo celular, apoptose e tráfego vesicular, o mau funcionamento das septinas pode estar associado a doenças auto-imunes, crescimento de tumores (Ihara *et al*, 2007) e doenças neurodegenerativas (Ihara *et al*, 2003; Kuhlenbaumer *et al*, 2005).

Organismo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo IIB	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
U	IA	IB	IIÂ	•	•	•	-
Saccharomyces	Cdc10	-	Cdc3	-	Cdc11	Cdc12	-
cerevisiae					Shs1	Spr3	
Schizosaccharomyces	Spn2	_	Spn1	_	Spr28	Spn4	_
nomhe	Spliz		Spiri		Spn5	Spn4 Spn6	
poniec					Spn7		
Candida albicans	Cdc10	-	Cdc3	-	Cdc11	Cdc12	-
					Sep7	Spr3	
					Spr28		
Eremothecium 	Нур3	-	Hyp1	-	Hyp4	Hyp2	-
gossypu					Hyp6	Нур5	
	4 D		4 D		Нур/		
Aspergillues nidulans	AspD	-	AspB	-	AspA	AspC	AspE
Neurospora crassa	Нур3	-	Hyp1	-	Hyp4	Hyp2	Hyp5
		UNICC1		LINCSO			нуро
Caenonabaitis elegans	-	UNCOI	-	UNCSY	-	-	-
Drosophila	-	SEP2		Pnut	-	-	-
melanogaster		SEP5		SEP1			
V I ·	TT 1			SEP4			
Xenopus laevis	Hyp1	-	-	SEP12	-	-	-
Maniferos	SEP13	SEP16	-	SEPTI	-	-	-
	SEPT9	SEPT8		SEPT2			
	SEPT12	SEPT10		SEPT4			
		SEPT11		SEPT5			
		SEPT14		SEPT7			
				SEPT13			

TABELA III. SEPTINAS EM ORGANISMOS MODELOS

Fonte: Weirich et al, 2008.

Estudos mostram que a septinas humanas podem formar homo- e hetero-filamentos de septinas (Figura 12 A e E). A estrutura de complexos de septina de diferentes organismos parece ser conservada.

Quando observado por microscopia eletrônica, complexos de septina aparecem como filamentos de 7-9 nm em largura e diferentes comprimentos (Frazier *et al*, 1998, Field *et al*, 1996; Field & Kellogg, 1999). Filamentos formados por septinas de Drosophila mostram uma periodicidade de 26 nm no comprimento (Figura 12C), indicando que estes filamentos são possivelmente formados por um complexo compreendido de duas cópias de cada uma das três septinas presente neste organismo (Fied *et al*, 1996).

Em leveduras, as subunidades formadoras de filamentos de septinas têm 32 nm de comprimento (Figura 12B e D), em ratos, 25 nm e em humanos, 32 nm (Figura 12A), de acordo com dados de miscroscopia eletrônica (Hsu *et al*, 1998, Sirajuddin *et al*, 2007).



Figura 12. Complexo formado pelas septinas. A – humanas (sept2, sept6 e sept7, B e D – leveduras (Cdc3, Cdc 12, Cdc11 e Cdc 10), C – Drosophila (Put, sep1 e sep1) e E – septina humana 2.

Com a resolução da estrutura da septina 2 humana (Figura 13A) e de um complexo composto pelas septinas humanas 2, 6 e 7 (Figura 13B) (Sirajuddin et al, 2007) foi possível verificar que a interação entre as septinas ocorre por duas interfaces distintas: uma interface composta pelo N- e C-terminal (interface NC) e outra pelo domínio GTPase (interface G) (Figura 13). Na estrutura resolvida foram encontradas moléculas de GDP ligadas às septinas 2 e 7, e no sítio de ligação da septina 6 encontrou-se uma molécula de GTP.



Figura 13. Estrutura da septina 2 humana e do complexo formado pelas septinas 2, 6 e 7 humanas. Fonte: Sirajuddin *et al*, 2007.

Apesar dessas duas possíveis interfaces, foi verificado que em solução a septina 2 humana se dimeriza atravé da interface G, similarmente à outras GTPases da classe TRAFAC.

O Alinhamento seqüencial e estrutural de SEPT2, SEPT6 e SEPT7 com outras GTPases, mostra que as septinas possuem os motives ligadores de nucleotídeos denominados: G1, G2, G3, G4, G5 (Figura 14 e 15). Estas regiões são críticas para a troca de GTP por GDP, mudanças conformacionais induzidas por GTP e hidrólise de GTP (Bourne *et al*, 1991).



Figura 14. Alinhamento estrutural entre septinas e outras GTPases. H-Ras (PDB ID:1QRA, Scheidig et al, 1999), Elongation factors Tu (PDB ID:1OB2, Nielsen et al, 2009)ref??) and G (PDB ID:1DAR, Al-karadaghi et al, 2006), SEPT2, 6 and 7 (PDB ID:2QAG, Sirajuddin et al, 2007).

A região G1 dispõe de um *loop* que interage com os fosfatos α e β de GTP e GDP. Esta região, também conhecida como P-loop, é bem conservado entre todas as GTPases. As 14 septinas humanas possuem a seqüência conservada G1: G(E/Q)(S/T)G(I/L)GKST. Através da estrutura de SEPT2 de camundongo (PDB ID: 3FTQ) é possível verificar que os fosfatos β

e γ são cercados pelo motivo P- loop (GxxxGKS/T). Os resíduos, Lys-50 e Ser-51, estão em contato com os fofatos β e γ e o íon Mg²⁺, respectivamente. A Thr-52, que é totalmente invariável em septinas e faz uma ligação de hidrogênio com o fosfato α (Figura 16).

O subgrupo II das septinas humanas é o único grupo que possui um resíduo de treonina em vez de um resíduo de serina na seqüência do P-loop. Exceto pela septina 6, este grupo é também o único que tem um resíduo de isoleucina em vez de uma serina na seqüência P-loop (Figura 15). No entanto, apesar das mutações encontradas no subgrupo II as características químicas do P-loop são preservadas.



Figura 15. Alinhamento seqüencial de SEPT1-SEPT12. As caixas indicam as regiões conservadas G1-G5.



Figura 16. Análise dos resíduos presentes no sítio ativo de SEPT2. Detalhes do sítio de ligação ao nucleotídeo, mostrando GppNHp e os resíduos ao redor.

G2 inclui o N-terminal da segunda fita β do domínio GTPase e o loop que a precede. Em algumas proteínas G, a ligação de GTP modifica a conformação deste loop, em parte por mudar a orientação de um resíduo de treonina que constitui o domínio G-2 (Bourne *et al*, 1991). Este resíduo é importante para posicionar o íon Mg²⁺, que é indispensável para a hidrólise por outras proteínas G. Na seqüência das septinas humanas 2 e 7 observa-se a presença de um resíduo de treonina em G2, mas esse resíduo não está visível na estrutura tridimensional destas proteínas (PDB ID = 2QAG, 2QNR, 2QA5). Já a septina 6 e outras septinas do subgrupo II como SEPT8, SEPT10 e SEPT11 não possuem este resíduo importante para o posicionamento do íon Mg²⁺ (Figura 15).

A sequência G3 em septinas humanas, possui o motivo conservado D(T/A)(P/V)G(F/Y)GD, sendo o primeiro aspartato deste domínio não encontrada na septina 6 e 10.

Recentemente a estrutura de ∆NSEPT2 de camundongo complexada a um nucleotídeo G modificado, GppNHp, foi resolvida com resolução máxima de 2.9 Å. Em contraste com as estruturas de septinas humanas, as regiões G2 e G3 estão ordenadas e visíveis e um íon de magnésio é observado.

Embora a estrutura geral de septina ligada a GTP e GDP pareça semelhante, a sobreposição das estruturas revela diferenças importantes (Figura 17). Considerando que as hélices α permanecem inalteradas, a folha β central mostra uma diferença angular de $\approx 20^{\circ}$. O maior efeito é sobre as fitas β 2 e β 3, que estão inclinadas em 20 ° no que diz respeito às fitas da estrutura com GDP (Figura 17).

Há um movimento parcial da metade N-terminal de β 1 para manter a ligação de hidrogênio com β 3. Devido à β 2 e β 3 estarem em estreita proximidade com as regiões *switch* (G2 e G3), e porque as estruturas de SEPT2 e Δ NSEPT2 ligadas a GDP (PDB ID: 2QNR) não exibem essa diferença angular, o fosfato γ , e não a exclusão do N-terminal, parece ser a força motriz para a torção de fitas β (Figura 17).

Thr-78 em G2 coordena o íon Mg^{2+} e forma uma ligação de hidrogênio com o fosfato γ . Esta treonina (Thr-78), juntamente com a glicina invariante (Gly-104) do motivo G3, mediam o mecanismo de *switch* universal.



Figura 17. Estrutura de SEPT2·GppNHp. (A) Modelo de SEPT2 dimerizada através do sítio de ligação de nucleotídeo. Os novos elementos observados estão marcados. GppNHp e íon Magnésio estão coloridos em marrom. (B) Sobreposição de SEPT2·GppNHp (laranja) com estruturas prévias de SEPT2·GDP [PDB ID: 2QA5 (ciano) e 2QNR (cinza). Fonte: Sirajuddin M *et al*; 2009.
A região G4 estabiliza o anel de guanina do GTP/GDP e possui a seqüência conservada AKAD. O aspartato deste motivo é o elemento mais importante na especificidade guanina-versus-adenina. A região G5, P(F/L)(A/S)V(I/V)G, é responsável por estabilizar a região G4.

Apesar de existirem estruturas tridimensionais de septinas humanas (PDB ID = 2QAG, 2QNR, 2QA5, 3FTQ), a resolução destas estruturas não fornece informações sobre alguns átomos que são essenciais para interação com nucleotídeo, tornando difícil garantir quais mudanças na conformação ocorrem quando a GTP ou GDP estão ligados às septinas e o papel de todos os resíduos presentes na interface de ligação de nucleotídeos, incluindo os resíduos que desempenham um papel importante na catálise de septinas.

Desta forma a resolução de novas estruturas de septinas a mais alta resolução, ensaios de atividade GTPásica e ensaios que visam compreender o comportamento das septinas *in vivo* se fazem necessários para o melhor conhecimento da função destas proteínas em humanos.

II. OBJETIVOS

Os objetivos gerais são o estudo funcional e estrutural das septinas humanas 6, 8 e 10. Como objetivos específicos têm-se:

- I. Clonagem e a expressão de construções dos genes *sept6*, *sept8* e *sept10*; purificação das proteínas que forem expressas na forma solúvel para estudos estruturais (dicroísmo circular, espalhamento dinâmico de luz, difração de raios X, emissão de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão).
- II. Testes de atividade do domínio GTPase das septinas 2, 6, 8 e 11.
- III. Ensaio de duplo híbrido para verificar parceiro de interações com a septina 10.

III. RESULTADOS

3.1 Artigo I:

Overexpression, purification and oligomerization studies of human septin 8 Souza, T.A.C.B^{1, 2} & Barbosa, J.A.R.G²

Institute of Biology CP 6109, State University of Campinas – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, SP, 13083-970, Brazil.

Abstract

Mammalian septins comprise a family of 14 genes that encode GTP-binding proteins involved in important cellular processes such as cytokinesis and exocytosis. Expression of three different constructions encoding human septin 8 were analyzed and the results show that SEPT8GC, a clone expressing the conserved domain plus C-terminal domain of human septin 8 yields the highest amount of recombinant protein. A screening among different buffers shows that SEPT8GC purified in a solution containing 10 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂ and 40 μ M of GTP has a lower degree of aggregation. This protein was purified by affinity and gel filtration chromatography. CD spectrum of SEPT8GC is characteristic of folded proteins and it presents a transition profile with a T_m of 54 °C. Fluorescence emission spectra, analytic gel filtration and DLS reflect the sample oligomeric heterogeneity with the predominance of dimers in solution. Homology models indicate clearly that the preferred dimer interface is the one comprising the GTP binding site.

Keywords: SEPT8; septin 8; purification; expression; cell cycle, Homo sapiens

Introduction

Septins are proteins found in fungi, animals and microsporidia that were identified more than 30 years ago in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) [1]. The primary structure of septins is characterized by variable N- and C-termini and a conserved central domain. In the central domain, a P-loop signature allocates septins in the P-loop GTPase family. Septins are members of TRAFAC subclass of P-loop family which is characterized by the substitution of asparagine for an alanine or glicine in the NKXD motif (i.e. AKAD or GKAD) [2].

Humans have 14 septin genes (*sept1-sept14*) that code for proteins with a predicted molecular mass ranging from 40 to 60 kDa. A number of alternative splicing events occur with these 14 septin genes and lead to a much greater number of septin proteins. Septins seem to be essential for cytokinesis, cellular polarity, cellular movement, vesicular traffic, exocytose and apoptosis [3, 4]. In platelets and neurons, septins are related to exocytose [4].

The central domain (GTP binding) is highly conserved with 58% of similarity [3] and shares a minimum of 35% sequence similarity to yeast septins [4]. Based on sequence similarity, human septins can be separated in four groups [3, 5, 6]. Septin 8 belongs to group II constituted by septins with a long C-terminal.

A very important feature of septins that is often related to their functionality is their ability to form stable heteromeric complexes. Filaments and rings have been observed both *in vivo* and *in vitro* [6, 7, 8, 9, 10]. SEPT8's yeast paralog, Cdc3 (Spn1) [5], can self associate [11]. SEPT2 also form dimers in solution [10]. Together, these data indicate that self-association may also occur in group II mammalian septins.

Understanding the molecular mechanism underlying septin oligomerization and ring formation by human septins is important once those proteins are involved in several cell processes and their improper function has been implicated in some pathologies such as Alzheimer's disease [12], Down's syndromes [13, 14], Parkinson's disease [15] and breast [16, 17], ovarian [18], brain [19, 20], and other tumors [21]. The best way for that would be the structure elucidation of homo and hetero-oligomers of human septins; however until now just the tridimensional structures of septin 2 and a trimer composed of septins 2, 6 and 7 are available.

These structures were solve by X-ray crystallography to low resolution and the final models show that the filament in the crystal consists of an assembly of G domains. The N and C-terminal domains are not seen in the structures. The G domains interact with each other via two interfaces: one that contains the GTP binding site, called the G-interface, and another that contains the connections to the N- and C-terminal domains of the protein [10]. The lack of information about the N- and Cterminal domains indicates that they are mobile with respect to the filaments. The C-terminal domains are expected to for coiled coils between monomers of a filament, thus having a role in the stabilization of this superstructure.

Crystals with a diffraction pattern of good quality are not easily obtained, improvement in recombinant protein production are required to overcome this problem. Here we present different strategies to improve recombinant septin expression, its purification and the characterization of a truncate construction of septin 8 by mass spectroscopy, circular dichroism (CD), intrinsic emission fluorescence and gel filtration chromatography. Finally, the oligomerization is analyzed based also on homology models based on the structures available.

Materials and methods

Cloning of genes encoding human septin 8

The coding sequence of three different constructions of human septin 8 (Figure 1) were amplified by PCR using the following oligonucleotide primers: SEPT8I_F (5' GAATTCCGGCGGGGGCTCCGGCTGCGCT), SEPT8I_R (5'CTCGAGTTAATTCTT

CTTGTCCTTGTC), SEPT8GC_F (5' CATATGTCCAGCTTCAACATCCTCTGT, SEPT8GC_R (5' CTCGAGTTAATTCTTCTTGTCCTTGTC), SEPT8G_F (5' CATATGTCCAGCTTCAACATCCTCTGT) and SEPT8R_R

(CTCGAGTTATTGGCCTCGTATGTCTCT) with appropriate restriction sites in their sequences. The PCR reaction was carried using 60°C, 62°C and 64°C as annealing temperatures for *sept8I*, *sept8GC* and *sept8G* amplification respectively. The amplified products were purified using Qiagen Gel extraction kit (Qiagen), cloned into pGEM-T-easy vector and validated by sequencing. The following cloning vectors: sept8I_pGEM, sept8GC_pGEM and sept8G_pGEM were digested by appropriate enzymes and the fragment corresponding to septin sequences were gel extracted and subcloned into pET28a expression vector (Qiagen). Positive clones were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) Δ SlyD cells [22].

Protein expression

The cells were grown in Luria Broth (LB) medium containing kanamicin (100 μ g/mL) at 37 °C, 200 rpm, for 16 h. The aliquots of 5 mL of overnight cultures of *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD cells were used to inoculate 500 mL of the same medium and cells were grown at same conditions until A₆₀₀ ~ 0.7. 1 mL of non-induced cells were aliquoted and expression was induced by adding isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.4 mM into log-phase cultures incubated at 20 °C, 30 °C and 37 °C for 4 hours. The culture incubated at 20°C was grown for 16 hours. Cells were centrifuged for 10 minutes at 2600 g and suspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 % glycerol and 100 μ M GTP (buffer A). The cell suspension was sonicated with Branson Sonifier 450 and the supernatant separated through centrifugation 20000 g for 15 minutes. The supernatant was aliquoted and submitted with non-induced aliquots to SDS-PAGE for solubility analysis.

Purification

After lyses, soluble SEPT8GC was purified by nickel affinity using 1 mL HiTrap Chelating column (Amersham Bioscience) and a FPLC system (Fast Performance Liquid Chromatography - Amersham Bioscience). The column was loaded with 100 mM NiSO₄ and equilibrated with buffer A. For purification a gradient of 0-100 % of the buffer B (buffer A plus 0.5 M imidazol) was used. The fractions from the chromatography were analyzed by SDS-PAGE.

For gel filtration chromatography, the samples from the affinity chromatography containing the protein of interest were concentrated by filtration. The solution was placed on filter Amicon Ultra MWCO 10000 (Milipore) and centrifuged at 4000 rpm at 4 °C until it reached the concentration of 10 mg/mL. The experiment was performed in a FPLC system (Amersham Biosciences), using a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) and a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂ and 5% glycerol. Fractions from chromatography were analyzed by SDS-PAGE.

Sample homogeneity evaluated by DLS analysis was used to screen for the best buffer by varying the constituents of buffer A. 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂ and 40 μ M GTP was chosen as buffer A in further experiments. Purity of proteins was analyzed by SDS-PAGE.

1. Determination of protein concentration

The concentration of SEPT8GC and SEPT8I were determined by UV-vis spectroscopy [23] applying their respective calculated molar absorption coefficients (ϵ_{280}): 0.587 and 0.377 M⁻¹cm⁻¹.

Dynamic light scattering (DLS)

The experiment was conducted on Dynapro Molecular Sizing instrument at 10°C. The samples were previously centrifuged for 20 minutes at 20000g, at 4°C. The data was collected with intervals of

2.5 s with at least 100 acquisitions.

Circular Dichroism (CD)

1. The purified protein was dialyzed against a buffer containing 10 mM NaH₂PO₄ pH 8.0 and 10 mM MgCl₂. The CD measurements were recorded on a Jasco spectropolarimeter Jasco J-715 (Jasco Corporation, Tokio, Japan), at 4 °C with temperature controlled by a Peltier Type Control System PFD 425S. Data were collected from 190 nm to 260 nm with a scan rate of 100 nm/min in 1 mm path length cuvettes. The values obtained in mdeg were converted to molar ellipticity by residue ([θ] MRW), mdeg.cm².dmol⁻¹, as defined by [24].

The thermal denaturation was performed varying the temperature from 4 °C to 90 °C and tracking the CD signal at 222 nm, and getting a spectrum (from 190 nm to 260 nm) to each variation of 10 °C. T_m was the temperature at the midpoint of the unfolding transition.

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were performed in a spectrofluorimeter steady-state K2 ISS coupled to a refrigerator using a 1x1 cm path length cuvette. Excitation of tryptophan was held at 295 nm and emission was measured from 310 to 450 nm. The data was analyzed using ORIGINLAB Data analysis and graphing software (OriginLab, Northampton, MA) and Vinci[™] Multidimensional Fluorescence Spectroscopy (ISS Inc, USA).

Mass Spectrometry (MS-MS)

The proteins in the gel fragments were reduced with 10 mM DTT for 1 h at 56°C and alkylated with 55 mM iodoacetamide for 45 min at room temperature. The reduced and alkylated peptides were digested with 20 ng/µl trypsin (Sequence grade modified, Promega, WI, USA) for 16h at 37°C in 25

mM NH₄HCO₃, pH 8.0. The reaction was stopped by acidification with 5% trifluoroacetic acid (Fluka,-Buchs, Germany). The tryptic peptide digests of the proteins were submitted spectrometer MALDI-QTof Premier (Micromass, Manchester) analysis. The digested protein solution was mixed with an acid solution of matrix a-cyano 4-hydroxycinnamic 5 mg / mL (water: acetonitrile: TFA 1:1:0.01 v / v / v) and applied to the plate. The spectra of PMF (peptide mass fingerprinting) were acquired with the following conditions: the full ratio of mass to charge 800-3000, laser energy 225, collision energy 4.0 eV.

Homology modeling

The alignments were carried out using CLUSTALW [25] and the best alignments were selected based on the alignment score. They were used to construct homology models of SEPT8. For the model building process, default parameters included in the "automodel" class were used. An ensemble of 50 models was built, from which the best final model was selected based on evaluation of the objective function from MODELLER (copyright © 1989-2010 Andrej Sali), which uses the stereo chemical values, and by visual inspection.

Results and discussion

Septin comprises a family of proteins of guanine nucleotide-binding proteins composed of a conserved central core domain (GTPase domain) flanked by N-termini and C-termini. The GTPase domain has 3 characteristic motifs, G1, G3 and G4, which are similar to those of the Ras family. The G4 motif is strictly conserved with a unique septin aminoacid consensus: AKAD. In the C-terminal domain of most septins a coiled-coil region is predicted, which in some cases is necessary for intermolecular interactions [12], [26]. A fundamental problem in studying septins has been the difficulty to express them in bacteria in a soluble and stable form. Studies have been done trying to

overcome this problem and one strategy is the expression of different septins in bicistronic vectors [8].

In this work, three different regions of the coding sequence of human SEPT8: *sept8GC*, *sept8I* and *sept8G* were cloned into pET28a expression vector (Qiagen) and used to transform *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD cells in order to optimize the chance of expression success. The start and end of each domain of septin 8 was chosen based on conserved regions mapped by PFAM [27] and other alignments produced with the amino acid sequence of human SEPT8 (ncbi ID: 27448550). Oligonucleotides were synthesized for the amplification of *sept8I* (corresponding to residues 1-508), *sept8GC* (residues 120-508) and *sept8G* (residues 120-406) based on the *sept*8 sequence (ncbi ID: 27448550, figure 1). We have successfully cloned these three genes in pGEM-T-easy vector, from where they were recovered by *NdeI* and *XhoI* treatment and inserted into the *NdeI* and *XhoI* sites of pET28a to originate sept8GC-pET28a, sept8I-pET28a, sept8G-pET28a expression vectors.



B

RRGSGCARGRAGRGGGRSRGRGQGRLRGFSRRRRQGEFPGSGHIGSI QPQPPGRSASRSRLVPVAAPALVPAHPPGAELAMAATDLERFSNAE PEPRSLSLGGHVGFDSLPDQLVSKSVTQGFSFNILCVGETGIGKST LMNTLFNTTFETEEASHHEACVRLRPQTYDLQESNVQLKLTIVDAV GFGDQINKDESYRPIVDYIDAQFENYLQEELKIRRSLFDYHDTRIH VCLYFITPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNIIPIIAKADTISKSELH KFKIKIMGELVSNGVQIYQFPTDDEAVAEINAVMNAHLPFAVVGST EEVKVGNKLVRARQYPWGVVQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLR EQTHSRHYELYRRCKLEEMGFQDSDGDSQPFSLQETYEAKRKEFLS ELQRKEEEMRQMFVNKVKETELELKEKERELHEKFEHLKRVHQEEK RKVEEKRRELEEETNAFNRRKAAVEALQSQALHATSQQPLRKDKDK

Figure 1. A: Schematic view of three different constructions expressing recombinant human septin 8. SEPT8I - the entire protein, SEPT8G - the construction expressing the central GTPase domain and SEPT8GC - the construction expressing GTPase domain plus C-termini. B: Sequence of human septin 8 (ncbi ID: 27448550). The box encloses the GTPase domain while peptides marked with a gray background correspond to those found by MS fingerprinting.

Expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.4 mM into log-phase cultures and the results show a high level of expression for sept8GC-pET28a, a medium level of expression for sept8I-pET28a and no soluble expression for sept8G-pET28a at all temperature tests (Figure 2). In order to improve the soluble fraction of sept8I-pET28a and sept8G-pET28, other expression tests were performed with GST-fused constructions and other *E. coli* strains: BL21 (Stratagene) previously transformed with pRARE vector (rare codon translation capability) and strain C43 [28]. Unfortunately, no improvement was observed (data not shown).

SEPT8GC and SEPT8I were purified on a HiTrap Chelating column. SEPT8I was purified without contaminants but SEPT8GC required further purification and was submitted to gel filtration chromatography. After the second chromatography, both proteins were in a satisfactory degree of purity (Figure 2). The yield of purified proteins was 3.6 mg of SEPT8GC and 0.5 mg of SEPT8I per litre of induction. As shown in figure 2, the recombinant proteins migrate in SDS-PAGE to bands corresponding to molecular weights of about 45 and 60 kDa which are in agreement with the predicted values of 45444.5 Da and 58001.6 Da, of SEPT8GC and SEPT8I, respectively.



Figure 2. Expression and purification of human septin 8. A-B: Expression tests at different temperatures (20, 30 and 37°C) for SEPT8I (A), and SEPT8G (B). C: SEPT8GC after purification of the soluble fraction induced at 20°C through affinity chromatography and gel filtration. * indicates the presence of an overexpressed band, M indicates the Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), PP indicates purified protein, FT indicates the flowhthrough of purification, NI indicates non-induced sample, I and S indicate the insoluble and the soluble fractions after induction, respectively.

Due to the best results obtained with SEPT8GC construction, we used the recombinant protein produced by this clone in the following experiments. To confirm that recombinant septin corresponds to a truncated form of human septin 8, SEPT8GC was submitted to MS-MS analysis. The fragments found by fingerprint analysis belong only to GTPase domain and C-termini, no fragment from Ntermini of human septin 8 was obtained confirming the expression of the truncated SEPT8 (Figure 1B).

The CD spectrum of SEPT8GC is characteristic of folded proteins. SEPT8GC is predicted to be composed of 49 % alpha helix and 15 % beta sheet. Figure 3A shows the CD spectra recorded in the range 197–260 nm of SEPT8GC. The CD spectra of SEPT8GC is in accordance to a structure predominantly composed of helices as observed by the minimums at 208 and 222 nm (Figure 3A). Data deconvolution by CDNN [28] shows that SEPT8GC spectrum corresponds to 34 % of alpha helix and 16 % of beta sheet.

To assess the stability of SEPT8GC, we examined their thermal denaturation by monitoring the CD intensity at 222 nm (Figure 34B). SEPT8GC revealed a one state transition profile with T_m of 54 °C. Protein instability at body temperature can result in some diseases and while investigating septin 8 thermal denaturation, it was observed that SEPT8GC begins to lose secondary structure signal at 40 °C. Although SEPT8GC does not represent the entire protein found *in vivo*, it contains about 75% of the protein and the biggest GTP-domain. Thus, the stability at normal body temperatures and instability in some pathological circumstances when 40 °C is achieved can have some significance. Probably, this stability could be improved by GTP binding to SEPT8 since GTP binding is essential for stability of human SEPT4 [30], SEPT2 [31] and in SEPT2 from *Xenopus laevis*. Indeed, it is reported that GTP binding can trigger folding of GTPase domain [32].



Figure 3. Circular dichroism experiments. (A) Residual molar ellipticities of SEPT8GC were measured from 197 to 260 nm. (B) Thermally induced unfolding of SEPT8GC from 15 to 90 °C.

SEPT8GC has 1 tryptophan at position 218. In order to monitor the structure surrounding the tryptophan residue, we excited the sample at 295 nm and recorded the fluorescence emission spectra from 310 to 400 nm. SEPT8GC spectrum shows a characteristic fluorescence emission maximum at 340 nm and a shoulder of fluorescent emission in 356 nm (Figure 4). Once septin 8 has just one tryptophan in its structure, the two maximum of fluorescence emission reflect the sample heterogeneity, which could be caused by an equilibrium between different oligomeric states since other septins are able to form homo-oligomers [8], [10].



Figure 4. Fluorescence emission spectra of SEPT8GC. Proteins were excited at 295 nm and emissions were recorded from 310 to 450 nm. Samples consisted of 50 μ M protein in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM MgCl₂.

Analytic gel filtration was used in order to evaluate the formation of different oligomers of SEPT8GC. The results show 2 different peaks, the first peak represents high molecular weight molecules once bluedextran, a void volume marker of 2000 kDa, is eluted with the same volume. The second peak has a maximum that predicts a mass of 81 kDa, corresponding to a dimer of SEPT8GC.

The second peak is broad and has a shoulder corresponding to 57 kDa indicating that a equilibrium between monomers and dimers might occur (Figure 5A-B). DLS assays show a high polidispersivity of 59 % and a molecular weight prediction of 119 kDa. The high polidispersivity indicates the presence of different oligomers in the sample and suggests that SEPT8GC can also be found as trimers in solution (figure 5C). SEPT8GC has a long C-terminal with a coiled coil domain, the structure of human septin 8 is not available and tridimensional structures of other septins suggest that SEPT8GC might have an elongated shape that could interfere in DLS measurements which uses a spherical model for estimating the molecular weight, thus suggesting a trimer in solution where a dimer is present.



Figure 5. Gel Filtration chromatography of SEPT8GC. (A) Chromatogram indicating the presence of two peaks and a shoulder: 1 (void), 2 and 3. (B) Predicted molecular weight of peak 1, 2 and 3. Calibration was performed using aldolase (158 kDa), ovalbumin (43 kDa) and ribonuclease A (13.7

kDa). (C) Results of DLS analysis.

A model of SEPT8 GTPase domain was constructed based on its homology to SEPT2 homodimer and SEPT6/7 hetorodimer whose structures are available (PDB code 2QA5 and 2QAG, respectively) (Figures 6 and 7). The G-dimer has a buried interface of about 2168 Å² which is much bigger than the NC-dimer interface of about 837 Å². The residues found in the interfaces are more similar to SEPT6, which belongs to the same group as SEPT8, than to the others septins with known structure (Figure 8). The resolutions of the structures used as template for the molecular modeling does not allow a detailed description of all residues interacting in the interface and consequently which interface is predominant. However, it is possible to suggest that, as found for SEPT2, the G-dimer is more stable and may be the one found *in vivo*.



Figure 6. Analysis of the G-dimer SEPT8 interfaces. (A) Model of SEPT8G G-dimer and (B) details of the residues buried in the dimer interfaces



Figure 7. Analysis of the NC-dimer SEPT8 interfaces. (A) Model of SEPT8G NC-dimer and (B) details of the residues buried in the dimer interfaces.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
										+1
SEPT2	GFANLPNQVHRKSVH	KGFEFTLMV	GESGLGKSTL	INSLFLTDLY	PERVIPGAAE	KIERTVQIEA	STVEIEERGVI	KLRL TVVD TP	TODAINCR	DCFKTI
SEPT7	-FANLPNOVYRKSVE	REFETLMV	GESGLGKSTL	INSLELTDLY	SP-EYPGPSH	RIKKTVOVEO	KVLIKEGGV	LLLTIVDTP	FGDAVDNS	HCHOPV
SEPT8		-GFSFNILC	GETGIGKSTL	MNTLFNTTFE	TEEAS	HIEACVRLRP	OTYDLOESNV	LKLTIVDAV	FGDQINKD	ESYRPI
SEPT6		-GFCFNILC	GETGLGKSTL	MDTLENTKEE	EPAT	HTOPGVOLOS	NTYDLQESNVI	RLKLTIVSTV	FGDQINKE	DSYKPI
Clustal Consensus		** *.::	***:*:*****	** * :		1.1. *11.	:* .*	* **:*.: *	*1** 11	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
			H]	ł ŧ.	141
SEPT2	ISYIDEQFERYLHDE	SGLNRRH	IDHRVHCCFY	FISPFGHGLK	PLOVAFMKAI	HUKVHIVPVI	AKADTLTLKEI	RERLKKRILDI	TEEHNIKI	YHLPDA
SEPT7	IDYIDSKFEDYLHAE	SRVNRRO	PDNRVQCCLY	FIAPSGHELK	PLDIEFMKRL	HEKVNIIPLI	AKADTLTPEE	COOFKKOIMK	EIQERKIKI	YEFPET
SEPT8	VDYIDAQFENYLQEE	LKIRRSLED	HDTRINVCLY	FITPTGHSLK	SLDLVTMKKL	DSKVNIIPII	AKADTISKSEI	HKEKIKIMG	LVSNGVQI	YOFPTD
SEPT6	VEFIDAQFEAYLQEE	LKIRRVLHT	HDSRIHVCLY	FIAPTGHSLK	SLDLVTNKKL	DSKVNIIPII	AKADAISKSEI	TKFKIKITS	LVSNGVQI	YOFPTD
Clustal Consensus	1.1** 1** **1 *	:.*	*.*:: *:*	**:* **.**	.**: ** :	****:*:*	****::: .*	11* 1* 1	** .* ***	*.:*
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	
SEPT2	ESDEDEDFKEQTRL1	KASIPESVV	SNOLIEAKCK	KVRGRLYPWG	VEVENPEHD	DELKLRIMLI	THMODLOEV	TODLHYENFR	ERLKRGG	
SEPT7	D-DEEEHKLVKKI	KORLPLAVV	SNTILEVNER	RVRGROYPWG	VAEVENGEHC	DETILRIMLI	RTHMODLKDV	TNNVHYENYRS	RKLAAVT	
SEPT8	DEAVAEINAVM	NAHLPFAVV	STEEVKVGNK	LVRAROYPWG	VOVENENHC	DEVKLREMLI	RVIMEDLREO	THSRHYELYR	CKLEEMG	
SEPT6	DESVAEINGT	DIAHLPFAVI	STEELKIGNK	MRARQYPW6	TVOVENEAHC	DEVKLREMLI	RVIDEDLREO	THTRHYELYRI	CKLEEMG	
Clustal Consensus		: :*::*:	**. :: .*	:*.* ****	:*** *	** ** ***	.:*:**:: 1	*: *** :*	:*	

Figure 8. Sequence alignment of GTPase domain of septins 2, 6, 7 and 8. Vertical arrows indicate residues buried in the G- and NC-interface of SEPT8 dimer.

Conclusion

We have cloned three different constructions of septin 8, and expressed two of them in the soluble fraction using *E. coli* cells. The recombinant protein constituted by the GTPase domain and C-termini of human septin 8 (SEPT8GC) was purified in large scale quantities, confirmed by mass spectrometry and characterized by circular dichroism, fluorescence spectroscopy, analytic gel filtration and DLS. The recombinant protein is folded and stable until 40 °C. SEPT8GC can be denatured at high temperatures and presents a T_m of 54 °C. The emitted fluorescence of the tryptophan residue in SEPT8GC exhibited two maximum peaks of emission, which may suggest the presence of different oligomers in the sample. Analytic gel filtration and DLS results show the presence of different oligomers in solution and this suggests that SEPT8GC can form dimers or trimers in solution through its G- or NC-interface. Homology modeling shows that the dimer formed by the G-interface shall have a much greater buried surface which could stabilize this dimer formation further than the one created by the NC-interface.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 2005/05149-6 and 1998/14138-2) and Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS).

References

- [1] Hartwell, L.H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. Exp Cell Res
- [2] Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loopGTPases and related ATPases. J. Mol. Biol. 317:41–72.
- [3] Hall, P., and Russell, S. (2004) The pathobiology of the septin gene family, J. Pathol. 204:489-505.
- [4] Martinez C, Ware J. (2004) Mammalian septin function in hemostasis and beyond. Exp Biol Med (Maywood) 229:1111–1119.
- [5] Kinoshita, M. (2003) The septins. Genome Biol. 4, 236

[6] Macara, I. G., Baldarelli, R., Field, C. M., Glotzer, M., Hayashi,Y., Hsu, S. C., Kennedy, M. B., Kinoshita, M., Longtine, M.,Low, C., Maltais, L. J., McKenzie, L., Mitchison, T. J., Nishikawa,T., Noda, M., Petty, E. M., Peifer, M., Pringle, J. R., Robinson,P. J., Roth, D., Russell, S. E., Stuhlmann, H., Tanaka, M., Tanaka,T., Trimble, W. S., Ware, J., Zeleznik-Le, N. J., and Zieger, B. (2002) Mammalian septins nomenclature, Mol. Biol. Cell 13:4111-4113.

- [7] Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F., and Mitchison, T. J. (2002) Self- and actin-templated assembly of mammalian septins, DeV. Cell 3 791-802.
- [8] Sheffield P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z., and Macara, I. G. (2003) Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments, J. Biol.Chem. 278:3483-3488.

- [9] Low, C., and Macara, I. G. (2006) Structural analysis of septin 2, 6 and 7 complexes, J. Biol. Chem. 281:30697-30706.
- [10] Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, Stark H, Wittinghofer A. (2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. Nature. 449, 7160:311-315.
- [11] Versele, M. & Thorner, J. (2005) Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. Trends Cell Biol. 15414–424.

[12] Kinoshita, A., Kinoshita, M., Akiyama, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Kumar, S., Noda, M., and Kimura, J. (1998) Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, Am. J. Pathol. 153:1551-1560.

[13] Cheon MS, Fountoulakis M, Dierssen M, Ferreres JC, Lubec G. (2001) Expression profiles of proteins in fetal brain with Down syndrome. J Neural Transm Suppl. 61:311-319.

[14] Engidawork E, Gulesserian T, Fountoulakis M, Lubec G. (2003) Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. Neuroscience. 122(1):145-154.

[15] Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Morioka, Y., Akigunchi, I., Shibasaki, H., Noda, M., and Kinoshita, M. (2003) Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmatic inclusions found in Parkinson's disease and others synucleinopathies, J. Biol. Chem. 278 :24095-24012.

[16] Kalikin L M, Sims H L, Petty E M. (2000) Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. Genomics. **15**:63(2):165-172.

[17] Montagna C, Lyu M_S, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T. (2003) The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. Cancer Res. 63(9):2179-2187.

[18] Burrows J F, Chanduloy S, McIlhatton M A, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin A K, Johnston P G, Russell S E. (2003) Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. J Pathol. 201 (4):581-820.

[19] Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT. (2002) Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors.J Neurooncol. 57(3):169-177.

[20] Kim DS, Hubbard SL, Peraud A, Salhia B, Sakai K, Rutka JT. (2004) Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. Neoplasia. 6(2):168-178.

[21] Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SE. (2006) Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer.* 118(5):1325-1329.

[22] Yan SZ. Beeler já, Chen Y, Shelton RK, Tang WJ. (2001) The regulation of type 7 adenylyl cyclaseby its C1b regio and Escherichia coli peptidylprolyl isomerase, SLYD. J Biol Chem. 276(11):8500-8506.

[23] Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosinein proteins, Biochemistry. 6:1948–1954.

[24] Adler A J, Ross, D G, Chen, K, Stafford, P.A. Woisswillo, M J, Fasman G G. (1974) Interaction of deoxyribonucleic acid with histone f2b and its half-molecules. Circular dichroism studies.Biochemistry 13:616-622.

[25] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948.

[26] Field, C. M., and Kellogg, D. (1999) Septins: Structural polymers or signaling GTPases, Trends Cell Biol. 9:387-394.

[27] Finn R.D., Tate J, Mistry J, Coggill PC, Sammut JS, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR,
Sonnhammer EL, Bateman A. (2008) The PFAM protein families database. Nucleic Acids 46

Research Database Issue 36:D281-D288.

[28] Miroux B, Walker JE. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol. 260 (3):289-298.

[29] Böhm G, Muhr R, Jaenicke R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. Protein Eng. 5:191-195.

[30] Garcia W, Araujo APU, Lara F, Foguel D, Tanaka M, Tanaka T, Garratt, RC. (2007) An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-β) forms amyloid-like filaments in vitro. Biochemistry. 46:11101-11109.

[31] Huang, Y., Surka, M. C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C., and Trimble, W. S. (2006) GTP binding and hydrolysis of human septin2, FEBS J. 273:3248-3260.

[32] Mitchison, T., and Field, C. M. (2002) Cytoskeleton: What does GTP do for dispatch septins? Curr. Biol. 12: R788-R790.

3.2 Artigo II

Human septins 6, 8 and 11 from subgroup II bind and hydrolyze GTP in a lower rate than human septin 2

Souza, T. A.C. B.¹⁻², Neuby, J.³, Hoff, C.³, Araujo, A. P. U.³, Garratt, R.C.³, Barbosa, J.A.R.G.²

1- Institute of Biology CP 6109, State University of Campinas – UNICAMP,

13083-970, Campinas, SP, Brazil.

2- Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory,

3083-970, Campinas, SP, Brazil.

3 - Institute of Physics, State University of São Paulo - USP,

13560-970, São Carlos, SP, Brazil

Abstract

Septins are GTP binding proteins that belong to TRAFAC subclass of the P-loop family. They were first identified in yeast at the mother bud neck. In humans 14 septins are known and named SEPT1-14. They play a role in several cell processes. The 14 human septins are divided in 4 subgroups based on their primary sequence. Sept 6, 8, 10 and 11 belong to subgroup II; this group has a threonine instead of a serine in the P-loop sequence. The influence of this polymorphism in GTPase activity is not known. Some mutations in GTPases lead to lack of activity and some reports associate the expression of such proteins to tumor. Once little is known about the binding and hydrolyzes of GTP by human septin, we analyzed the GTP binding and hydrolysis activity of septins 6, 8 and 11 belonging to subgroup II and septin 2. We observed that septin 6, 8 and 11 are able to bind GTP at different temperatures. Those proteins also have low GTPase activity with binding and hydrolysis levels lower than the rates observed for human septin 2.

Keywords

Septin, GTPase activity, GTP binding, P-loop mutation

Introduction

G proteins are a super family of proteins that bind and hydrolyze GTP. Those proteins are involved in most of the cellular processes and include RAS and its close homologues, and heterotrimeric G proteins. GTPase fold is well conserved among GTPases, five polypeptide loops forms the guanine nucleotide binding site. These loops are the most highly conserved elements in this domain and define the G protein super family [1].

Septins belong to TRAFAC subclass of P-loop family [2] and were first identified in yeast at the mother bud neck [3]. In humans 14 septins are known and named SEPT1-14. They play a role in cell cycle and vesicular traffic, and are associated with some diseases such as Alzheimer's disease [4, 5], Down's syndrome [6, 7 and 8], Parkinson's disease [9] and to breast [10, 11], ovarian [12], brain [13, 14], and other tumors [15].

Human septins can form homo and hetero-oligomers. This oligomerization is regarded as important for the functionality of septins and is related to each septin's ability to bind and hydrolyze GTP. For instance, the hetero-oligomer of human SEPT6 and SEPT7 is able to hydrolyze GTP [16]. Human SEPT2 binds and hydrolyses GTP *in vitro* but with an extremely slow nucleotide exchange rate. Furthermore, it seems that filament formation by SEPT2 is related to nucleotide binding [17, 18 and 19]. *Xenopus* SEPT2 expressed in *E. coli* is able to bind and hydrolyze GTP but is not able to bind GDP. GTP binding induces filament assembly of 7 μ m in length [20]. A complex formed by three septins from Drosophila, *Pnut*, *Sep2* and *Sep1*, bind and hydrolyze GTP [21]. GTP binding does not seem only related to filamentous structures but also to phosphatidylinositol polyphosphate binding by mammalian SEPT4 [22].

It is suggested that guanine nucleotide plays a structural role in the yeast septins once *in vivo* septins do not turnover GTP and the rate of GTP turnover *in vitro* is very slow when compared to the duration of cell cycle [23].

The 14 human septins are divided in 4 subgroups based on their primary sequence [24, 25]. Septins 6, 8, 10 and 11 belong to subgroup II and little is known about the binding and hydrolyzes of GTP by this subgroup. We analyzed the GTP binding and hydrolysis activity of septins 6, 8 and 11 and compared their activity to human SEPT2. We observed that septins 6, 8 and 11 are able to bind GTP at different temperatures. Those proteins also have GTPase activity, however the level of binding and hydrolyzes are lower than the rates observed for human SEPT2.

Materials and Methods

Cloning of recombinant septins - Human septin 6 (37-303 aa), 8 (121-508 aa) and 11 (39-429 aa) were amplified by PCR using Hela cells cDNA as a probe and specific primers that were construct based on sequences available at GeneBank. The amplified gene sequence was inserted into pGEM T-easy vector (Promega) and the recombinant vector was sequenced in 3130x1 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Vectors with the correct insert were digested with appropriate enzymes and the resulting fragment was inserted into pET28a expression vector (Qiagen). Positive clones were selected by PCR and used to transform *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD cells. Recombinant SEPT2 (1 – 323 aa) was gently provided by Julio Cesar Pissuti Damlio.

Recombinant proteins expression and purification – Human septins cloned into pET28a vector were used to transform *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD cells. Expression was induced by adding isopropyl- β -Dthiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.4 mM into log-phase cultures incubated at 20°C overnight. The cells were centrifuged at 2600*g* for 10 minutes and suspended in binding buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂. The cell suspension was sonicated with Sonics Vibracell and the lysate centrifuged at 2000*g* for 15 minutes to remove unbroken cells, cellular debris and insoluble proteins. The supernatant was aliquoted and submitted to purification. All purification steps were done under 16°C. The proteins were purified on a 1 mL HiTrap Chelating column (Amersham Bioscience) using a FPLC system (Fast Performance Liquid Chromatography - Amersham Bioscience). The column was loaded with 100 mM NiSO₄ and pre-equilibrated with buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂. A gradient of 0-100% of the elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 0.5 M imidazol) was used for protein elution. The fractions from the chromatography were analyzed by SDS-PAGE.

In vitro nucleotide binding assay - Proteins purified at a concentration of 20 μ M were incubated with a GTP solution at a concentration of 60 μ M diluted in the same buffer at different temperatures: 4, 18, 22, 37 and 42°C for 60 minutes. Subsequently, the samples were washed by centrifugation (at 4°C) using Millipore concentrators (10 kDa cut-off) as described by [26, 27]. The filter was washed with 10 volumes of the filtrate. The protein retained in the filter was precipitated as described by [28]. The absorption spectrum of the filtrate was measured at 254 nm using a Beckman Coulter DU 640 spectrophotometer to assess its nucleotide content. Buffer incubated at the same condition with GTP solution was used as control.

Nucleotide content analysis - The purified septins at a concentration of 20 μ M were incubated with a GTP solution at a concentration of 60 μ M at 22 °C for 30, 60, 120, and 180 minutes and subsequently washed (at 4°C) using concentrators with 10 kDa cut-off (Millipore) as described by [26, 27]. The protein retained and the filtrate were denatured as described by [28]. The pooled filtrate and the flow-through were analyzed by ion exchange chromatography through Protein Pak DEAE 5 PW (Waters) column at Alliance 2695 HPLC (Waters). The elution was done through a 0 -1 M NaCl gradient at a flow rate of 1 mL/min. Peak areas were analyzed using ORIGINLAB (OriginLab, Northampton, MA). Standards were a mixture of 60 μ M of GDP and 60 μ M GTP used in a separate run identical to one from the samples being analyzed.

52

Results

Cloning, expression and purification – The encoding sequences for human septins or for its domains, described in figure 1A, were cloned in pET-28a vector (Novagen) for expression *E. coli*. Recombinant proteins were purified by affinity chromatography to nickel (Figure 1B) and used for the subsequent tests.

Nucleotide binding by septins 2, 6, 8 and 11 - Considering that Mg^{2+} is known to be a co-factor for GTP binding proteins and its presence enhances the nucleotide exchange level by SEPT2 [17], we added 5 mM of MgCl₂ in all buffers used in this work. 20 μ M of septins were incubated with 60 μ M of GTP for 60 minutes in different temperatures.

On average, SEPT2 binds GTP more efficiently than the others septins followed by SEPT8. The optimum temperature for SEPT2 and SEPT8 activities is 22°C, for SEPT6 is 18°C and for SEPT11, 4°C. At 22°C, it was found approximately 0.7 mol of nucleotide per mol of SEPT2. These results are lower that the result reported by [17] where SEPT2 binds approximately 1.3 mol of nucleotide in one hour at room temperature. This difference may be due to the lack of the C-terminal in our structure. We were not able to produce a homogeneous sample of the entire SEPT2 and chose the clone containing the n-terminal and GTPase domain based on its stability.

At room temperature, SEPT6, SEPT8 and SEPT11 present a binding stoichiometry of 0.36 \pm 0.01, 0.51 \pm 0.01 and 0.3 \pm 0.03 mol of GTP per mol of septin (Figure 1C).

Α		I	3	
Sept2NG (BC033	3559.1)			
1	323			
Sept6G (B	AA09477)		1 F	
37	306			
Sep	t8GC (BAA13193)			-
121		506		0
Sept	11GC (NP_060713)			
39		429		
С				
Temperature (°C)	SEPT2	SEPT6	SEPT8	SEPT11
4	0.39 ± 0.06	0.33 ± 0.03	0.55 ± 0.01	0.52 ± 0.0
18	0.33 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.405 ± 0.0
22	0.68 ± 0.05	0.36 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.3 ± 0.03

37

average

 0.58 ± 0.06

 0.495 ± 0.04

Figure 1. Purification of recombinant septins and analysis of GTP binding by them . A- Scheme representing the constructions of septins used in this work. B- SDS-PAGE analysis of the recombinant septins expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography (a- SEPT2, b- SEPT6, c- SEPT8 and d- SEPT11. C- GTP binding by SEPT2NG, SEPT8GC, SEPT6G and SEPT11GC. 20 μ M of recombinant proteins were incubated with a GTP solution at a concentration of 60 μ M diluted in the same buffer at different temperatures: 4, 18, 22, 37 and 42 °C for 60 minutes and subsequently centrifuged (at 4 °C) using Millipore concentrators (10 kDa cut-off). The absorption spectrum of the filtrate was measured at 254 nm using a Beckman Coulter DU 640 spectrophotometer to assess its nucleotide content. Buffer incubated at the same condition with GTP solution was used as control.

 0.33 ± 0.01

 0.36 ± 0.01

GTP hydrolysis by SEPT 2, 6, 8 and 11 - SEPT2, SEPT6, SEPT8 and SEPT11 are able to bind and also hydrolyze GTP as shown in figure 2. After 3 hours of incubation with GTP, the nucleotide

 0.41 ± 0.01

 0.41 ± 0.01

 0.42 ± 0.03

 0.47 ± 0.01

content was analyzed by ion exchange chromatography. The peaks intensities reveal that SEPT2 has the highest concentration of bound GDP, followed by SEPT6 and SEPT8. SEPT11 has the lowest concentration of GDP and GTP bound to protein after 3 hours of incubation (Figure 2).



Figure 2 – SEPT2NG (A), SEPT6G (B), SEPT8GC (C) and SEPT11GC (D) bind and hydrolyze GTP. 20 μ M of purified septin was incubated with 60 μ M of GTP for 3 hours and the nucleotide content analyzed by ion exchange chromatography. GDP are eluted first in the GTP/GDP chromatography (E).

Analyzing the total amount of GTP hydrolyzed by septins (GDP bound to protein and GDP present in the supernatant), we found that the rate of GTP – GDP conversion by SEPT2NG is significantly higher than the hydrolysis rate by the other septins. After 3 hours of incubation with GTP, SEPT2NG has hydrolyzed $30.4\% \pm 1.0$ of the total amount of nucleotide available (Figure 3). SEPT6 and SEPT8 have hydrolyzed approximately 12% of the GTP available and SEPT11 hydrolyzed just 6.5% after 3 hours of incubation with GTP. The GTP incubated with the buffer was hydrolyzed in a rate of 0.2% of its initial content after 3 hours.



Figure 3. Time-dependent analysis of GTP hydrolysis by SEPT2, 6, 8 and 11. Purified proteins were incubated for 3 hours. Through a filter-binding assay it was possible to analyze the nucleotide

content bound or not to septin at 0.5, 1, 2 and 3 hours. All samples were monitored by ion exchange chromatography at an Alliance 2695 HPLC (Waters). Total amount of GDP was measured and divided by the total amount of GTP available in solution. ADD GTP CURVE

Discussion

Human septins comprise a family of 14 proteins that can be separated in different subgroups based in their primary sequence. SEPT6, 8 and 11 belong to subgroup II, the group of septins with large C-terminal domains. SEPT2 is a protein allocated in subgroup III together with SEPT 1, 4 and 5 [23, 24, 29]. Although GTPase activity of human SEPT2 is well documented [17, 18, 19]; little is known about GTPase activity of SEPT 6, 8 and 11. In this work we observed that SEPT2, 6, 8 and 11 were able to bind and hydrolyze GTP with different intensities.

The optimum temperature of GTP binding differs among septins tested in this study. However the maximum difference in the binding rate, when considering the temperature variation, is not higher than 0.3 mol of nucleotides per mol of septin.

The amount of GTP hydrolyzed by SEPT6, SEPT8 and SEPT11 with 3 hours equals to the amount produced in approximately 70 minutes by SEPT2. All the expressed constructions have the conserved GTPase domain but SEPT2 lacks the C-terminal, SEPT6 lacks the N- and C-termini, SEPT8 and SEPT11 lacks the N-terminal. The different constructions were selected based on the solubility of recombinant protein; our preliminary results show that aggregated samples do not present hydrolytic activity and there are observations that isolated septins have a low affinity for nucleotides and that no nucleotide dissociation is detected in the septin oligomers [30, 31]. Although the constructions are not entire identical, they have in common the GTPase domain, homogeneity and are not in an aggregate stated and this characteristic contributed to GTPase activity.

A hydrolytic activity can be influenced by lower affinity to ligand. If SEPT6, 8 and 11 take more time to bind an equal amount of GTP comparing to SEPT2, this can result in a lower GTPase activity. It is known that enymatic activity can be influenced by temperature and pH. pH of 7.5 were used to prevent auto-hydrolisys of GTP and the differences presented by temperature to nucleotide binding are not high enough among septin tested, mainly when SEPT8 and SEPT2 are compared. So other hypothesis to explain the lower activity of SEPT6, SEPT8 and SEPT11 as: 1) need of nucleotide exchange factors; 2) different rates of nucleotide release, 3) conformational changes for GTPase activity, 4) that recombinant proteins are not perfectly folded.

Previous studies report that GTPase activity in monomers of sept6 was not detected [16]. However, stable dimers of SEPT6/7 can bind GTP and hydrolyze it at rate that is equal or greater than the rate of dimer formation [16]. DLS analysis suggested that recombinant septins tested in this work appear as dimers or trimers in solution. It is possible that the dimers interface is necessary to GTP hydrolysis (data not shown).

The tridimensional structure of a complex formed by human SEPT2, 6 and 7 [32] shows SEPT2 and SEPT7 bound to GDP and SEPT6 bound to GTP. This can be considered an indication of the lower hydrolytic activity by SEPT6. The hydrolytic rates per hour of 0.12, 0.12 and 0.065 mol of nucleotide per mol of SEPT6, SEPT8 and SEPT11, respectively, are about 60 times lower than hydrolytic rates by other signaling GTPases as RAS [33]. This fact and the suggestion that GTP binding is needed for protein stability [27] implicates a structural role of GTP binding by SEPT6, SEPT8 and SEPT11.

Subgroup II of septins has a threonine instead of a serine in the P-loop sequence (GETGLK is observed and not GESGLK found in other septins). This mutation is found only in this group and could affect the hydrolytic activity. Those residues (Ser or Thr) from the P-loop are involved in hydrogen bonding with the oxygen of the γ -phosphate [19]. Mutation of Ser-46, a correspondent residue to threonine found in SEPT6, SEPT8 and SEPT11, to a threnonine in SEPT2 does not affect the catalytic
activity of this septin [19]. However the mutation of Thr-78 found in SEPT2 affected its GTPase activity [19]. Interestingly, this residue is not found in the SEPT6 subgroup of septins and can be influence in this insignificant catalytic activity. Some mutations in the Glycine-12 of H-Ras, residue corresponding of threonine found in SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14, lead to lack of activity [34].

It would be interesting to analyze the hydrolytic activities of other septins of the same subgroup of SEPT2 as well as structural studies of the influence of GTP in septin behaviour. In this article, we analyze the capability of SEPT6, SEPT8 and SEPT11, members of subgroup II, to binding and hydrolyze GTP, showing that all of them have the enzymatic capacity but in a much lower rate then SEPT2.

REFERENCES

- [1] Sprang, S. R. G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. Curr Opin Struct Biol. 7(6) (1997) 849-856.
- [2] Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Aravind, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J. Mol. Biol. 317 (2002) 41–72.
- [3] Hartwell, L.H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. Exp Cell Res(1971)
- [4] Takehashi M, Alioto T, Stedeford T, Persad AS, Banasik M, Masliah E, Tanaka S, Ueda K. Septin 3 gene polymorphism in Alzheimer's disease. Gene Expr. 11(5-6) (2004) 263-270.
- [5] Kinoshita, A., Kinoshita, M., Akiyama, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Kumar, S., Noda, M., and Kimura, J. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, Am. J. Pathol. 153 (1998) 1551-1560.
- [6] Sitz JH, Baumgärtel K, Hämmerle B, Papadopoulos C, Hekerman P, Tejedor FJ, Becker W, Lutz B.

The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. Neuroscience. 157(3) (2008) 596-605. [7] Cheon MS, Fountoulakis M, Dierssen M, Ferreres JC, Lubec G. Expression profiles of proteins in

fetal brain with Down syndrome. J Neural Transm Suppl. 61 (2001) 311-319.

[8] Engidawork E, Gulesserian T, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. Neuroscience. 122(1) (2003) 145-154.

[9] Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Morioka, Y., Akigunchi, I., Shibasaki, H., Noda, M., and Kinoshita, M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmatic inclusions found in Parkinson's disease and others synucleinopathies, J. Biol. Chem. 278 (2003) 24095-24012.

[10] Kalikin L M, Sims H L, Petty E M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. Genomics. **15**:63(2) (2000) 165-72.

[11] Montagna C, Lyu M_S, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. Cancer Res. 63(9) (2003) 2179-87.

[12] Burrows J F, Chanduloy S, McIlhatton M A, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin A K,
Johnston P G, Russell S E. Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. J Pathol.
201(4):581-820 (2003).

[13] Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors.J Neurooncol. 57(3) (2002) 169-77.

[14] Kim DS, Hubbard SL, Peraud A, Salhia B, Sakai K, Rutka JT.Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. Neoplasia. 2004 Mar-Apr;6(2):168-78.

[15] Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SE. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer. 118*(*5*)(2006)1325-9.

[16] Sheffield P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z., and Macara, I. G. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments, J. Biol.Chem. 278 (2003) 3483-3488

[17] Huang, Y., Surka, M. C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C., and Trimble, W. S. (2006) GTP binding and hydrolysis of human septin2, FEBS J. 273, 3248-3260.

[18] Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M.Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures.

Genes Dev. 11(12) (1997)1535-1547.

[19] Sirajuddin M, Farkasovsky M, Zent E, Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(39) (2009) 16592-16597.

[20] Mendoza M, Hyman AA, Glotzer M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. Curr Biol. 12(21) (2002) 1858-1863.

[21] (Field, 2007)

[22] Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS. Phosphatidylinositolpolyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. Curr Biol. 9(24) (1999)1458-1467.

[23] Vrabioiu AM, Gerber SA, Gygi SP, Field CM, Mitchison TJ. The majority of the Saccharomyces cerevisiae septin complexes do not exchange guanine nucleotides. J Biol Chem. 279(4) (2004) 3111-3118.

[24] Hall PA, Todd CB, Hyland PL, McDade SS, Grabsch H, Dattani M, Hillan KJ, Russell SE.The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors. Clin Cancer Res. 11 (2005) 6780-6786.

[25] Spiliotis ET, Nelson WJ. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. J Cell Sci. 119 (2006) 4-10.

[26] Field CM, al-Awar O, Rosenblatt J, Wong ML, Alberts B, Mitchison TJ. A purified Drosophila septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity.J Cell Biol. 133(3) (1996) 605-616.

[27] Garcia W, Araujo APU, Lara F, Foguel D, Tanaka M, Tanaka T, Garratt, RC. Na intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. Biochemistry. 46 (2007) 11101-11109.

[28] Seckler R, Wu GM, Timasheff SN. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gammamethylene) diphosphonate. Formation and assembly of a stoichiometric complex. J Biol Chem. 265(1990) 7655-7661.

[29] Martínez C, Corral J, Dent JA, Sesma L, Vicente V, Ware J. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. J Thromb Haemost. 4(6) (2006) 1388-1395.

[30] Vrabioiu AM, Gerber SA, Gygi SP, Field CM, Mitchison TJ. The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. J Biol Chem. 279 (2004) 3111 – 3118.

[31] Farkasovsky M, Herter P, Voss P, Wittinghofer A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septins complexes. Biol chem. 386 (2005) 643 – 656.

[32] Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, Stark H,

Wittinghofer A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. Nature. 449, 7160 (2007) 311-315.

[33] Frech M, Darden TA, Pedersen LG, Foley CK, Charifson PS, Anderson MW, Wittinghofer A.Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study.Biochemistry. 33(11) (1994) 3237-3244.

[34] Maegley KA, Admiraal SJ, Herschlag D. Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(1996) 8160-8166.

3.3 Artigo III:

Human septin 10 interacts with Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein

Souza, T.A.C.B^{1, 2}, Lanza, D.C.F.², Nakahira, M.², Köbarg, J², Barbosa, J.A.R.G²

- 3- Institute of Biology CP 6109, State University of Campinas UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.
- 4- Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, SP, 13083-970, Brazil.

Abstract

Septins are a family of proteins involved in some important cellular processes such as cytokinesis, vesicle trafficking and exocytosis. Mammalian septins comprise a family of 14 genes named *sept1-14*. An increasing body of data implicates the septin family in the pathogenesis of diverse disease states including neoplasia, neurodegenerative conditions and infections. Human septins share a highly conserved structure comprising a variable N- and C-terminal and a conserved domain related to those found in small GTPases, and septins have been shown to bind and hydrolyze GTP. Human septin 10 (SEPT10) is highly expressed in heart, kidney, placenta, skeletal muscles, liver and lung. Here we introduce Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein (PLZF) as new interaction partner of Septin 10. PLZF is a phosphoprotein whose expression blocks the myeloid proliferation and differentiation through target gene silencing as cell cycle regulators.

Key words: PLZF, SEPT10, septin, protein interaction

Introduction

Septins are GTP-binding proteins found in a wide range of organisms including fungi, Drosophila and mammals. There were first identified in yeast at the emerging bud neck (Hartwell, 1971) where they may coordinate microtubule and actin functions during cell division and DNA damage arrest in yeast (Kremer *et al*, 2007). In mammals, septins have a role in mitosis and cytokinesis (Kinoshita *et al*, 1997; Longtine *et al*, 1996; Spiliotis *et al*, 2005) spermorphogenisis (Ihara *et al*, 2005, Kissel *et al*, 2005), and regulated exocytosis (Spiliotis & Nelson, 2006; Xue *et al*, 2004), however the exact mechanism remains unclear.

Mammalian septins comprise a family of 14 genes named *sept1-14* that can yield more than 14 septins by alternatively splicing. Human septin 10 (SEPT10) was first cloned and characterized from dendritic cells. SEPT10 is highly expressed in heart, kidney, placenta, skeletal muscles, liver and lung (Sui *et al*, 2003) and is up-regulated in tumors (Hall *et al*, 2005). Two different transcripts from gene *sept10* are known so far. One transcript is predominantly expressed in normal kidney's tissue, adenocarcinome, HeLa cells, chronic myeloid leukemia, pulmonar carcinome and melanome; the other transcript is expressed in lymphoblastic leukemia Molt-4 and Burkitt Raji Linfome (Sui *et al*, 2003). PLZF is a phosphoprotein whose expression blocks the myeloid proliferation and differentiation through target gene silencing as cell cycle regulators (Melnick *et al*, 2000; Shaknovich *et al*, 1998; Yeyati *et al*, 1999). This gene is found in translocations with RARA gene (*retinoic acid receptor alpha*) in promyleocytics leukemia patients (Melnick *et al*, 1999). The structure of PLZF consists of: (1) a BTB domain-type, responsible for PLZFs dimerizations (Ahmad *et al*, 1998), (2) an unstructured central domain and (3) a series of C2H2-Kruppel-type zinc fingers. BTB domain is found in more than 200 mammalian proteins (Stogios *et al*, 2005; Collins *et al*, 2001), some involved in cytoskeleton

dynamics (Stogios *et al*, 2005). The central domain is responsible for molecule flexibility and C-terminal domain is able to interact with DNA molecules when PLZF is previouslyrylated by Cdc2. The specificity of DNA binding may be regulated by sequences upstream of the zinc fingers and post translational modifications as phosphorylation (Ball *et al*, 1999).

PLZF was found as a partner of SEPT10. The interaction was mapped and it suggests that the interaction occurs between SEPT10 and zinc finger domain of PLZF. Co-localization of endogenous SEPT10 and PLZF was analyzed using specific antibodies and results show that SEPT10 and PLZF co-localize in the cytoplasm of HeLa cells.

The interaction among septins and proteins involved in cell cycle were previously described for SEPT2, SEPT6, SEPT7, SEPT9 and SEPT11 (Kinoshita *et al*, 1997; Joberty *et al*, 2001; Kinoshita *et al*, 2002; Surka *et al*, 2002; Sheffield *et al*, 2003; Vega & Hsu, 2003; Nagata *et al*, 2004; Spiliotis *et al*, 2005; Kremer *et al*, 2005; Nagata & Inagaki, 2005, Low & Macara, 2006; Kremer *et al*, 2007).

In this work we used SEPT10 as bait to screen a human fetal brain (HFC) and leukocytes (Leuk) cDNA libraries. We found that Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein (PLZF) is a new partner of SEPT10. The interaction was confirmed by *in vitro* and *in vivo* assays. Immunocytochemistry reveals that these proteins colocalize in HeLa cells. We mapped the PLZF regions necessary for interaction.

Experimental procedures

Plasmids constructions

The entire coding sequence of human septin 10 gene, amplified by PCR using a specific primer set: GAATTCATGGCCTCCTCCGAGGTGGCG, GTCGACGTTACAAAAATTGGAGTT

CTTACGGTCM, was cloned into pGEM-T-easy vector and subcloned into *Eco*RI and *Sal*I restriction site in vector pBTM116 for two-hydrid assay. For yeast expression, this sequence was subcloned into pYEX4T1 vector (Clontech) into *Eco*RI and *Xho*I restriction site. Several sets of oligonucleotides were designed for PCR amplification of complete PLZF or truncate constructions (Figure 2), which were inserted in vector pACT2 (Clontech) in fusion with Gal5 activation domain.

For pull-down assay, full-length PLZF was amplified by PCR using the following set of oligonucleotides: GAATTCATGGATCTGACAAAAATGGGC, CTCGAGCGTCTTCATCCCACT GTGCAG, cloned into pGEM-T-easy vector and subcloned into pET28a vector (Qiagen). SEPT10 was cloned fused to GST into pET29 vector (Qiagen).

Yeast Two Hybrid Screen

The yeast two hybrid screen (MacDonald, 2001) of human fetal brain cDNA and leukocytes libraries (Clontech, Palo Alto, CA) was performed by using the yeast strain L40 (trp1-901, his3 Δ 200, leu2-3, ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lac GAL4) and human septin 10 as bait fused to the yeast LexA DNA binding domain in vector pBTM116. Yeast cells were transformed according to the protocols supplied by Clontech. The screening was performed in selective medium plates containing 5 mM 3AT and without tryptophan, leucine and histidine.

Assay of β-Galactosidase Activity in Yeast Cells

For β -galactosidase activity filter assay, the colonies grown in selective medium were transferred to filter paper, permeabilized in liquid nitrogen, and incubated with Z buffer (87 mM Na₂HPO₄, 97 mM NaH₂PO₄, 19 mM KCl, 1.38 mM MgSO₄, 0.02% beta-mercaptoethanol) plus 1 mg/mL X-GaL at 37°C for 1 hour.

Mapping the Protein Interaction Sites

The clones named PLZF1-5 were transformed in *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 previously transformed with sept10-pBTM116. The growth under interaction-selective conditions (medium without tryptophan, leucine and histine) was analyzed and co-transformants colonies submitted to β -galactosidase activity assay.

Pull-down assay

Sept10-pYEX4T1 was transformed into L40 yeast strain and cupper inducible expression was performed at 30°C as describe by fabricant (Clontech). SEPT10-GST was purified by affinity chromatography using a GStrap column (Invitrogen).

The plzf-pET28a was used to transform BL21(DE3) $\Delta slyD$ *E. coli* strain and the induction was performed at 37°C with 0.4 mM of IPTG. Purified SEPT10-GST was incubated with soluble extract of PLZF induction. After 2 hours, the sample was purified by affinity chromatography using a GStrap column (Invitrogen), and the fractions submitted to western blot analysis.

Western blot analysis

Proteins were separated by electrophoresis in 13% SDS-polyacrylamide gel and electro transferred into PVDF (polyvinylidene difluoride) (Hybond®-PVDF - Amersham Biosciences). The membranes were blocked by incubation in 2% skim milk powder in TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7.4). The blots were probed using 1:3500 dilution of mouse monoclonal anti-His (Anti-His Antibody Mouse, Amersham) or monoclonal anti-GST antibody 5.3.3 (hybridoma supernatant 1:5). Bound antibodies were detected with 1:300 dilutions of anti-mouse IgG Alkaline Phosphatase-Conjugated (Sigma), NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) (Promega) and BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) (Promega).

In vivo analysis of Sept10 and PLZF localization

HeLa cells were cultivated in 24-well plates containing DME medium, 10% FCS and penicillin and streptomycin at a concentration of 10000 cells/well at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. Endogenous proteins were probed using rabbit monoclonal anti-SEPT10 (1:100) (Genetex, Inc.) and mouse polyclonal anti-PLZF (1:100) (Santa Cruz Biotechnology). The cells were incubated at room temperature for 1 h with anti-SEPT10 or anti-PLZF and subsequently, the cells were incubated at room temperature for 1 h with a TRITC conjugated mouse anti-rabbit IgG (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) and a FITC conjugated bovine anti-mouse (1:200) (Santa Cruz Biotechnology). Hoechst 33258 (1 μ g/mL) dye was used to stain the nuclei. Cells were examined with Nikon fluorescence microscope. Confocal microscopy analyses were performed on a Carl Zeiss SLM 510 META microscope.

Results

Two Hybrid screen

The construction encoding the entire SEPT10 was tested for autonomous activation of the genes reporter: HIS3 and LacZ prior to two hybrid screen. Reporter gene HIS3 confers the ability for the yeast to grow in a medium lacking tryptophan, histidine and containing 5 mM of 3AT, an inhibitor of HIS3. Reporter gene LacZ is able to degrade x-GAL thus producing blue colonies in the β galactosidase filter assay. SEPT10 was not capable of autonomous activation, and was used as bait to screen HFC and Leuk libraries. Three colonies show positive results in HIS3 and LacZ tests. Their plasmids were extracted and sequenced. The nucleotide sequence corresponds to different regions of *zbtb16* gene (ncbi GeneID: 7704) (Figure 1A). Extracted plasmids were used to transform L40 previously transformed with sept10-pBTM116 and the interactions were confirmed in yeast cells and in

i v

 β -galactosidase filter assay (Figure 1).



4

Figure 1 – SEPT10 interacts with PLFZ. A – Schematic view of full length PLZF and the constructions observed as SEPT10 partner in two hybrid assay. All clones present positive results in β -Gal (A) and *His3* (B) transactivation assay. LexA-Fez(1-392) was used as positive control and empty vector pBTM116 as negative control.

Mapping the regions of interaction

DNA sequence of three positive clones of PLZF shows that all clones obtained in the two hydrid assay contains the zinc finger domain in their structure (Figure 1). Therefore, zinc finger should be the region where the interaction takes place and in order to evaluate this hypothesis, we construct different clones to map the regions of interaction (Figure 2).

All constructions were tested for autonomous activation of the genes reporter: HIS3 and LacZ prior to conformation assays. We found that PLZF 2-3-4-5-6 do not present autoactivation activity which is observe for construction PLZF-1.

We found that all the clones that have the zinc finger domain, except for PLZF-4, present positive results in activation test of the HIS3 genes reporter. The absence of interaction between PLZF-4 and SEPT10 could be due to the presence of the unstructured domain that blocks PLZF and SEPT10 interaction (Figure 2).

The necessity of zinc finger domain for PLZF and SEPT10 interaction is confirmed by no positive results detected in assays with PLZF-1. PLZF-3 and PLZF-5 seem to interact very weakly with SEPT10 once it was not detected in filter β -galactosidase assay (Figure 2).



Figure 2 – Mapping the regions needed to the interaction using different PLZF deletion constructs fused to pACT. Schematic view of full lenght PLZF and truncate constructions tested for interaction with septin 10 and results of three different transactivation assays.

In vitro confirmation of interaction of PLZF and sept10

The interaction between human septin 10 and PLZF was confirmed by pull down assay. Figure 3 shows a positive band in western blot assay performed with anti-HIS. This positive band was found in the lane representing proteins eluted in GSTrap column. The presence of HIS-PLZF in the eluted fraction from a GST affinity chromatography is possible due to the interaction between both proteins. The presence of recombinant SEPT10 in the same lane was confirmed by anti-GST western blot analysis.



Figure 3. *In vitro* confirmation of the interaction between PLZF and SEPT10 by pull down assay between full-lenght 6xHis-PLZF and GST-SEPT10. Purified SEPT10-GST was incubated with soluble extract of PLZF induction. The sample was purified by affinity chromatography using a GStrap column (Invitrogen), and the fractions submitted to western blot analysis. Positive band was found in the lane representing proteins eluted in GSTrap column. Western blot using mouse anti-HIS (A) or anti-GST (B) as primary antibody. (C) shows a control sample.

Septin 10 is a cytoplasmatic filamentous protein and co-localizes with PLZF in HeLa cells.

Using tree cell lineages to study the cellular localization pattern of SEPT10, we detected endogenous SEPT10 only in HeLa cells, and not in COS7 cells or HEK293 cells. Immunocytochemistry assays reveal that the endogenous PLZF and SEPT10 are located mainly in the cytoplasm and show perfect merge (Figure 4). In some cells the existence of small SEPT10 filaments are observed, as showed in figure 4A. Co-localization of both proteins in cytoplasm and in a perinuclear dot is shown in Figure 4E.

Discussion

Human septin 10 belongs to septin family and as such presents a GTPase domain flanked by a N-terminal and a long C-terminal with a coiled-coil domain. In this work we show that SEPT10 is able to form filamentous structure in cytoplasm. Homo filaments of septins were previously described for SEPT11 (Hanai *et al*, 2004), SEPT2 (Huang *et al*, 2006), SEPT12 (Ding *et al*, 2007), SEPT4 (Garcia *et al*, 2007) and SEPT6 (Ding *et al*, 2007). Filaments composed of different septins such as SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Sirajuddin *et al*, 2007; Low & Macara, 2006) and SEPT7-SEPT9-SEPT11 (Nagata *et al*, 2004) were also described but the exactly role of septin filaments are not known yet. What seems common to all the filaments observed is the interdependence between GTP binding and filamentous formation.

The septins are located in three main regions in the cell of fungi and animals: (a) projection at the tip, base, or throughout, (b) partitions between cells and (c) whole cells in the periphery or throughout in a punctate, filamentous or cytoplasmic pattern (Lindsey & Momany, 2006). Septins found in filamentous pattern in the cytoplasm are thought to co-localize with actin or tubulin; and to have a role in cytoskeleton organization (Lindsey & Momany, 2006).

Even if SEPT10 is expressed in filamentous pattern in the cytoplasm, this protein seems, at least in the conditions tested in this work, to not interact neither with actin nor tubulin. SEPT10 interacts with ZBTB16 also named as Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein. PLZF is



Figure 4. Subcellular localization of endogenous Sept10 and PLZF in HeLa cells. A - Sept 10 cellular marcation reveals small filaments. B - Septin10 colocalizes with PLZF in the cytoplasm of HeLa cells. Nucleus was counterstained with Hoechst (blue).

А

a sequence specific transcriptional repressor whose functions are not fully understood. The repression activity is mediated by BTB and central repression domains (Li *et al*, 1997; Melnick *et al*, 2000) through direct or indirect interaction with NcoR, SMRT, HDAC and mSin3 (David *et al*, 1998; Hong *et al*, 1997; He *et al*, 1998; Grignani *et al*, 1998; Guidez *et al*, 1998; Lin *et al*, 1998).

PLZF down-regulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Shi & Vogt, 2009). Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are a family of Ser/Thr protein kinases widely conserved among eukaryotes and are involved in many cellular processes such as cell proliferation, cell differentiation, cell movement and cell death. Recently, the first report linking human septins and MAPK pathway shows that up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes JNK by delaying its degradation, suggesting a novel functional role of SEPT9_v1 in driving cellular proliferation of mammary epithelial cells (Gonzalez *et al*, 2009). In yeast cells, Shs1p, homolog to human septin 1 and Cdc10p, a homolog to SEPT7, are able to interact with Ssk2p, a mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) (Yuzyuk & Amberg, 2003).

PLZF repression is regulated by CDK2, which trough phosphorylation of PLZF triggers its ubiquitination and subsequent degradation (Costoya *et al*, 2008). Cdc2 is another protein that is able to bind PLZF trough its zinc finger domain. Cdc2 is able to phosphorylate PLZF and may promote transcriptional repression or DNA binding though PLZF's Zinc Finger Domain (Ball *et al*, 1999).

Mapping the regions of PLZF that could be the site of interaction with SEPT10, we found that zinc finger domain is essential to PLZF interact with SEPT10. PLZF and SEPT8 shares hPFTAIRE1 protein, a Cdc-2 related kinase family highly expressed in post mitotic cells, as partners (Yang *et al*, 2002; Gao *et al*, 2006). PLZF might be a substrate of hPFTAIRE1 (Gao *et al*, 2006) and SEPT8 may play important roles in functional regulation of hPFTAIRE1 (Yang *et al*, 2002).

The exact role of PLZF in SEPT10 behavior, or vice-versa, is not known. Co-localization assays of PLZF and SEPT10 provide some insights about the probable role of PLZF in SEPT10 behavior.

SEPT10 in punctuate pattern in the cytoplasm of the cell is able to co-localize with PLZF. Interestingly, SEPT10 in filamentous pattern do not co-localize with PLZF in vivo. So PLZF might regulate SEPT10 polymerization in vivo. Some interactions among septins and other proteins are important to maintain septin filaments. SEPT9 binds directly to polymerized tubulin and this interaction is important for the formation of septin filament structures containing SEPT9 (Nagata *et al*, 2003). Conditions that disrupt the microtubule network also disrupted the SEPT9-containing filament structure, resulting in a punctuate cytoplasmic pattern. Spiliotis *et al*, 2008). In other cases septin filaments are necessary for the binding of other proteins as for Borg3 that binds specifically to a septin heterodimer SEPT6-SEPT7 (Sheffield *et al*, 2003).

Two hybrid screen using septins as bait were previously performed for SEPT5 (Blaser *et al*, 2006), SEPT8 (Blaser *et al*, 2004), SEPT9 (Nagata & Inagaki, 2005), SEPT14 (Peterson *et al*, 2007) but there was no report of an interaction with SEPT10. This is the first time that a protein is found as a partner for SEPT10. In this work we have mapped the interaction between SEPT10 and PLZF in vitro and also done co-localization assays in vivo. We speculated about the possible roles of this interaction suggesting that PLZF could regulate SEPT10 polymerization. However further studies are necessary for understanding the functions of SEPT10 in human cells as well as the PLZF influence in SEPT10 behavior.

References

- 1- Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. Exp Cell Res(1971).
- 2- Kremer BE; Adang LA Macara IG Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. Cell (2007) 130 (5):837-850

- 3- Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. Genes Dev. (1997) 11(12):1535-47.
- 4- Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, De Virgilio C, Pringle JR. The septins: roles in cytokinesis and other processes. Curr Opin Cell Biol. (1996) 8(1):106-19.
- 5- Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. Science. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation.(2005) 18;307(5716):1781-5.
- 6- Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M, Kinoshita M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. Dev Cell. (2005) 8(3):343-52.
- 7- Kissel H, Georgescu MM, Larisch S, Manova K, Hunnicutt GR, Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. Dev Cell. (2005) 8(3):353-64.
- 8- Spiliotis ET, Nelson WJ. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. J Cell Sci. (2006) 119(Pt 1):4-10.
- 9- Xue J, Tsang CW, Gai WP, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JA, Robinson PJ. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. J Neurochem. (2004) 91(3):579-90.
- 10-Sui L, Zhang W, Liu Q, Chen T, Li N, Wan T, Yu M, Cao X. Cloning and functional characterization of human septin 10, a novel member of septin family cloned from dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun. (2003) 2;304(2):393-8.
- 11- Melnick A, Ahmad KF, Arai S, Polinger A, Ball H, Borden KL, Carlile GW, Prive GG, Licht JD. In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. Mol Cell Biol. (2000) 20(17):6550-67
- 12- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. Mol Cell Biol. (1998) 18(9):5533-45.
- 13- Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. Oncogene. (1999) 28;18(4):925-34.

- 14- Melnick A, Ahmad KF, Arai S, Polinger A, Ball H, Borden KL, Carlile GW, Prive GG, Licht JD. In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. Mol Cell Biol. (2000) 20(17):6550-67.
- 15- Ahmad KF, Engel CK, Privé GG. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95(21):12123-8.
- 16- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Privé GG. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. Genome Biol. (2005);6(10):R82.
- 17- Collins T, Stone JR, Williams AJ. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains Mol Cell Biol. (2001) 21(11):3609-15.
- 18- Joberty G, Perlungher RR, Sheffield PJ, Kinoshita M, Noda M, Haystead T, Macara IG. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. Nat Cell Biol. (2001) 3(10):861-6
- 19-Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F., and Mitchison, T. J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins, DeV. Cell 3 (2002) 791-802.Surka et al, 2002 ;
- 20- Sheffield P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z., and Macara, I. G. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments, J. Biol.Chem. 278 (2003) 3483-3488
- 21- Vega IE, Hsu SC. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. Neuroreport. (2003) 20;14(1):31-7.
- 22-Nagata K, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. J Biol Chem (2004) 279(53):55895-904.
- 23-Kremer, B.E., Haystead, T., Macara, I.G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. Mol Biol Cell. (2005) 16(10):4648-59.
- 24- Nagata K, Inagaki M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. Oncogene. (2005) 24(1):65-76.

- 25- Low, C., and Macara, I. G. Structural analysis of septin 2, 6 and 7 complexes, J. Biol. Chem. 281 (2006) 30697-30706.
- 26-Macdonald P N. Two-Hybrid Systems Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey (2001) 99-106.
- 27-Hanai N, Nagataa K, Kawajiria A, Shiromizua T, Saitoha N, Hasegawab Y, Murakamic S, Inagakia M. Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11 FEBS Letters (2004)568: 83–88.
- 28- Huang, Y., Surka, M. C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C., and Trimble, W. S. GTP binding and hydrolysis of human septin2. FEBS J. (2006) 273, 3248-3260.
- 29-Ding X, Yu W, Liu M, Shen S, Chen F, Wan B, Yu L. SEPT12 interacts with SEPT6 and this interaction alters the filament structure of SEPT6 in Hela cells.J Biochem Mol Biol. (2007) 40(6):973-8.
- 30- Garcia W, Araujo APU, Lara F, Foguel D, Tanaka M, Tanaka T, Garratt, RC. Na intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeionβ) forms amyloid-like filaments in vitro. Biochemistry. 46 (2007) 11101-11109.Souza et al, to be published
- 31- Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, Stark H, Wittinghofer A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. Nature. 449, 7160 (2007) 311-315.
- 32- Lindsey R, Momany M. Septin localization across kingdoms: three themes with variations. Curr Opin Microbiol. (2006) 9(6):559-65.
- 33- Li X, Lopez-Guisa JM, Ninan N, Weiner EJ, Rauscher FJ 3rd, Marmorstein R. Overexpression, purification, characterization, and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein. J Biol Chem. (1997) 272(43):27324-9.
- 34-David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. Oncogene. (1998) 16(19):2549-56.
- 35- Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, Privalsky ML.SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. (1997) 94(17):9028-33.

- 36- He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, Pandolfi PP. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL Nat Genet (1998) 18(2):126-35.
- 37- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. Nature (1998) 391(6669):815-8.
- 38-Guidez F, Ivins S, Zhu J, Söderström M, Waxman S, Zelent A. Reduced retinoic acidsensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia.Blood. (1998) 91(8):2634-42.
- 39-Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. Nature (1998) 391(6669):811-4.
- 40- Shi J, Vogt PK. Posttranslational regulation of Myc by promyelocytic leukemia zinc finger protein. Int J Cancer (2009) 125(7):1558-65.
- 41- Gonzalez ME, Makarova O, Peterson EA, Privette LM, Petty EM. Up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. Cell Signal (2009) 21(4):477-87.
- 42- Yuzyuk T, Amberg DC.Actin recovery and bud emergence in osmotically stressed cells requires the conserved actin interacting mitogen-activated protein kinase kinase kinase Ssk2p/MTK1 and the scaffold protein Spa2p.Mol Biol Cell. (2003) 14(7):3013-26
- 43-Costoya JA, Hobbs RM, Pandolfi PP.Cyclin-dependent kinase antagonizes promyelocytic leukemia zinc-finger through phosphorylation. Oncogene. (2008) 27(27):3789-96.
- 44-Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. Nucleic Acids Res (1999) 27(20):4106-13.
- 45- Yang T, Gao YK, Chen JY.KIAA0202, a human septin family member, interacting with hPFTAIRE1. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). (2002) 34(4):520-5
- 46- Gao YK, Jiang M, Yang T, Chen JY.Analysis of the interaction between hPFTAIRE1 and PLZF in a yeast two-hybrid system. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). (2006) 38(3):164-70.

- 47-Nagata K, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, Kiyono T, Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. J Biol Chem (2003) 278(20):18538-43.
- 48- Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules.J Cell Biol (2008) 180(2):295-303.
- 49- Sheffield PJ, Oliver CJ, Kremer BE, Sheng S, Shao Z, Macara IG.Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. J Biol Chem (2003) 278(5):3483-8.
- 50-Bläser S, Röseler S, Rempp H, Bartsch I, Bauer H, Lieber M, Lessmann E, Weingarten L, Busse A, Huber M, Zieger B.Human endothelial cell septins: SEPT11 is an interaction partner of SEPT5. J Pathol (2006) 210(1):103-10
- 51-Bläser S, Horn J, Würmell P, Bauer H, Strümpell S, Nurden P, Pagenstecher A, Busse A, Wunderle D, Hainmann I, Zieger B. The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. Thromb Haemost (2004) 91(5):959-66.
- 52- Peterson EA, Kalikin LM, Steels JD, Estey MP, Trimble WS, Petty EM. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. Mamm Genome (2007) 18(11):796-807.

IV. RESULTADOS COMPLEMENTARES

4. Ensaios de cristalização

Com o objetivo de aumentar as chances de cristalização das septinas estudadas, três diferentes construções de um mesmo gene de septinas foram clonadas e expressas em *E. coli*. As construções que foram expressas na forma solúvel foram submetidas a testes para avaliar a estabilidade e enovelamento da amostra como dicroísmo circular, emissão de fluorescência e espalhamento dinâmico de luz e posterior testes de cristalização.

A tabela IV resume os resultados obtidos para cada construção de septina 6, 8 e 10 testada.

Proteína	Clona	gem	Expressão	Purificação	Dicroísmo circular	Dynamic Light scattering	Fluorescência	Cristalização
	PGEM	PET				stattering		
Septina 6I	x	х	Solúvel	Х	Х	Х	х	Х
Septina 6GC	X	х	Solúvel	х	х	Х		х
Septina 6G	x	Х	Solúvel	х	х	х	х	х
Septina 8I	x	Х	Solúvel	х				
Septina 8GC	X	Х		х	х	х	х	х
Septina 8G	х	Х	Insolúvel					
Septina 10I	x	Х	Não expressou					
Septina 10GC	X	Х	Não expressou					
Septina 10G	Х	х	Não expressou					

TABELA IV. RESUMO DOS TESTES REALIZADOS COM SEPT6, SEPT8 e SEPT10

*X representa teste realizado, Septina nI representa septina inteira, Septina nG representa domínio GTPase e Septina nGC representa domínio GTPase + C-terminal. Os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas mostraram que as amostras possuem uma heterogeneidade que pode influenciar na etapa de cristalização. Para evitar a presença deagregados, as amostras submetidas à cristalização foram previamente centrifugadas a 110000 rpm por 60 minutos.

4.1. Testes de cristalização com septina 6

Testes iniciais de cristalização com as construções SEPT6I (8 mg/mL, 4 mg/mL), SEPT6GC (3 mg/mL) e SEPT6G (10 mg/mL, 6 mg/mL, 3 mg/mL) foram realizados com seis kits diferentes disponíveis no ROBOLAB do LNLS.

Três condições mostraram a presença de cristais nos testes de cristalização com SEPT6I, no entanto, após a analise de difração no gerador de raios X de anodo rotatório (RAR), foi observado que apenas um cristal poderia ser de proteína (padrão sem difração), os outros eram cristais de sal. Esta condição foi refinada (tabela V) a fim de obter um padrão de difração que possibilite a resolução da estrutura. Cristais bem formados e de tamanho adequado apareceram na seguinte condição, 500.000 mM Sodium/Potassium phosphate/Sodium/Potassium phosphate pH: 7.5 e 35.000 %v/v PEG-400, mas quando levado à linha MX1 do LNLS estes cristais não difrataram (Figura 18).

TABELA V. REFINAMENTO I DE CRISTAIS DE SEPT6I

	K2H	phosphate/	Na	H2	PEG 400
	phospl	hate			
Refinamento I SEPT6I	50-600) mM			0-35%



Figura 18. Cristais de septina 6.

Um refinamento mais minucioso desta condição foi realizado segundo os parâmetros indicados na tabela VI.

TABELA VI. CONDIÇÕES DE REFINAMENTO DE SEPT6I.

		PEG	K2H	phosphate/	рН
			Na H2	phosphate	
Refinamento	Π	33-38%	400 mN	M – 550 mM	7,4 - 7,5
SEPT6I					

Cristais cresceram em diversas condições e eles foram levados à linha MX2 do LNLS e seu padrão de difração era condizente com um cristal de sal.

Após o teste inicial de cristalização de SEPT6G, oito condições que produziam cristais foram observadas. Quando levados à linha MX1 do LNLS, apenas três cristais não difrataram e cinco apresentaram padrão de difração condizente com um cristal de sal. Os três cristais que não difrataram foram refinados para obtenção de melhores cristais.

Com o refinamento, cristais maiores foram obtidos, levados à linha MX1 do LNLS e difrataram,

mas eram cristais de sal.

Durante o desenvolvimento deste projeto de doutorado, a estrutura da septina 6 em complexo com a septina 2 e 7 foi resolvida a 4.0 Å de resolução por Sirajuddin *et al*, 2007. A esta resolução, o modelo construído não é de excelente qualidade, ficando alguns detalhes sem serem visualizados. Com o objetivo de tentar obter cristais que difratassem numa melhor resolução, uma purificação da construção SEPT6G em tampão como o descrito por Sirajuddin *et al*, 2007 foi realizada. Testes de cristalização baseado na condição de cristalização da septina 2 (5% polyethylene glycol 6000, 0.1M bicine pH 9.0 and 0.1M Glycine) (tabela VII) foram realizados após a purificação.

TABELA VII. REFINAMENTO DE SEPT6G

	PEG 6000	Bicina pH 9,0	Glicina	
Refinamento 1	0-15%	0-0.3 M	0-0,3 M	

Obtivemos alguns cristais, no entanto de tamanho insuficiente para serem testados na linha de luz síncrotron ou gerador (Figura 19).



Figura 19. Cristais obtidos a partir do refinamento descrito na tabela VII.

Um *screening* utilizando aditivos foi realizado utilizando como base esta condição. O kit de aditivos é uma biblioteca de pequenas moléculas que podem afetar a solubilidade e cristalização de macromoléculas biológicas. Essas pequenas moléculas podem perturbar e manipular as interações amostra-amostra e amostra-solvente, assim como a estrutura das moléculas de água e assim alterar ou/e melhorar a solubilidade e cristalização da amostra. Os aditivos podem ainda estabilizar moléculas biológicas através de interações específicas com a mesma. No entanto, a utilização de kits de aditivos não mostrou melhoras significativas.

Testes de cristalização com aditivos foram realizados a 18 e 4ºC para verificar se a baixas temperaturas os resultados eram distintos e melhores. Mas não foi verificada nenhuma mudança, ou seja, os cristais continuaram pequenos.

Testes de cristalização de SEPT6G utilizando PEG 6000 screen (Hampton Research) também foram realizados a 4 e 18°C. Com estes testes pretendia-se verificar a influência da temperatura, pH e concentração de precipitante na cristalização da septina 6, porém, os cristais continuaram pequenos.

4.2 Testes de cristalização com septina 8

A partir do screening inicial de cristalização de SEPT8GC, a presença de cristais em duas condições foi observada:

1) 100 mM Tris-HCl pH 8,5 / 20% PEG 2000 MME / 200 mM MgCl₂,

2) 100 mM Tris HCl pH 8.5, 20% PEG 2000 MME, 200 mM Triethykamine N-oxide (Figura 20).

Izit Crystal DyeTM (Hampton Research), um produto azul que se difunde pela gota, foi adicionado à condição 2. Este corante pode entrar pelos canais de solvente presentes nos cristais de proteínas, mas

não presentes nos cristais de sal. O ganho de coloração azul pelo cristal pode indicar que ele é formado de proteína.



Figura 20. Cristais de SEPT8GC. Antes (a) e após (b) adição de Izit Crystal DyeTM (Hampton Research).

Os cristais crescidos na condição 2 se coraram pelo IZIT, indicando a presença de cristais de proteína. Estes cristais eram muito pequenos para análise da difração no gerador ou linhas de luz síncrotron.

O primeiro ciclo de refinamento consistiu na elaboração de ensaios de cristalização que permitissem a avaliação da influência da concentração dos agentes precipitantes e do pH na nucleação, crescimento e morfologia dos cristais. No primeiro refinamento foi variada a concentração de PEG, triethylamine N-Oxide e o pH, conforme a tabela XII.

TABELA VIII. REFINAMENTO I DE SEPT8GC

	PEG	Triethylamine N-Oxide	рН
Refinamento	10 a 40 %	0 a 300 mM	7.5 a 10
condição 1			

Foi observado que as condições onde cresciam cristais, estes eram muito pequenos. Portanto, técnica de "*microseeding*" foi utilizada com o objetivo de separar a região de nucleação da região metaestável.

A técnica de "*microseeding*" foi aplicada em uma das condições mencionadas acima (100 mM Tris base/HCl pH 8.5, 20% PEG-200 300 mM triethylamine N-oxide dihydrate). Para tanto, cristais de sept8GC, crescidos nessa condição, foram transferidos com o auxílio de um "*cryoloop*" sintético (Hampton Research) ou de um capilar de vidro (Hampton Research) para o tubo "*SEED BEAD*" (Hampton Research), contendo 50 μ L da condição de cristalização (solução estabilizadora). Este tubo foi vortexado por 20 min para se moer o cristal, originando, assim, um estoque de microcristais (sementes), de acordo com o método proposto por Luft e DeTitta (Luft & DeTitta, 1999). A partir desse estoque, realizou-se uma diluição 1:10³ e estas sementes foram adicionadas à gota contento solução do reservatório e solução de proteína (10 mg/mL).

Cristais melhores formados foram obtidos, mas estes não tinham tamanho o suficiente para serem submetidos à fonte de raios X. A técnica de "*steak-seeding*" foi realizada utilizando bigode de gato para o espalhamento das sementes.

Nas duas técnicas não observamos cristais do tamanho desejado, mas pôde-se verificar que a região metaestável fica por volta de 14% de PEG, portanto maiores diluições de sementes foram realizadas e submetidas a esta condição.

Apesar da diluição da semente em ate 10⁻⁹ vezes não conseguimos obter cristais de tamanho adequado para testes de difração.

4.3 Screening de solubilidade

Para a obtenção de cristais de boa qualidade que resultem em uma boa difração é necessário aumentar a solubilidade e homogeneidade das proteínas em estudo. O fato das septinas estudadas agregarem com facilidade ou formarem filamentos de tamanhos distintos torna o processo de cristalização bastante difícil, gerando estes cristais mal formados e pequenos.

Um *screening* de solubilidade foi realizado para a obtenção de soluções que possam melhorar a solubilidade e interromper a formação de filamentos resultando em uma amostra homogênea que facilite o processo de cristalização.

Para tanto, SEPT6GC, SEPT6G, SEPT8I e SEPT8GC foram purificadas e submetidas a um *screening* de solubilidade. Neste *screening*, 48 condições foram testadas (Tabela IX), objetivando a busca de uma solução onde a proteína ficasse solúvel, homogênea e monodispersa.

O resultado mais expressivo de aumento de solubilidade foi verificado com a adição de 0,1% de Nonidet-P40 à solução contendo SEPT6G (Figura 21). Este detergente foi adicionado a todos os tampões de purificação e a proteína purificada nesta condição foi submetida a testes iniciais de cristalização, em diferentes concentrações de proteína (10, 6 e 4 mg/mL).

Cristais cresceram em 41 condições, os cristais de tamanho adequado foram levados à linha de luz MX1 e os demais corados com IZIT, mas em nenhuma das técnicas obteve-se resultados conclusivos.

Resultados complementares



Figura 21. Resultado do *screening* **de** solubilidade com as septinas 6 (SEPT6G e SEPT6GC) e 8 (SEPT8I e SEPT8GC). Os números que compõe o eixo X referem-se à aditivos descritos na tabela IX e o eixo Y ao número de vezes que a amostra mostrou-se mais solúvel que o controle.

Refinamentos foram realizados para a obtenção de cristais de tamanho adequado para análise da difração nas linhas de luz do LNLS, cristais maiores cresceram e foram levados à linha de luz MX1 do LNLS para testes de difração e mostraram padrões de difração condizentes com cristais de sal.

TABELA	IX.	CONCENTRAÇÕES	DOS	ADITIVOS	UTILIZADOS	NO	SCREENING	DE
SOLUBIL	IDA	DE.						

	Aditivos	Concentração
1	$MgSO_4$	0,25 M
2	$(NH4)_2SO_4$	0,2 M
3	Na_2SO_4	0,15 M
4	NaCl	0,1 M
5	NaCl	0,3 M
6	NaCl	0,5 M
7	NaCl	0,7 M
8	NaCl	1,0 M
9	KCl	0,1 M
10	KCl	0,3 M
11	KCl	0,5 M
12	KCl	0.7 M
13	KCl	1.0 M
14		0.15 M
15	Urea	0.1 M
16	Urea	0.3 M
17	Urea	0.5 M
18	Urea	0,5 M
10	Urea	1.0 M
20	Glicina	1.5 %
20	L Arginina	0.1 M
21	L-Arginina L-Arginina	0,1 M 0.5 M
22	L-Arginina L-Arginina	1 M
23		2 M
24	L-Arginina	2 M
25	L-Arginina	5 M
20	L-Alginnia Sucroso	4 M
27	Sucrose	0.1 M
20	Sucrose	0,5 M
29	Sucrose	0,5 M
21	Chasse	0,7 M
31	Glucose	0,1 M
32	Glucose	0,5 M
33	Glucose	0,5 M
34	Glucose	0,7 M
35	Glucose	1,0 M
36	Glucose	1,5 M
37	Lactose	0,3 M
38	Glicerol	5%
39	Glicerol	10 %
40	Glicerol	20 %
41	Glicerol	30 %
42	Nonidet P-40	0,1 %
43	Nonidet P-40	0,5 %
44	Tween 20	$1 \mu M$
45	Tween 20	2 µM

4.4 Metilação redutiva de lisinas

À temperatura e pressão constantes, a equação que demonstra se uma dada reação é favorável ou não é descrita por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde ΔG é energia livre de Gibbs, ΔH é a variação de entalpia e ΔS , a variação de entropia.

No processo de cristalização, a variação de entropia é determinante para que o processo aconteça, já que durante formação de cristais não há a formação de ligações covalentes e conseqüentemente a variação de entalpia é dada por valores pequenos próximos a zero. A entropia está relacionada com o grau de desordem das moléculas, visto que o processo de cristalização não tem como finalidade promover a desordem da proteína, a participação entrópica do solvente é importante para que a variação de entropia seja positiva e a reação favorável (ΔG negativo). Levando em consideração a importância de ΔS do solvente, podemos re-escrever a equação da energia livre de Gibbs da seguinte forma: $\Delta G = \Delta H - T(\Delta S$ solvente + ΔS proteína).

Foi observado experimentalmente que ao redor da proteína existe uma camada estruturada de solvente que é perdida durante o processo de cristalização com a liberação de moléculas do solvente próximos a proteína para a solução. Com a perda de uma molécula de água, há um ganho entrópico de aproximadamente 22 Jmol⁻¹K⁻¹ que é importante no processo de cristalização (Derewenda & Vekilov, 2006). Aminoácidos como lisina, ácido glutâmico e glutamina possuem cadeias laterais grandes que podem atrapalhar a estruturação do solvente ao redor da proteína, portanto a modificação de resíduos destes aminoácidos para aminoácidos com cadeias laterais menores como alanina, por exemplo, facilitaria a estruturação do solvente ao redor da proteína, aumentando o número de moléculas de água na camada de solvatação. Com isso, durante o processo de cristalização haveria um maior ganho entrópico devido a um maior número de moléculas de água ser deslocado favorecendo a cristalização
da proteína.

Um modelo da estrutura da septina 8 foi construído por homologia à estrutura disponível da septina 6 (Figura 22). A busca por resíduos de lisina, arginina, ácido glutâmico e glutamina (aminoácidos com cadeias laterais extensas) foi realizada e mostrou que a estrutura da septina 8 e da septina 6 possuem muitos destes resíduos em sua superfície.



Figura 22. Estrutura de septinas humanas 8 e 6. Resíduos de lisina, arginina, ácido glutâmico e glutamina em realce. Azul: Septina 6 (PDB ID: 2QAG). Verde: Septina 8 (modelo construído por homologia).

Para a construção do modelo foi utilizado o programa MODELLER (copyright © 1989-2010 Andrej Sali), este programa é utilizado para a modelagem por homologia de estruturas tridimensionais de proteínas. O programa automaticamente constrói um modelo baseado na análise de um alinhamento de sequências entre a proteína para a qual se deseja construir o modelo e uma proteína relacionada cuja estrutura tridimensional já foi resolvida A qualidade do modelo pode ser avaliada, por exemplo, através de gráficos e tabelas que analisam restrições químicas e físicas de cada átomo constituinte do modelo.

O domínio GTPase da estrutura da septina 6 (2QNG cadeia B) foi utilizada como molde para construção da estrutura da septina 8. Estas estruturas possuem 98% de similaridade entre si. O grande número de resíduos na superfície dificulta a seleção de sítios específicos para a mutagênese sítio dirigida, uma vez que um maior número de resíduos pode dificultar a cristalização desta proteína. Para resolver este problema, utilizamos a técnica de modificação química de superfície de proteínas.

Assim como a mutagênese sítio dirigida, esta técnica também é utilizada para reduzir a entropia de superfície e foi primeiramente realizada para a cristalização de um fragmento de miosina (Rayment *et al.* 1993). Esta abordagem oferece várias vantagens: 1) a clonagem, expressão e purificação da proteína mutada não é realizada; 2) a alteração da proteína nativa evita induzir erros de enovelamento das cadeias polipeptídicas em síntese; 3) apenas os resíduos sobre a superfície exposta da proteína são modificados e não os enterrados nas interfaces proteína-proteína. No entanto, o método pode indiscriminadamente agir sobre resíduos que possam ser cruciais para a função biológica da proteína.

Dentre as técnicas de modificação química conhecidas, a mais comum e utilizada neste projeto é a metilação redutiva de lisinas. Diante da grande produção de SEPT8GC recombinante em relação aos demais clones, este foi selecionado para os testes iniciais de modificação de superfície para a obtenção de cristais. Esta metodologia leva à precipitação de uma fração protéica, por isso a necessidade de uma alta concentração inicial de proteína.

SEPT8GC purificada foi submetida à metilação redutiva de lisinas e uma solução à 4 mg/mL foi submetidas aos testes iniciais utilizando dois kits inicias disponíveis no LNLS. O crescimento de um

cristal foi observado (Figura 23), mas nenhuma difração foi observada quando o cristal foi submetido aos raios X na linha MX1 do LNLS.



Figura 23. Cristal obtido em testes iniciais de cristalização com os domínios GTPase+C-terminal da septina 8 humana.

4.5 SAXS

As coletas de dados de SAXS foram realizadas na linha de luz D11A-SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O comprimento de onda utilizado em todos os experimentos foi _ = 1, 488°A. O tratamento dos dados bidimensionais e integração das contagens sobre a região detectada para obtenção de uma curva de espalhamento unidimensional foi utilizado o programa FIT2D [Hammersley, copyright 1987 - 2005]. O tratamento dos dados foi realizado no programa PRIMUS [KONAREV *et al.*, 2003]. O cálculo da função p(r) para todas as curvas de intensidade de espalhamento foram obtidas utilizando o programa GNOM [SVERGUN, 1992]. Esse programa realiza uma transformada de Fourier dos dados experimentais de espalhamento e fornece a função p(r) a partir de um ajuste da curva de espalhamento. Ele também fornece o valor do raio de giro e o valor da máxima dimensão da partícula. Os dados de raio de giro e máxima dimensão de partículas utilizando as estruturas resolvidas 2QNR.pdb e 2QA5.pdb foram obtidos usando o programa CRYSOL(SVERGUN, BARBERATO & KOCH, 1995). Os valores teóricos e experimentais comparados e o modelo de SAXS construído utilizando o programa DAMMIN (SVERGUN, 1999).

Os resultados nos mostram que os envelopes de SEPT6G, SEPT8GC e SEPT11GC correspondem a um trímero, dímero e monômero de septinas, respectivamente (Figura 24).



Figura 24. Resultados de SAXS.

5. O papel da ligação de GTP na formação de filamentos de septina 6

Visando obter dados que ajudem a esclarecer o papel estrutural e funcional da ligação e

hidrólise de GTP pela septina 6, os seguintes experimentos foram realizados.

A seqüência inteira (SEPT6I), o domínio GTPase (SEPT6G) e o domínio GTPase + C-terminal (SEPT6GC) desta septina foram amplificadas a partir de um clone fornecido pelo *Kazusa DNA Research Institute* (clone KIAA 0128). As construções da septina 6 (I, GC e G) mostraram-se solúveis nos testes de expressão em diferentes temperaturas em *E. coli* BL21(DE) Δ SLyD e foram purificadas utilizando coluna HiTrap chelating HP (GE Healthcare Life Sciences), previamente carregadas com solução de NiSO₄ 100 mM (Figura 25).



Figura 25. Purificação de septina 6. A- SEPT6I, B- SEPT6G, C-SEPT6GC.

Devido ao alto rendimento da expressão de SEPT6G, os testes seguintes foram realizados com esta construção.

5.1. Ensaio de ligação a GMP- agarorose

Para o teste de ligação de septina 6 à GMP ligado a agarose, 50 μ M de proteínas foram incubados por 90 minutos com solução contendo GMP-agarose 4% (SIGMA ALDRICH). Transcorridos os 90 minutos, a solução foi centrifugada por 18510 g durante 30 segundos. O sobrenadante foi aliquotado e o pellet lavado duas vezes em solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e MgCl₂ 10 mM. Após as lavagens, pellet e sobrenadante foram analisados por eletroforese em gel de

poliacrilamida 13%. Resina incubada com solução tampão foi utilizada como controle.

Os resultados mostram que a septina 6 é capaz de se ligar ao GMP (Figura 26). A capacidade da septina ligar GTP e GDP já foi demonstrada anteriormente. No entando, o papel desta ligação na estrutura e/ou função desta septina não é conhecida. A molécula de GMP difere do GTP pela ausência dos fosfatos β e γ em sua estrutura. Desta forma estudos mostrando a estabilidade de septinas na presença de GMP podem sugerir o papel estrutural da ligação do anel de guanina presente tanto em GTP, GDP e GMP.



Figura 26. Ensaio de ligação de septina 6 ao GMP. C- reação controle (resina incubada com solução tampão), SN- proteína encontrada no sobrenadante da reação, AG= proteína encontrada ligada a GMP agarose.

5.2. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Para a obtenção dos espectros de dicroísmo circular, a proteína purificada foi dialisada contra um tampão contendo 10 mM NaH₂PO₄ e 10 mM MgCl₂. O espectro de CD foi coletado usando espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco corporation, Tókio, Japão), sendo a temperatura mantida a 20°C através de um *Peltier Type Control System PFD425S* (JASCO). Todos os dados foram coletados usando cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Mediu-se a elipticidade em graus na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm, com uma velocidade de 100 nm/min, sendo feitas no total 20 leituras com resposta de 1 segundo em varredura contínua. Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipticidade molar por resíduo ([θ]MRW), em miligraus.cm2.dmol-1, de acordo com Adler *et al.*,1973.

A deconvolução dos dados não mostra diferença entre o espectro da amostra incubada com GTP e da amostra sem nucleotídeo, mas apresentam maior porcentagem de fitas β que o esperado (Figura 27). Garcia *et al*, 2007 mostram um intermediário de SEPT4G rico em fita β obtido na ausência de nucleotídeo ligado e que parece formar fibras amilóides. Estes resultados não permitem concluir que a septina 6 é capaz de formar fibras amilóides e que outros estudos são necessários para esta conclusão. No entato, até o momento, o aumento de estruturas beta está apenas associado à formação de fibras amilóides.



Figura 27. Espectro de dicroísmo circular de SEPT6G purificada com (SEPT6G+GTP) e sem (SEPT6G) GTP.

5.3. Desenovelamento térmico

A desnaturação térmica da septina 6 purificada com e sem GTP mostrou a que a molécula apresenta 2 estados: enovelado e desnovelado, com estados intermediários ausentes.

Para a construção de um gráfico (Figura 28) mostrando a fração enovelada em função da temperatura foi utilizada a seguinte equação:

$$\alpha = (\theta t - \theta u) / (\theta f - \theta u)$$

Onde a fração enovelada em uma dada temperatura é α , θ t é a elipsidade observada em certa temperatura, θ f é a elipsidade da forma totalmente enovelada e θ u, a elipsidade da forma totalmente desenovelada.



Figura 28. Desnaturação térmica de SEPT6G purificada com (SEPT6G+GTP) e sem GTP (SEPT6G).

Analisando a figura 27 vemos que SEPT6G quando ligada ao GTP é menos susceptível a ação da temperatura, tendo no final do desnovelamento térmico uma maior fração no estado enovelado que a septina 6 sem GTP ligado. Verifica-se também que a T_m (temperatura de melting) de 37°C para SEPT6G e 54°C para sept6G+GTP. Nessa temperatura 50% das moléculas estão no seu estado enovelado e 50% no seu estado desnovelado.

A T_m de SEPT6G é mais baixa que quando esta proteína está ligada ao GTP, indicando que a presença do nucleotídeo é importante no enovelamento da molécula e na susceptibilidade a temperatura.

5.4 Espectroscopia de fluorescência

Medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro *steady-state* K2 ISS acoplado a um refrigerador. A excitação de triptofano foi realizada a 295 nm. O espectro de emissão de triptofano foi analisado nos intervalos de 310 a 450 nm. As proteínas possuem três fluoróforos intrínsecos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Além do rendimento quântico do triptofano ser o melhor dos três, a septina 6 possui apenas um triptofano que é uma sonda útil para estudar sua conformação.

Análise da estrutura de septina 2 mostra que a região de ligação entre dímeros de septina 2 ocorre numa interface onde o triptofano da molécula está presente (Figura 28).



Figura 28. Triptofano presente na estrutura da septina 2. Fonte: Sirajuddin et al, 2007.

Portanto é de se esperar que o espectro de fluorescência tenha um pico em torno de 330 nm, que corresponde ao pico de emissão de fluorescência do triptofano em solvente polar quando no interior da proteína, caso a exista oligomerização de SEPT6G. O centro de massa do espectro de fluorescência de SEPT6G previamente incubada com GTP foi de 337,13 nm e para a amostra de SEPT6G sem incubação com GTP 321,8 nm.

O *blue shift* observado na amostra SEPT6G não incubada com GTP pode ser devido ao fato de que cargas negativas próximas ao terminal pirrol do anel do triptofano desviam o comprimento de onda para comprimentos maiores, sendo que o oposto é observado para ausência de cargas negativas

próximas a triptofano (Vivian & Callis, 2001), por tanto a ausência de GTP aliado a provável formação de agregados de septinas na ausência de GTP pode ser responsável pelo *blue shift* observado.

5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para analisar a formação de filamentos pela septina 6, foram realizados experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. A amostra depositada em grade de cobre e carbono foi ______ incubada com uma solução de acetato de uranila 1% por 5 minutos. Após este período, a grade foi lavada em solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e MgCl₂ 10 mM. As amostras foram submetidas à análise em microscópio Philips CM 120 na Universidade Federal de São Carlos.

As imagens obtidas não foram satisfatórias, pois mostram moléculas aparentemente agregadas (Figura 29). As amostras foram congeladas antes do tratamento para microscopia eletrônica e talvez isto possa ter influenciado no estado de agregação da amostra.



Figura 29. Experimento de microscopia eletrônica de transmissão. A- septina 6 purificada com GTP; B- septina 6 purificada sem GTP e C- septina 6 purificada com GTP e pré aquecida a 37°C.

Algumas mudanças no preparo das amostras para a análise por MET foram realizadas. A amostra depositada em grade de cobre revestida com filme de carbono foi incubada com uma solução de gluteraldeído 0,05% por 5 minutos para a fixação da amostra. Posteriormente a grade contendo a amostra foi incubada com solução de acetato de uranila 1% por 5 minutos. Após este período, a grade foi lavada em solução contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM MgCl₂.

As amostras descritas na tabela X foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 9063 na Universidade Estadual de Campinas.

Amostra	Conteúdo
1	Septina 6
2	Septina 6 + GTP
3	Septina 6 + 600 mM NaCl
4	Septina 6 + GTP + 600 mM NaCl

TABELA X. AMOSTRAS ANALISADAS POR MET.

A microscopia eletrônica de transmissão mostra que Septina 6 é capaz de formar fibras mesmo na ausência de seu domínio C-terminal (Figura 30A). A amostra sem nucleotídeo apresenta agregados de proteínas (Figura 30B).



Figura 30. Microscopia eletrônica de transmissão. A- SEPT6G+GTP, B-SEPT6G sem incubação prévia com GTP.

Sirajuddin *et al*, 2008, mostram imagens de MET de um hexâmero composto pelas septinas 2, 6 e 7. A septina 7 está presente na extremidade de hexâmero e não interage com nenhuma outra septina apesar de possuir uma interface disponível para interação. Uma das justificativas dos autores para isto foi a presença de 600 mM de NaCl na condição submetida a MET, cuja alta força iônica impedia a interação nesta região. Com base nestes dados, amostras de septina 6 com ou sem GTP e contendo 600 mM de NaCl em seu tampão foram submetidas a MET mas devido a precipitação salina não foi possível a obtenção de boas imagens.

V. CONCLUSÕES

- Três construções do gene *sept8* foram clonadas para expressão em *E. coli*. O teste de expressão mostrou que a construção SEPT8GC era expressa em maior concentração que as demais. SEPT8GC foi expressa em larga escala, confirmada por espectrometria de massa e caracterizada por dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. SEPT8GC foi expressa corretamente enovelada e mostra-se estável até 40°C apresentando T_m de 54°C. O espectro de emissão de fluorescência por esta proteína mostra 2 picos de emissão, que pode sugerir a presença de diferentes oligômeros na amostra. Resultados de filtração em gel e DLS confirmam esta hipótese e sugerem que a septina 8 forma dímeros ou trímeros em solução.
- Septinas 2, 6, 8 e 11 são capazes de ligar GTP em diferentes temperaturas. A taxa de ligação difere entre as septinas estudadas. Estas septinas também mostram a capacidade de hidrólise de GTP, mas a atividade GTPásica não ocorre com a mesma magnitude entre as septinas. As septinas do subgrupo II que possuem um C-terminal maior, 6, 8 e 11, hidrolisam pequena quantidade de GTP se comparados com a septina 2.
- Através de um ensaio de duplo híbrido com a septina 10 humana, a interação entre esta proteína e PLZF foi encontrada. Esta interação foi mapeada sugerindo que a interação ocorra pelo *zinc finger domain* de PLZF. A interação foi confirmada *in vitro* e ensaios de localização celular mostram que ambas as proteínas se localizam no citoplasma da célula.
- Ensaios preliminares para verificar o papel da ligação de GTP por SEPT6G foram realizados.
 Os espectros de dicroísmo circular de SEPT6G mostram o enovelamento desta proteína. Os resultados de fluorescência mostram o enovelamento das duas condições, e o *red shift*

observado devido à presença de GTP na região do P-loop. Os resultados de desnaturação térmica analisados por dicroísmo circular mostram uma maior susceptibilidade

à temperatura da proteína na ausência de GTP. Os resultados de MET mostram a formação de filamentos pela septina 6 na presença de GTP.

VI. REFERÊNCIAS

- Adler A J, Ross, D G, Chen, K, Stafford, P.A. Woisswillo, M J, Fasman G G. (1974) Interaction of deoxyribonucleic acid with histone f2b and its half-molecules. Circular dichroism studies.Biochemistry 13: 616-622.
- Barral Y, Parra M, Bidlingmaier S, Snyder M. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. Genes Dev. 1999 Jan 15;13(2):176-87.
- Bi E, Maddox P, Lew DJ, Salmon ED, McMillan JN, Yeh E, Pringle JR. Involvement of an actomyosin contractile ring in Saccharomyces cerevisiae cytokinesis. J Cell Biol. 1998 Sep 7;142(5):1301-12.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.Nature. 1990 Nov 8;348(6297):125-32. Review.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.Nature. 1991 Jan 10;349(6305):117-27. Review.
- Byers B, Goetsch L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. J Cell Biol. 1976 Jun;69(3):717-21.
- Carroll CW, Altman R, Schieltz D, Yates JR, Kellogg D. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. J Cell Biol. 1998 Nov 2;143(3):709-17.
- Caudron F, Barral Y. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. Dev Cell. 2009 Apr;16(4):493-506.
- Caviston JP, Longtine M, Pringle JR, Bi E.The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. Mol Biol Cell. 2003 Oct;14(10):4051-66. Epub 2003 Jul 25.
- Derewenda ZS, Vekilov PG.Entropy and surface engineering in protein crystallization. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006 Jan;62(Pt 1):116-24. Epub 2005 Dec 14.Dobbelaere J, Barral Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. Science. 2004 Jul 16;305(5682):393-6.

- Dobbelaere J, Gentry MS, Hallberg RL, Barral Y. Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. Dev Cell. 2003 Mar;4(3):345-57.
- Douglas LM, Alvarez FJ, McCreary C, Konopka JB. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. Eukaryot Cell. 2005 Sep;4(9):1503-12.
- Epp JA, Chant J. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. Curr Biol. 1997 Dec 1;7(12):921-9.
- Faty M, Fink M, Barral Y. Septins: a ring to part mother and daughter. Curr Genet. 2002 Jun;41(3):123-31. Epub 2002 Jun 19.
- Field CM, al-Awar O, Rosenblatt J, Wong ML, Alberts B, Mitchison TJ.A purified Drosophila septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. J Cell Biol. 1996 May;133(3):605-16.
- Field CM, Kellogg D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? Trends Cell Biol. 1999 Oct;9(10):387-94.
- Ford SK, Pringle JR.Cellular morphogenesis in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. Dev Genet. 1991;12(4):281-92.
- Frazier JA, Wong ML, Longtine MS, Pringle JR, Mann M, Mitchison TJ, Field C.Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. J Cell Biol. 1998 Nov 2;143(3):737-49.
- Gladfelter AS, Pringle JR, Lew DJ.The septin cortex at the yeast mother-bud neck.Curr Opin Microbiol. 2001 Dec;4(6):681-9. Review.
- Gladfelter AS, Bose I, Zyla TR, Bardes ES, Lew DJ. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. J Cell Biol. 2002 Jan 21;156(2):315-26. Epub 2002 Jan 21.
- Guertin DA, Trautmann S, McCollum D. Cytokinesis in eukaryotes. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Jun;66(2):155-78. Review
- Guo S, Kemphues KJ.par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell. 1995 May 19;81(4):611-20.

- Haarer BK, Pringle JR. Immunofluorescence localization of the Saccharomyces cerevisiae CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. Mol Cell Biol. 1987 Oct;7(10):3678-87.
- Hall P A, Russel S E H. (2004). The pathobiology of the septin gene family. J Pathol. 204: 489-505.
- Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. (2005). Expression profiling the human septin gene family. J Pathol.206:(3):269-78.
- Hanrahan J, Snyder M. Cytoskeletal activation of a checkpoint kinase. Mol Cell. 2003 Sep;12(3):663-73.
- Hartwell LH.Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. Exp Cell Res. 1971 Dec;69(2):265-76.
- Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. Neuron. 1998 Jun;20(6):1111-22.
- Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, Noda M, Kinoshita M. (2003). Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. J Biol Chem. 27;278(26):24095-102
- Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity. Neuron. 2007 Feb 15;53(4):519-33.
- Johnson, W. C., Jr. (1996) in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (Fasman, G. D., ed) pp. 433–468, Plenum Publishing Corp., New York
- Kanoh J, Russell P. The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. Mol Biol Cell. 1998 Dec;9(12):3321-34.
- Keaton MA, Lew DJ.Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9(6):540-6. Epub 2006 Oct 19.
- Kjeldgaard M, Nyborg J, Clark BF. The GTP binding motif: variations on a theme.FASEB J. 1996 Oct;10(12):1347-68. Review.

- Konarev, PV; Volkov, VV; Sokolova, AV; Koch, MHJ; Svergun, DI. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Cryst. (2003). 36, 1277– 1282
- Kuhlenbäumer G, Hannibal MC, Nelis E, Schirmacher A, Verpoorten N, Meuleman J, Watts GD, De Vriendt E, Young P, Stögbauer F, Halfter H, Irobi J, Goossens D, Del-Favero J, Betz BG, Hor H, Kurlemann G, Bird TD, Airaksinen E, Mononen T, Serradell AP, Prats JM, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Timmerman V, Ringelstein EB, Chance PF. Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. Nat Genet. 2005 Oct;37(10):1044-6. Epub 2005 Sep 25.
- Kusch J, Meyer A, Snyder MP, Barral Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. Genes Dev. 2002 Jul 1;16(13):1627-39.
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, Gottfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danielpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Duckett CS, Lechleider RJ, Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. Nat Cell Biol. 2000 Dec;2(12):915-21.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007 Nov 1;23(21):2947-8. Epub 2007 Sep 10.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J Mol Biol. 2002 Mar 15;317(1):41-72.
- Lindsey R, Momany M. Septin localization across kingdoms: three themes with variations. Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9(6):559-65. Epub 2006 Oct 25. Review
- Lippincott J, Li R. Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. J Cell Biol. 1998 Jan 26;140(2):355-66.
- Lippincott J, Shannon KB, Shou W, Deshaies RJ, Li R. The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. J Cell Sci. 2001 Apr;114(Pt 7):1379-86.
- Longtine MS, Bi E. Regulation of septin organization and function in yeast. Trends Cell Biol. 2003 Aug;13(8):403-9. Review

- Longtine MS, Fares H, Pringle JR.Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. J Cell Biol. 1998 Nov 2;143(3):719-36.
- Longtine M S, DeMarini D J, Valencik M L, Al-Awar O S, Fares H, De Virgilio C, Pringle J R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. Curr Opin Cell Biol. 8(1):106-19
- Luft JR, DeTitta GT. A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1999 May;55(Pt 5):988-93.
- Marrington R, Small E, Rodger A, Dafforn TR, Addinall SG. (2004) FtsZ fiber bundling is triggered by a conformational change in bound GTP.J Biol Chem. 279(47):48821-9.
- Martinez C, Ware J. (2004). Mammalian septin function in hemostasis and beyond. Exp Biol Med. 229: 1111-1119.
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. Science. 261(5117):50-8. Vivian & Callis, 2001
- Rodal AA, Kozubowski L, Goode BL, Drubin DG, Hartwig JH. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. Mol Biol Cell. 2005 Jan;16(1):372-84. Epub 2004 Nov 3.
- Schmidt K, Nichols BJ. A barrier to lateral diffusion in the cleavage furrow of dividing mammalian cells. Curr Biol. 2004 Jun 8;14(11):1002-6.
- Schmidt K, Nichols BJ.Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. BMC Cell Biol. 2004 Nov 12;5(1):43.
- Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, Stark H, Wittinghofer A.(2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. Nature. 449(7160):311-15.
- Sirajuddin M, Farkasovsky M, Zent E, Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 29;106(39):16592-7. Epub 2009 Sep 15.
- Spiliotis ET, Nelson WJ. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. J Cell Sci. 2006 Jan 1;119(Pt 1):4-10. Review.
- Svergun, DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods

using perceptual criteria J. Appl. Cryst. (1992). 25, 495–503

- Svergun, D; Barberato, C; Koch, MHJ. CRYSOL a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules fromAtomic Coordinates. J. Appl. Cryst. (1995). 28, 768–73.
- Svergun DI. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing Biophysical Journal. (1999) 76: 2879–86
- Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. WormBook. 2005 Sep 21:1-16. Review.
- Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics.Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jun;9(6):478-89. Epub 2008 May 14. Review.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: DARGB05.1

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Estudos estruturais e funcionais das septinas humanas 6, 8 e 10

Pesquisador responsável: João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Experimentador: Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, []-mestrado, [X]-doutorado, []-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique:______

Resumo do projeto:

Para que a divisão celular ocorra é necessário que uma célula passe por algumas etapas que possibilitem esta divisão. Ao conjunto destes processos denomina-se ciclo celular. A regulação espacial e temporal destes processos é fundamental para a preservação celular e do material genético. Falha neste processo pode levar à morte celular ou a alterações genéticas causando divisão desregulada e crescimento de tumores. Dentre diversas proteínas envolvidas no ciclo celular, encontram-se as septinas. Até o momento, foram encontrados em humanos 13 diferentes genes para septinas. Além do papel no ciclo celular, também estão envolvidas em exo e endocitose, apoptose e relacionadas a algumas patologias como parkinsonismo e leucemias. Neste trabalho foram selecionadas três septinas para estudo estruturais e funcionais: septina 6, septina 8 e septina 10. Os cDNA destas septinas, a següência nucleotídica referente ao domínio GTPase das septinas e ao domínio GTPase+Cterminal foram amplificados em nosso laboratório e estão sendo clonados para expressão em sistema procarioto ou eucarioto. As proteínas deverão ser purificadas por métodos cromatográficos para a realização dos ensaios de cristalização. A partir dos dados coletados nos experimentos de difração de raios X será possível a resolução e o estudo da estrutura cristalográfica. Uma vez que os mecanismos de oligomerização das septinas não estão definidos e nem a especificidade destas interações; os objetivos funcionais têm como finalidade esclarecer estas questões e incluem testes de atividade GTPase, ensaios de duplo híbrido e co-expressão de septinas em E. coli.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 4.9.2007

Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários abaixo:

Dry Presidente de OIBio - ABTLUS Prof. Dr. Jörg Kobarg

Membro da CIBio - ABTLuS Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

hon

Membro da CIBio - ABTLuS Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin