UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS

Determinantes estruturais para a especificidade de interação nas interfaces G e NC de septinas: validando as regras de substituição na montagem do filamento

São Carlos

2020

DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS

Determinantes estruturais para a especificidade de interação nas interfaces G e NC de septinas: validando as regras de substituição na montagem do filamento

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

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

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

São Carlos
2020

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

Leonardo Cabrejos, Diego Antonio

Determinantes estruturais para a especificidade de interação nas interfaces G e NC de septinas: validando as regras de substituição na montagem do filamento / Diego Antonio Leonardo Cabrejos; orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2020.

128 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Septinas. 2. Interação proteína-proteína. 3. Cristalografia. 4. Coiled-coil. 5. Biofísica. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a minha família: meus pais Teresa e José pelo apoio e amor ao longo da minha vida, a minha esposa Stefany e meus filhos Noah, Emma e Isaac por me acompanhar nesta longa estrada com paciência, compreensão e carinho.

A Universidade Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG) de Lambayeque, por me formar como um Biólogo com a capacidade de lutar por meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo o Prof. Dr. Richard Charles Garratt por me dar a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa desde o ano 2012, formando-me como cientista desde minha iniciação científica até o meu doutorado. Obrigado pelas horas de estudo e discussão durante o desenvolvimento deste projeto, e por ser um professor e cientista exemplar.

Aos professores do IFSC que contribuíram para a minha formação científica, especialmente a Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo e o Prof. Dr. Ricardo De Marco pelas sugestões e discussões para melhorar o meu trabalho de pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Estrutural: Humberto e Susana, e aos técnicos do Grupo de Biofísica Molecular: Andressa, Bel e Rafael, pelo constante apoio nos diversos experimentos assim como por sua amizade.

A meus colegas do grupo de septinas pelas sugestões e discussões durante as reuniões de grupo: Rafael, Ítalo, Deborah, Higor, Danielle, Gabriel, Adriano, Ana Eliza, Samuel e Paty.

A meus colegas do Laboratório de Biologia Estrutural: Leo, Rafael, Adriano, Murilo, Naty, e Jhon, pela convivência no trabalho de laboratório.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida ao processo 2016/04658-9 e permitir a realização deste projeto de pesquisa.

Não é possível convencer um crente de coisa alguma, pois suas crenças não se baseiam em evidências; baseiam-se numa profunda necessidade de acreditar.

Carl Sagan

RESUMO

LEONARDO CABREJOS, D.A. **Determinantes estruturais para a especificidade de interação nas interfaces G e NC de septinas:** validando as regras de substituição na montagem do filamento. 2020. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Septinas são proteínas envolvidas em diversos processos celulares (citocinese, espermatogênese, apoptose etc.), razão pela qual estão relacionadas com o desenvolvimento de várias doenças. Pertencentes à família das GTPases, apresentam três domínios: N e C terminal altamente variável e um domínio G (ligação a GTP/GDP) conservado. Para realizar suas funções, uma septina de cada grupo (4 grupos diferentes em humanos) se associa para formar heterofilamentos usando dois tipos de interfaces: a interface G e a interface NC. Embora seja conhecido o tipo de interface de contato e a ordem específica das septinas na montagem do filamento, os mecanismos moleculares que controlam a polimerização correta do filamento ainda são desconhecidos. Aqui, descrevemos os estudos realizados nas interfaces G e NC das septinas, a fim de encontrar os mecanismos moleculares de interação específica e verificar a substituição das septinas por outras do mesmo grupo. Oito combinações de heterocomplexos "G" de septinas foram co-expressas e purificadas para serem caracterizadas por técnicas biofísicas, apresentando heterodímeros homogêneos em solução (SEC e SEC-MALS) com presença de GTP e GDP em proporções aproximadamente equimolares. Além disso, cada dímero exibe uma estabilidade térmica diferente, o que pode indicar uma preferência de interação para a formação de complexos. Os estudos cristalográficos dos heterodímeros G permitiu identificar interações específicas que determinam a especificidade do complexo formado por septinas do grupo II e grupo III (validando a substituição de septinas do mesmo grupo), ajudando também a explicar a presença de um grupo cataliticamente inativo em estas proteínas. Por outro lado, as estruturas cristalográficas dos *coiled-coils* das septinas 1, 4 e 5 (Interface NC) permitiu observar um novo motivo proteico que sugere estar relacionado com a interação entre dois heterofilamentos, formando estruturas de alta complexidade em septinas (redes etc.).

Palavras-chave: Septinas. Interação proteína-proteína. Cristalografia.

ABSTRACT

LEONARDO CABREJOS, D.A. **Structural determinants for the specificity of interaction at the G and NC interfaces of septins:** validating the rules of substitution in filament assembly. 2020. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Septins are involved in several cellular processes (cytokinesis, spermatogenesis, apoptosis, etc.), which is why they are related to the development of several diseases. Belonging to the GTPase family, they present three domains: highly variable N and C terminal and a conserved G domain (binding to GTP/GDP). To perform their functions, one septin from each group (4 different groups in humans) associate to form heterofilaments using two types of interface: the G interface and the NC interface. Although the type of contact interface and the specific order of septins in the filament are known, the molecular mechanisms that control the correct polymerization of the filament are still unknown. Here, we describe studies carried out on the G and NC interfaces of septins, in order to shed light on the molecular mechanisms of specific interaction and to verify the replacement of septins by others from the same group. Eight combinations of septin "G" heterocomplexes were co-expressed and purified and characterized by biophysical techniques. They were present as homogeneous heterodimers in solution (SEC and SEC-MALS) with the presence of GTP and GDP in approximately equimolar proportions. In addition, each dimer exhibited a different thermal stability, which may indicate an interaction preference for complex formation. Crystallographic studies of the G heterodimers allowed for the identification of specific interactions that determine the specificity of the complex formed by septins from group II and group III (validating the replacement of septins from the same group) and helping to explain the presence of a catalytically inactive group in these proteins. On the other hand, the crystal structures of the *coiled-coils* of septins 1, 4 and 5 (NC interface) allowed us to observe a new protein motif that suggests that it is related to the interaction between two heterofilaments, forming highly complex structures of septins (networks etc.).

Keywords: Septins. Protein-protein interaction. Crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descoberta de septinas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 2 - Distribuição filogenética de septinas nos organismos eucariotos.....	22
Figura 3 - Septinas no ciclo celular	23
Figura 4 - Septinas no processo de excitose.....	24
Figura 5 - Septinas e cílios	25
Figura 6 - Septinas na infecção bacteriana.....	26
Figura 7 - Septinas e sua relação com doenças e desordens humanos	27
Figura 8 - Classificação das septinas humanas	29
Figura 9 - Domínios estruturais de uma septina.....	28
Figura 10 - Enovelamento do domínio G de uma septina.	30
Figura 11 - Sítio de ligação ao nucleotídeo.....	32
Figura 12 - Características de um <i>Coiled-coil</i>	34
Figura 13 - Modelo proposto para a formação de ligações cruzadas entre filamentos de septinas	35
Figura 14 - Filamentos de septinas.....	36
Figura 15 - Reordenamento das posições das septinas no octâmero como unidade básica de polimerização	37
Figura 16 - Regras de substituição de septinas ou Regras de Kinoshita	38
Figura 17 - Interações promiscuas em septinas individuais	39
Figura 18 - Identificação dos domínios N, G e C-terminal na sequência de aminoácidos das septinas a serem estudadas	44

Figura 19 - Alinhamento entre septinas do grupo I (verde), II (azul claro), III (vermelho) e IV (amarelo).....	54
Figura 20 - Gel SDS-PAGE (10%) da cromatografia de afinidade a cobalto dos heterocomplexos.....	57
Figura 21 - Purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	58
Figura 22 - Cromatograma dos heterodímeros obtidos por SEC-MALS	60
Figura 23 - Cromatografia de troca iônica após a liberação de nucleotídeos endógenos dos heterodímeros	62
Figura 24 - Termoestabilidade dos heterodímeros de septinas do grupo II e III	62
Figura 25 - Gráficos de qualidade das estruturas cristalográficas das SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G	66
Figura 26 - Estrutura cristalográfica do domínio GTPase dos heterodímeros SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G.....	67
Figura 27 - Comparação entre os heterodímeros SEPT2G-SEPT8G/11G com o heterodímero SEPT2-SEPT6 (2QAG) e o homodímero SEPT2G (2QNR)	68
Figura 28 - Comparação do <i>switch I</i> entre SEPT2G e SEPT8/11G.....	69
Figura 29 - Sítio ativo da SEPT2G e SEPT8G em coordenação com o GDP e GTP, respectivamente	70
Figura 30 - Vista em superfície das interfaces G entre SEPT2G e septinas do grupo II.....	72
Figura 31 - Vista em superfície da interface G do heterodímero SEPT7-SEPT3T282Y e o homodímero SEPT7	73
Figura 32 - Alinhamento do domínio G entre as 13 septinas humanas	75
Figura 33 - Mapeamento dos aminoácidos característicos dos grupos II e III	76
Figura 34 - Interação específica entre o <i>trans-loop 1</i> da SEPT2G com o <i>switch I</i> da SEPT11G.....	78

Figura 35 - O <i>switch I</i> da SEPT2G interagindo com SEPT11G	80
Figura 36 - Sobreposição da interface G entre heterodímeros de septinas.....	80
Figura 37 - O <i>switch II</i> na interface G fisiológica.....	82
Figura 38 - Mapa 2Fo-Fc mostrando a Lys111 em SEPT11G (azul claro) e Cys111 em SEPT2G (vermelho).....	82
Figura 39 - Gel SDS-PAGE 12% para a identificação da formação da ligação covalente entre SEPT2G-SEPT11G	84
Figura 40 - Termoestabilidade dos dímeros SEPT7-SEPT7 e SEPT7-SEPT3	85
Figura 41 - Purificação dos mutantes.....	87
Figura 42 - Espectrometria de massas dos heterodímeros mutantes da SEPT2 e SEPT6	88
Figura 43 - Caracterização dos mutantes	89
Figura 44 - Estado inicial e final dos <i>switches I e II</i> durante a hidrólise do GTP	91
Figura 45 - Estado inicial e final (o mesmo estado) do <i>switch II</i> da SEPT11G	91
Figura 46 - Purificação dos mutantes SEPT2G-SEPT6 _{swI_2_V102P} e SEPT6 _{swI_2_V102P}	93
Figura 47 - Liberação dos nucleotídeos nos mutantes da SEPT6 _{swI_2_V103P}	93
Figura 48 - Gráficos de qualidade das estruturas dos <i>coiled-coil</i> SEPT1CC, SEPT4CC e SEPT5CC	96
Figura 49 - Orientação esperada para os <i>coiled-coils</i> de septinas	97
Figura 50 - <i>Coiled-coil</i> antiparalelo da SEPT4CC.....	98
Figura 51 - O lado hidrofílico do <i>coiled-coil</i> antiparalelo da SEPT4CC é estabilizado por uma rede de ligações de hidrogênio formada pelos aminoácidos nas posições <i>a</i>	98
Figura 52 - <i>Coiled-coil</i> da SEPT1CC.....	99

Figura 53 - <i>Coiled-coil</i> da SEPT5CC	101
Figura 54 - <i>knobs into holes</i> na estrutura cristalográfica da SEPT5CC.....	101
Figura 55 - Distribuição dos aminoácidos hidrofílicos nas posições a do <i>coiled-coil</i>	103
Figura 56 - Saída do servidor LOGICOIL para a predição das quatro sequências de septinas do grupo III.....	106
Figura 57 - Alinhamento de sequência da região <i>coiled-coil</i> das septinas do grupo III ou grupo da SEPT2.....	107
Figura 58 - Simulações dos <i>coiled-coil</i> homodímeros das septinas do grupo III ou SEPT2.....	108
Figura 59 - Deslocamento dos aminoácidos a passar de uma orientação paralela para antiparalela...	110
Figura 60 - Formação de filamentos pareados como estruturas de maior ordem	112
Figura 61 - Modelo de interação de filamentos adjacentes usando <i>coiled-coils</i> camaleônicos.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de oligonucleotídeos específicos usando para a amplificação das CDS dos domínios G de septinas.	45
Tabela 2 - Endonucleasas de restrição utilizadas para digerir os CDSs e construções dos domínios GTPase de septinas.....	46
Tabela 3 - Lista das diferentes combinações obtidas para co-expressão e co-purificação dos complexos formados pelo domínio G de septinas.....	47
Tabela 4 - Gradiente utilizando na cromatografia líquida de alta eficiência.....	51
Tabela 5 - Condições de cristalização iniciais dos <i>coiled-coil</i> do grupo III utilizadas para refinamento.	52
Tabela 6 - Combinações finais dos heterocomplexos estudados.....	55
Tabela 7 - Massa molecular teórica e calculada pelo SEC-MALS para todos os heterodímeros de septinas.	60
Tabela 8 - Condições de cristalização de quatro heterodímeros de septinas.....	63
Tabela 9 - Tabela cristalográfica dos heterodímeros SEPT2G-SEPT11G e SEPT2G-SEPT8G. Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.....	64
Tabela 10 - Condições de cristalização dos <i>coiled-coil</i> das septinas do grupo III.	95
Tabela 11 - Tabela cristalográfica da região de <i>coiled-coil</i> das septinas SEPT1, SEPT4 e SEPT5. Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.	95

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	SEPTINAS: DESCOBERTA E SUA DISTRIBUIÇÃO NOS DIVERSOS ORGANISMOS	21
1.2.	FUNÇÕES CELULARES	22
1.3.	CLASSIFICAÇÃO E DOMÍNIOS DE SEPTINAS	27
1.3.1.	Domínio N-terminal	29
1.3.2.	Domínio G.....	29
1.3.3.	Domínio C-terminal	33
1.4.	FORMAÇÃO DE FILAMENTOS	35
2	OBJETIVOS	41
2.1.	PRINCIPAL	41
2.2.	ESPECÍFICOS.....	41
3	METODOLOGIA.....	43
3.1.	DEFINIÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS SEPTINAS DOS GRUPOS II E III	43
3.2.	SÍNTESE DA REGIÃO COILED-COIL DAS SEPTINAS DO GRUPO III.....	43
3.3.	CLONAGEM DOS DOMÍNIOS GTPASE DAS SEPTINAS DO GRUPO II E III	45
3.4.	CO-EXPRESSÃO E CO-PURIFICAÇÃO DOS HETEROCOMPLEXOS	47
3.5.	CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA	49
3.5.1.	Determinação do estado oligomérico usando cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS).....	49
3.5.2.	Análise do conteúdo de nucleotídeo.....	50
3.5.3.	Termoestabilidade usando Tycho technology	51
3.6.	CRISTALIZAÇÃO, COLETA DE DADOS E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA	51
3.7.	MUTAÇÕES NO SWITCH I DA SEPT6.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1.	ESPECIFICIDADE DE INTERAÇÃO DA INTERFACE G ENTRE SEPTINAS DO GRUPO II E III	55
4.1.1.	Septinas do grupo II e III formam heterodímeros com diferentes termoestabilidades	55
4.1.2.	A estrutura cristalográfica da SEPT2G-SEPT11G e SEPT2G-SEPT8G revelam interações específicas entre os grupos II e III	63
4.1.2.1	Descrição das estruturas do domínio GTPase da SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G.....	66
4.1.2.2.	Interações via resíduos característicos explicam a especificidade de interação entre septinas dos grupos II e III	70
4.1.2.2.1	Identificando as regiões de contato da interface G	70
4.1.2.2.2	Selecionando os resíduos característicos dos quatro grupos de septinas	74
4.1.2.2.3	Resíduos característicos envolvidos em interações específicas do switch I	77
4.1.2.2.4.	O switch II também contribui para a especificidade de interação da interface G entre septinas dos grupos II e III	81
4.1.2.2.5.	Relação da termoestabilidade e estruturas cristalográficas	84
4.2.	IMPORTÂNCIA DE UM GRUPO CATALÍTICAMENTE INATIVO NA MONTAGEM CORRETA DO HETEROFILAMENTO	86
4.3.	ESPECIFICIDADE DA INTERFACE NC NAS SEPTINAS DO GRUPO III.....	94
5	CONCLUSÕES	117
	REFERENCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas: descoberta e sua distribuição nos diversos organismos

Septinas foram identificadas em 1971 por L.H. Hartwell em células de *Saccharomyces cerevisiae* com defeito na citocinese.¹ Em estas células, sensíveis a temperatura, detectaram 4 genes envolvidos com a formação de múltiplos brotos alongados: *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12*. As mutações em estes genes impediam a separação da célula mãe da célula filha, etapa final da citocinese (figura 1A). 5 anos depois, em um broto de levedura em divisão, visualizaram mediante microscopia eletrônica filamentos de aproximadamente 10 nm de espessura que rodeavam a região de união entre a célula mãe e filha², região conhecida como *septum* (figura 1B). Finalmente, 16 anos depois da descoberta, foi possível identificar os produtos proteicos dos quatro genes (*cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12*) como os componentes principais do filamento ao redor do *septum*, por essa razão as proteínas foram chamadas de septinas.³

Figura 1 - Descoberta de septinas em *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Células multinucleadas sensíveis a temperatura com deficiência na divisão da célula mãe da célula filha. (B) Filamentos em formato de estrias identificados na região do *septum* (setas) em uma célula na última etapa de divisão celular.

Fonte: Adaptada de HARTWELL¹; BYERS.²

Ao longo dos anos, homólogos às septinas de levedura foram detectados em diversos organismos eucariotos. O número de genes para cada organismo é altamente variável como por exemplo um gene para *Chlamydomonas reinhardtii*, dois genes para *Caenorhabditis elegans*, quatro genes para *Schistosoma mansoni*, cinco genes para *Drosophila melanogaster* e treze genes para *Homo sapiens*. Com a ausência em plantas superiores, septinas estão presentes em algas verdes e marrons, ciliados e opistocontes (coanoflagelados, microsporídios, fungos e animais)⁴⁻⁵ (figura 2). De longe, as septinas de levedura e septinas humanas são as mais bem estudadas.⁶⁻⁷ Porém, estudos em septinas de outros organismos

estão começando a ter maior ênfase, destacando septinas de: fungos fitopatogênicos⁸⁻¹⁰, *Caenorhabditis elegans*¹¹⁻¹², *Schistosoma mansoni*^{13,14}, *Drosophila melanogaster*¹⁵⁻¹⁶ e *Mus musculus*.¹⁷⁻¹⁸

Figura 2 - Distribuição filogenética de septinas nos organismos eucariotos. Os grupos taxonômicos que estão em roxo são aqueles que seus genomas estão acurados, e por consequência, septinas foram detectadas. Nos grupos em verde, devido à falta de acurácia na anotação dos genomas a identificação de septinas não está descartada. Por fim, os grupos em preto são aqueles onde não foi possível detectar septinas ou proteínas homologas, segundo o estudo feito em 2011.

Fonte: Adaptada de NISHIHAMA *et al.*⁴

1.2 Funções Celulares

Como mencionamos, septinas participam no processo de divisão celular constituindo um componente indispensável na etapa da citocinese. Atualmente sabemos que para realizar esta e outras funções, septinas formam heteropolímeros que posteriormente são montados em estruturas de ordem superior como filamentos, anéis, redes e outros.¹⁹

Na divisão celular, em leveduras, septinas formam um anel que é submetido a mudanças dependentes das fases do ciclo celular (figura 3). No início da fase G1 as septinas são recrutadas no local presuntivo à formação do broto, para pouco antes do surgimento dele, começar a formação do anel dependente da proteína Cdc42 (isto marca o futuro local de crescimento do broto). Após a formação do broto (durante o restante da interfase, S e G2), o anel se estabiliza formando uma ampulheta presente até o início da mitose. Nas etapas iniciais

da mitose o anel de septinas é dividido em dois, um deles ficando do lado da célula mãe e o outro ficando no broto em divisão. Finalmente, após a separação completa das células, o anel de septinas é desmontado e as subunidades serão parcialmente reutilizadas para o próximo ciclo celular.²⁰

Durante o ciclo celular, septinas mostraram outras funções como a de andaime macromolecular facilitando a interação proteína-proteína (recrutando até 100 proteínas diferentes).²¹ Também destacam na função de barreira de difusão, limitando a difusão de proteínas de membrana entre a célula mãe e a célula filha.²²

Figura 3 - Septinas no ciclo celular. O anel de septinas começa a se formar no início da interface (na G1), posicionando-se no local de crescimento do broto pela interação com a proteína Cdc42. Durante o resto da interface, o anel de septinas fica mais acentuado para depois se dividir em dois anéis: um ficando com a célula mãe e outro com a celular filha. Finalizando a citocinese, o anel de septinas é desmontado e suas subunidades reutilizadas nos próximos ciclos celulares. Durante todo processo, eventos de fosforilação (desfosforilação), acetilação e SUMOilação (deSUMOilação) são realizados sob proteínas reguladores nas diferentes etapas do ciclo celular como mostrados na figura.

Fonte: Adaptada de GLOMB ; GRONEMEYER.²⁰

Uma vez que septinas funcionam como barreiras de difusão, pesquisadores relacionaram esta função com o tráfego de moléculas e com a polaridade celular. Efetivamente, septinas interagem com proteínas essenciais para o tráfego de vesículas sinápticas no processo de exocitose.²³ Septinas interagem com o complexo exocisto (conjunto octamérico de diferentes proteínas, *SNARE*), regulando o transporte das vesículas sinápticas até a fusão com as membranas²⁴ (figura 4). Entre outras das funções, em leveduras, septinas estabelecem e mantêm a polaridade cortical (organização assimétrica da membrana plasmática e estruturas associadas a ela). Quando septinas são posicionadas no local presuntivo da formação do broto, contribuem para a formação de gradientes moleculares

recrutando proteínas para o local (polaridade apical, uma forma de polaridade cortical). Subsequentemente, durante o crescimento do broto o anel de septinas restringe a passagem de proteínas até o broto em formação²⁵ (mantendo a assimetria cortical).

Figura 4 - Septinas no processo de exocitose. Septinas rearranjam na membrana as proteínas do complexo *SNARE* (fase 1). Uma vez formado o complexo, septinas são liberadas (formando um anel) induzindo a formação do complexo NSF-*cis-SNARE*. A volta de septinas ao complexo, produz a desmontagem do complexo *SNARE* e a ligação das chaperonas (fase 2). O novo rearranjo de septinas na membrana, induz a formação do complexo *SNARE* no ciclo da exocitose (fase 3).

Fonte: Adaptada de TOKHTAEVA *et al.*²⁴

Septinas também estão envolvidas no processo de ciliogênese de uma variedade de tipos celulares e organismos. Esta função foi descoberta inicialmente no espermatozoide, quando um anel de septinas foi detectado em uma estrutura chamada annulus, estrutura que separa as regiões posterior e anterior da cauda²⁶ (figura 5A). Mutação na septina 12 (SEPT12), em homens e ratos inférteis, resulta em um annulus defeituoso e por consequência, em um espermatozoide imóvel.²⁷ O anel de septinas localizado no annulus não está formado unicamente por SEPT12, também pelas septinas SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT7, SEPT10 e SEPT11, formando heterocomplexos.²⁸ Embora a presença das outras septinas, só basta a mutação na SEPT12 para alterar a estrutura do annulus afetando o controle da difusão de macromoléculas de uma região a outra no espermatozoide (assim afetando a motilidade).¹⁸

A presença de um anel de septinas também foi identificado em células com cílios primários, cílios envolvidos no movimento de fluidos extracelulares e não em locomoção celular.²⁹ Septinas estão presentes majoritariamente no axonema, mas também foram

identificadas na zona de transição e na base do cílio (figura 5B). Alterações ou deleção em alguma septina do anel, produz encurtamento do cílio e diminuição da barreira de difusão. Diferentes septinas podem estar localizadas em diferentes regiões do cílio. Por exemplo, as septinas SEPT2, SEPT7 e SEPT9 estão localizadas tanto no axonema como na base do cílio, enquanto que SEPT6 e SEPT8 estão unicamente na base, e a SEPT11 no axonema.³⁰ Isso sugere que distintos complexos de septinas poderiam realizar diferentes funções dentro do cílio da mesma célula.

Figura 5 - Septinas e cílios. (A) Partes do espermatozoide, onde o anel está entre a região anterior e posterior do espermatozoide. No anel se encontra o anel de septinas, importante para manter a motilidade do espermatozoide. (B) Presença da septinas na formação de cílios primários. Septinas estão presentes na região basal e no axonema.

Fonte: Adaptada de PALANDER *et al*³¹; MIRVIS *et al*.³²

Nos últimos anos foram realizados estudos que relacionam septinas com o processo de infecção bacteriana.³³ Para estabelecer a infecção, a adesão na célula hospedeira é fundamental para a patogenicidade das bactérias. A fosforilação em septina 9 humana (SEPT9), induzido pelo sistema de secreção tipo III (T3SS) de *E. coli* enteropatogênica, contribui para a entrada da bactéria dentro da célula hospedeira (figura 6A). O incremento da adesão nas células hospedeiras pela bactéria *Clostridium difficile* também foi associado ao anel de septinas. A toxina transferase (CDT) induz a formação de protrusões baseadas em microtúbulo. Quando este fenômeno é iniciado, o anel de septinas é recrutado para a

membrana plasmática perto do sítio de polimerização do microtúbulo, guiando a extensão da protusão e favorecendo a entrada da bactéria (figura 6B). Bactérias que infectam células não fagocíticas, apresentam diferentes mecanismos de internalização induzindo remodelamento da membrana plasmática. A bactéria *Listeria monocytogenes* estimula a entrada usando a interação entre proteínas da sua superfície (InlB) e da superfície celular (Met). Aqui o anel de septinas é montado em resposta da polimerização de actina, estimulada pela bactéria (mecanismo chamado de *zippering*) (figura 6C). Para a entrada de *Shigella flexneri*, o anel de septinas facilita eventos de fusão de membrana induzido pela injeção de T3SS na célula hospedeira, gerando um processo de macropinocitose (figura 6D). Apesar de septinas favorecerem a entrada de bactérias nas células hospedes, também atuam na defesa celular. Foi demonstrado que septinas reconhecem bactérias que fogem do vacúolo fagocítico. *S. flexneri* é aprisionada numa estrutura em forma de gaiola formada pelo anel de septinas, restringindo a replicação da bactéria e direcionando-a para autofagia³⁴ (figura 6E).

Figura 6 - Septinas na infecção bacteriana. O anel de septinas, posicionado na membrana plasmática, participa na internalização das bactérias *E. coli* e *C. difficile* após estimulação dos filamentos de actina por parte das bactérias (A e B). Por outro lado, em bactérias que infectam células não fagocíticas, o anel de septinas associadas a filamentos de actina produz remodelamento da membrana que conclui com a entrada da bactéria (C e D). Embora septinas facilitem a entrada de bactérias na célula hospedeira, também formam estruturas que imobilizam bactérias como resposta à invasão celular (E).

Fonte: Adaptada de TORRACA ; MOSTOWY.³³

À medida que septinas foram relacionadas com novos processos biológicos, focou mais evidente sua relação com o desenvolvimento de diferentes doenças e desordens humanos. A figura 7 resume os processos que requerem a intervenção de septinas, e por consequência, a implicação de septinas na patologia de diversos distúrbios orgânicos.³⁵

Figura 7 - Septinas e sua relação com doenças e desordens humanos. A figura resume em que sistema, a alteração na função de septinas, desenvolve uma doença ou desordem no tecido específico. As diferentes cores relacionam as interações de septinas com outras moléculas ou estruturas, e a relação com os distúrbios orgânicos.

Fonte: Adaptada de DOLAT *et al.*³⁵

1.3 Classificação e domínios de septinas

Com a identificação de septinas em diversos organismos, graças ao aumento de sequências disponíveis nas bases de dados, foi possível perceber que o número de genes que codificam septinas varia muito de espécie para espécie. Por exemplo, a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta um gene que codifica uma única septina, enquanto, os mamíferos apresentem comumente treze diferentes genes que codificam diferentes septinas.³⁶⁻

37

Devido a disponibilidade das sequências, foram realizados estudos filogenéticos da família de septinas. Nestes estudos descreveram as septinas como proteínas que pertencem à família das *P-loop* GTPases, portanto, elas têm a capacidade de ligar GTP e na maioria dos casos hidrolisá-lo para GDP.³⁸⁻³⁹ Foram identificados três domínios estruturais: um domínio

N-terminal variável (com uma região polibásica PB1 que interage com membranas), o domínio G conservado (com atividade GTPase) e o domínio C-terminal variável com sequencias compatíveis com a formação de *coiled-coils*³⁹ (figura 8).

Figura 8 - Domínios estruturais de uma septina. O domínio N-terminal (roxo), variável, é considerado um domínio desestruturado, mas com a presença de uma região polibásica (PB1 – azul claro) que confere a capacidade de ligar membranas. O domínio G (vermelho), altamente conservado, com a capacidade de ligar nucleotídeos pela presença dos motivos G1, G3 e G4, apresenta no seu extremo C-terminal uma região característica de septinas denominada como *Septin Unique Element* (SUE) relacionada com a polimerização de septinas em filamentos. Finalmente o domínio C-terminal (preto), também muito variável, apresenta uma região predita como *coiled-coil*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estudos filogenéticos permitiram também classificar as septinas em 4 grandes grupos.³⁸ Esta classificação, baseada na similaridade de sequencias completas de septinas de diferentes organismos com septinas humanas, forma os seguintes grupos: o grupo I ou grupo SEPT9, o grupo II ou grupo SEPT6, o grupo III ou grupo SEPT2 e o grupo IV ou grupo SEPT7. Outros sistemas de classificação como as propostas por Fangfang Pan *et al*³⁹, divide as septinas em 5 grupos diferentes com a presença de alguns subgrupos dentro dos grupos. Neste trabalho adotaremos a classificação proposta por Cao *et al*³⁸ porque resulta um modelo de classificação coerente com a estrutura do heterofilamento de septinas que será descrito posteriormente. Na figura 9 observamos que cada grupo das septinas humanas apresenta características peculiares sob seus três domínios estruturais (N-terminal, G e C-terminal), destacando o curto domínio C-terminal do grupo I, a perda de atividade catalítica do grupo II (produto de uma deleção do aminoácido catalítico que será mostrada na seguinte seção) e a presença de uma única septina no grupo IV.

Figura 9 - Classificação das septinas humanas. Septinas foram classificadas por similaridade da sequência de aminoácidos em 4 grupos. Os grupos são também nomeados por um representante de cada grupo: o grupo SEPT9 (grupo I), grupo SEPT6 (grupo II), grupo SEPT2 (grupo III) e grupo SEPT7 (grupo IV). As cores representadas para cada grupo: verde (SEPT9), azul (SEPT6), vermelho (SEPT2) e amarelo (SEPT7), será mantida ao longo do texto a fim de ajudar no entendimento das figuras. As outras cores serão explicadas na figura 9.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.3.1 Domínio N-terminal

O domínio N-terminal de septinas é altamente variável em termos de sequência de aminoácidos e extensão, ou seja, em tamanho ou número de resíduos (como observado na figura 8). Este domínio apresenta um motivo polibásico (região com alto conteúdo de aminoácidos carregados positivos) que se mostrou importante para a ligação com membranas biológicas interagindo com os fosfolipídios das membranas: fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2) e fosfatidil-inositol (3, 4, 5)-trifosfato (PtdIns(3, 4, 5)P3).⁴⁰ Este domínio se mostrou intrinsecamente desestruturado na SEPT4 humana em experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.⁴¹ Aproximadamente o 19% do domínio N-terminal da SEPT4 apresentou elementos de estrutura secundária regulares, principalmente hélices α relacionados com a região polibásica; os outros 81% corresponderam a regiões de *random coil* ou desestruturadas.⁴¹

1.3.2 Domínio G

O domínio G ou domínio de ligação ao nucleotídeo (GTP/GDP) é o mais conservado em septinas, com 75% de similaridade entre septinas da mesma espécie.³⁹ O enovelamento do domínio G é similar às das pequenas GTPases (proteínas Ras), estando formado por seis fitas

β no meio do sanduiche $\alpha\beta\alpha$ (figura 10). Além do enovelamento, septinas apresentam só três dos cinco motivos das *P-loop* GTPases (G1, G3 e G4).³⁹ O que diferencia as septinas é a presença de um conjunto de elementos de estrutura secundaria no extremo C-terminal do domínio G, nomeado *SUE* (do inglês, *septin unique element*): este apresenta uma folha β composta por três fitas ($\beta 8$, $\beta 9$ e $\beta 10 + \beta 7$) e duas hélices α ($\alpha 5$ e $\alpha 6$) (roxo na figura 10). Outra diferencia em septinas é a presença de uma hélice α entre a hélice $\alpha 4$ e a fita $\beta 6$, chamada de hélice $\alpha 5'$. Ao longo dos anos se demonstrou que tanto o SUE como a hélice $\alpha 5'$ são importantes para a polimerização de septinas em filamentos.⁴²

Figura 10 - Enovelamento do domínio G de uma septina. Septinas apresentam seis fitas β (amarelo) e quatro hélices α (vermelho), formando um enovelamento tipo sanduiche $\alpha\beta\alpha$. Diferenciando-as das pequenas GTPases, septinas apresentam o SUE (roxo) e a hélice $\alpha 5'$ (azul). O SUE é formado por duas hélices alfa ($\alpha 5$ e $\alpha 6$) e uma folha beta com 3 fitas ($\beta 8$, $\beta 9$ e $\beta 10 + \beta 7$). (A) Septina em vista no plano da folha e perpendicular às fitas. (B) Septina vista após um giro de 90° no eixo X. A imagem foi elaborada com a estrutura da SEPT3 com o código PDB 4Z54.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A ligação dos nucleotídeos GTP/GDP é coordenada pelos motivos G1, *Switch I*, G3 e G4 (figura 11). O motivo G1 ou motivo *P-loop* (ou *Walker A*) é um loop que permite o reconhecimento dos grupos fosfatos do nucleotídeo, apresentando uma sequência consenso *GxxxxGKSTL*. Nesta sequência, as duas glicinas são altamente conservadas (100%) e estão entre uma região que aceita qualquer aminoácido (representado pela letra X). A lisina tem uma conservação de 98%, podendo ser substituída por arginina. A serina e treonina a seguir são conservadas e características em septinas, diferenciando-as das outras GTPases.³⁹ Na

figura 11, em A e B, podemos observar as diferentes conformações do *P-loop* quando a septina está ligada a GTP e GDP, respectivamente. Podemos destacar a mudança de interação na serina que, após a hidrólise do GTP, deixa de interagir com o Mg^{+2} para interagir com o fosfato α . Uma mudança similar é observada na lisina que passa a interagir com o fosfato β . A liberação do fosfato γ e o Mg^{+2} permite que o *P-loop* se aproxime ao GDP gerando uma nova rede de interações.

Figura 11 - Sítio de ligação ao nucleotídeo. Podemos observar a rede de interações entre os motivos G1 ou P-loop (A e B), *switch I* (C e D), *switch II* (E e F), G4 (G e H), os nucleotídeos GTP/GDP e Mg^{+2} (esfera verde). Em todas as imagens destacamos em amarelo os aminoácidos conservados e fundamentais para a interação com os nucleotídeos, observado suas conformações antes e depois da hidrólise do GTP para GDP. As imagens com GTP ligada foram realizadas com a estrutura da SEPT3 (4Z51) e com GDP ligada com SEPT7 (6N0B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As septinas, como outras GTPases, apresentam um sistema de comuta relacionado com a hidrólise do GTP: o *switch I* e o *switch II*.⁴³ O *switch I* é o motivo que confere a atividade catalítica em septinas. Ele apresenta uma treonina conservada (amarelo em figura 11C) que sob interação com o Mg^{+2} , orienta a posição de uma molécula de água localizada acima do fosfato γ permitindo a hidrólise do GTP.⁴⁴ Após a hidrólise podemos observar que o *switch I* se desliza afastando a treonina do sítio ativo (figura 11D).

Como o *switch I*, o *switch II* ou G3 é um elemento importante para a hidrólise do GTP. Ele está formado pela sequência consenso DxxGxx.³⁹ A glicina presente no *switch II* orienta a molécula de água catalítica, junto com a treonina do *switch I*, permitindo a hidrólise do GTP. Por outro lado, o ácido aspártico é importante para manter uma molécula de água que participa da hexacoordenação do Mg^{+2} (figura 11E). Após a hidrólise, como observado para o *switch I*, o *switch II* é afastado em relação ao nucleotídeo devido à perda do fosfato γ e o Mg^{+2} (figura 11F). Das figuras 11 C, D, E e F podemos observar efetivamente o sistema de fechamento (quando ligado a GTP + Mg^{+2}) e abertura (ligado a GDP) dos *switches*.

O motivo G4 é importante para a especificidade e estabilidade do nucleotídeo GTP/GDP no sítio de ligação. Caracterizado pelo consenso xKxD, que confere especificidade ao nucleotídeo de guanina, interage diretamente com o açúcar e a base do nucleotídeo com a lisina e ácido aspártico, respectivamente (figura 11G e 11H).

1.3.3 Domínio C-terminal

O domínio C-terminal é importante para a polimerização de septinas em filamentos^{45,46}. Ele apresenta uma região na qual a sua sequência de aminoácidos é compatível com os motivos estruturais conhecidos como *coiled-coil*.³⁹ O *coiled-coil* representa uns dos motivos mais comuns de estrutura de proteínas e se caracteriza por ter duas ou mais hélices anfipáticas que se enrolam entre si ao redor de um centro hidrofóbico; estas hélices podem ser paralelas ou antiparalelas⁴⁷ (figura 12A). Uma característica dos *coiled-coil* é a periodicidade de resíduos que se repetem a cada duas voltas, deixando uma fase repetitiva a cada 7 aminoácidos (*heptad repeat*) estabelecida como --*abcdefgabcdefgabcdefg*--. Nesta sequência, as posições *a* e *d* frequentemente são aminoácidos hidrofóbicos enquanto nas posições *e* e *g* são carregados, deixando os resíduos hidrofóbicos escondidos entre as hélices e os hidrofílicos expostos para formar interações eletrostáticas⁴⁸ (figura 12B). Outra característica dos *coiled-coil* é que as cadeias laterais dos resíduos *a* e *d* na superfície de uma

hélice se empacotam no centro de um buraco formando por quatro cadeias laterais da outra hélice, gerando o empacotamento conhecido como os *knobs into holes*⁴⁷ (figura 12C).

Figura 12 - Características de um *Coiled-coil*. Em (A), as diferentes orientações adoptadas por *coiled-coil*: paralela ou antiparalela. Em (B), seguindo os *heptad repeat* observamos que para *coiled-coils* antiparalelos, as duas faces do núcleo hidrofóbico estão formadas por aminoácidos da mesma posição gerando a face *a* e a face *d*. Por outro lado, em *coiled-coils* paralelos observamos uma mistura de aminoácidos *a* e *d* em ambas as faces. Em (C), observamos como um aminoácido do *knob* encaixa no diamante formado por quatro aminoácidos da hélice oposta (*hole*). Código PDB de estruturas usadas: 4U5T e 4PXJ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um dos primeiros trabalhos onde o C-terminal é abordado sugere a sua importância para manter a interação do dímero de septinas formado por SEPT6 e SEPT7 humanas.⁴⁵ Pouco depois, usando FRET, foi possível distinguir que a orientação do *coiled-coil* formado pelo C-terminal das SEPT6-SEPT7 é paralela.⁴⁹ Da mesma forma, a orientação paralela foi observada no *coiled-coil* formado pelas septinas de *Caenorhabditis elegans* (UNC-59 e UNC-61).¹²

Usando microscopia eletrônica, Bertin e colaboradores, identificaram a posição de cada uma das septinas de leveduras no filamento (Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11, nessa ordem).⁵⁰ Além disso, propuseram que filamentos poderiam associar-se lateralmente a través de um *coiled-coil* antiparalelo tetramérico formado pelos *coiled-coil*

paralelos das septinas Cdc3-Cdc12 e Cdc11 (figura 13), gerando um trilho de tem (dois filamentos alinhados).⁵⁰

Estudos biofísicos com o C-terminal de septinas humanas, demonstraram a preferência para a formação de *coiled-coils* heterodiméricos entre septinas do grupo SEPT6 e SEPT7. Embora seja possível a formação de homodímeros a afinidade dos *coiled-coil* heterodiméricos é maior, mostrando a importância da ordem correta de cada uma das subunidades na estabilidade do filamento.^{46,51}

Figura 13 - Modelo proposto para a formação de ligações cruzadas entre filamentos de septinas. Septinas de leveduras (Cdc) apresentam um domínio C-terminal que forma *coiled-coil* diméricos e paralelos para a estabilização do filamento. Quando dois filamentos adjacentes interagem, eles estariam estabilizados por um *coiled-coil* tetramérico antiparalelo formado por dois *coiled-coils* paralelos.

Fonte: Adaptada de BERTIN *et al.*⁵⁰

1.4 Formação de filamentos

A heteropolimerização de septinas é fundamental para suas funções.⁵²⁻⁵³ Para a formação dos heterofilamentos, o primeiro passo do estado funcional, é necessária a presença de pelo menos um representante de cada grupo de septinas para a formação da unidade básica do filamento: o oligômero, podendo ser um tetrâmetro, hexâmetro ou octâmetro dependendo da espécie^{12,50,54} (figura 14A). Em humanos, como um caso especial, septinas podem formar filamentos a partir de hexâmeros ou octâmeros. Esta unidade básica de polimerização forma oligômeros usando interfaces de contato específicas, como mencionado mais na frente, permitindo o crescimento do filamento em uma direção. Como segundo grau de complexidade funcional, estes heterofilamentos apolares e não helicoidais podem interagir e gerar estruturas de ordem superior como anéis, redes, gaiolas e outros^{52,55} (figura 14B). Se conhece bem a importância da formação de heterofilamentos, mas pouco se sabe a respeito dos mecanismos

moleculares que controlam a montagem deles e a subsequente formação de estruturas de ordem superior.

Figura 14 - Filamentos de septinas. (A) Filamentos formados por um representante de cada grupo de septinas em *C. elegans* (2 genes que codificam septinas), *H. sapiens* (13 genes) e *S. cerevisiae* (6 genes). (B) As diferentes estruturas de ordem superior formadas a partir de filamentos de septins (redes, anéis etc.). (C) Heterocomplexo formado pelas septinas SEPT2, SEPT6 e SEPT7. Observamos a interface G (sítio de ligação ao nucleotídeo) e NC (domínios N e C-terminal), os nucleotídeos ligados a cada proteína e a sugestão de formação de *coiled-coils* paralelos entre o C-terminal de SEPT6-SEPT7 e SEPT2.

Fonte: Adaptada de KINOSHITA *et al*⁵²; Elaborada pelo autor.

No caminho ao entendimento destes mecanismos moleculares, a estrutura cristalográfica do heterocomplexo formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 foi resolvido a uma resolução de 4 Å⁵⁴ (figura 14C). Embora a baixa resolução, a estrutura permitiu observar quatro características do filamento: 1) a unidade de polimerização do filamento é formada por um hexâmero; 2) existe uma ordem específica para cada subunidade, onde SEPT2 interage com SEPT6 e esta interage com SEPT7; 3) existem 4 interfaces diferentes de interação entre as subunidades e 4) há a presença de nucleotídeos endógenos (pois não foi adicionado excesso de nucleotídeo durante a expressão e purificação do heterocomplexo). As interfaces entre as subunidades são as que mantêm a estabilidade do filamento. São de dois tipos: a interface G, formada pela região do sítio de ligação ao

nucleotídeo e a interface NC, formada pelos domínios N e C-terminal (figura 14C). Observamos que existe uma interface G heterotípica entre SEPT2 e SEPT6, enquanto, uma interface G homotípica entre duas SEPT7. Do mesmo jeito observamos uma interface NC homotípica entre duas SEPT2, enquanto, uma interface NC heterotípica entre SEPT6 e SEPT7. Outras informações extraídas da estrutura cristalográfica são a presença de um eixo de rotação de ordem 2 (180°) na interface NC da SEPT2, que permite a formação do hexâmero a partir do trímero que compõe a unidade assimétrica. A estrutura também sugere a possível formação de *coiled-coil* paralelos na interface NC SEPT6-SEPT7 e SEPT2. Estas descobertas estimularam à comunidade científica para continuar os estudos em septinas, mostrando a presença do grupo I (SEPT9) no filamento (SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9) deixando um octâmero como unidade básica de polimerização.⁵⁶

A partir da estrutura cristalográfica, assim como de micrografias de microscopia eletrônica, definiram a posição de cada septina no hexâmero com SEPT7 nas pontas e SEPT2 no meio⁵⁴; para o octâmero seria SEPT9 nas pontas e SEPT2 no meio.⁵⁶ Recentemente esta orientação foi corrigida pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrando que SEPT2 estaria nas pontas e SEPT9 no meio do filamento⁵⁷ (figura 15). Este reordenamento deixa claro a importância da interface NC para o crescimento longitudinal do heterofilamento.

Figura 15 - Reordenamento das posições das septinas no octâmero como unidade básica de polimerização. Na parte superior da imagem observamos a ordem das subunidades do filamento proposto a partir da estrutura cristalográfica 2QAG (SEPT2-SEPT6-SEPT7) e microscopia eletrônica. Esta ordem foi subsequentemente corrigida, deixando o grupo da SEPT2 na ponta do filamento e o grupo da SEPT9 no meio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a presença de diversos genes que codificam septinas e um representante de cada grupo no filamento, se cogitava a possibilidade de filamentos formados por diferentes combinações de septinas. Efetivamente, em 2003, Kinoshita e colaboradores demonstraram que septinas podem ser substituídas por outras do mesmo grupo dentro do heterofilamento sem alterar a integridade dele.⁵⁸ Isto é, no heterofilamento formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, a SEPT2 pode ser substituída por SEPT1, SEPT4 ou SEPT5, enquanto, a SEPT6 pode ser substituída por SEPT8, SEPT10, SEPT11 ou SEPT14. A SEPT9 poderia ser substituída por SEPT3 ou SEPT12, enquanto, a SEPT7 por ser única no grupo estaria presente em todos os heterofilamentos possíveis. Baseado nestas descobertas, teríamos a possibilidade de formar 60 heterofilamentos diferentes (figura 16). Esta proposta nomeada pelo nosso grupo de pesquisa como “Regra de Kinoshita”, foi corroborada por outros trabalhos de pesquisa.⁵⁹⁻⁶⁰ Estas descobertas ampliam a especificidade de interação das subunidades no filamento para uma especificidade de interação para os grupo de septinas, sendo assim, uma especificidade para a formação da interface G entre septinas do grupo SEPT2 e SEPT6, interface NC entre o grupo SEPT6 e SEPT7, interface G entre o grupo SEPT7 e SEPT9, interface NC entre dois monômeros do grupo SEPT2 e finalmente interface NC entre dois monômeros do grupo SEPT9.

Figura 16 - Regras de substituição de septinas ou Regras de Kinoshita. Septinas poderiam ser substituídas no filamento, por outras do mesmo grupo sem alterar a integridade dele. Segundo esta proposta, teríamos 60 combinações possíveis para filamentos formado por 4 septinas diferentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apresentamos extensamente o heterofilamento de septinas como o estado funcional destas proteínas. Porém, homofilamentos de SEPT2 foram observados em sistemas de expressão de células de mamíferos sem alguma função fisiológica designada⁶¹. A formação de homofilamentos também foi observada em *crystallo* na estrutura cristalográfica do domínio G da SEPT2 e outras septinas individuais^{54,62-65} (figura 17). Estes homofilamentos são formados

pelas mesmas interfaces de interação vistas no heterofilamento, a interface G e interface NC. Isto permitiu classificar as interfaces como: interfaces fisiológicas (quando são formadas pelos parceiros corretos) ou promiscuas (quando a interação não foi observada no heterocomplexo). Assim temos que a interface G entre SEPT2 e SEPT6 no heterocomplexo seria uma interface fisiológica, enquanto, a interface G no homodímero de SEPT2 seria uma interface promiscua. Neste sentido, reforçamos a importância de conhecer os mecanismos moleculares que controlam a correta montagem do heterofilamento de septinas. Dado a facilidade em formar interfaces promíscuos *in vitro*, quais são os fatores que controlam a montagem correta de filamentos *in vivo*? Principalmente porque septinas dos diferentes grupos estão sendo expresso simultaneamente em uma célula ou tecido.

Particularmente, quais são os aspectos estruturais que controlam este processo? Este é um problema de reconhecimento molecular fino, mas a sua compreensão é fundamental para entender por completo a montagem de filamentos e seus complexos de ordem superior.

Figura 17 - Interações promiscuas em septinas individuais. Septinas formam homofilamentos no cristal utilizando as mesmas interfaces (G e NC) que o heterofilamento de septinas fisiológico (superior na figura). Os contatos não fisiológicos, como a interface G em SEPT3, SEPT2 e SEPT10, são consideradas interações promiscuas pois são formadas na ausência do parceiro, comparando com as interfaces G fisiológicas do filamento na parte superior da imagem. Código PDB das estruturas utilizadas: 3SOP, 4KVA, 2QNR, 6N0B e 2QAG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Expressar, purificar e cristalizar heterocomplexos de septinas é um grande desafio. Para facilitar a complexidade do trabalho, propusemos estudar as interfaces isoladamente. Assim, nosso trabalho aponta em desvendar os mecanismos moleculares que controlam a especificidade de interação na interface G formada pelo grupo SEPT2-SETP6 (figuras 14 e 15) e a interface NC formada pelo grupo SEPT2. Para alcançar este objetivo, será necessário desmembrar as septinas em seus diferentes domínios estruturais (N-terminal, G e C-terminal), principalmente para os estudos cristalográficos.

2 OBJETIVOS

2.1 Principal

Determinar as interações moleculares que dirigem a especificidade na interface G entre septinas do grupo II (SEPT6) e grupo III (SEPT2), e a interface NC formada pelo grupo III (SEPT2).

2.2 Específicos

- Clonar, co-expressar e co-purificar o domínio GTPase das septinas do grupo II (SEPT6, SEPT8 e SEPT11) e grupo III (SEPT2, SEPT4 e SEPT5).
- Caracterizar os complexos formados pelos domínios G das diferentes combinações das septinas mencionadas, usando as técnicas: cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos, cromatografia líquida de alta eficiência e nano- fluorimetria de varrimento diferencial.
- Cristalizar os heterocomplexos formados pelos domínios G das septinas do grupo II e III mencionadas e a região *coiled-coil* do domínio C-terminal das septinas do grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5).
- Investigar o impacto da inserção da região catalítica do *switch I* na SEPT6 (uma septina do grupo incapaz de hidrolisar o GTP).
- Utilizar as informações estruturais obtidas para contribuir com o modelo atual que descreve a montagem de oligômeros, filamentos e complexos de mais alta ordem.

3 METODOLOGIA

3.1 Definição dos domínios das septinas dos grupos II e III

Os domínios N-terminal, GTPase e C-terminal foram definidos usando a informação da base de dados Uniprot⁶⁶, sendo uma etapa fundamental para a clonagem dos domínios GTPase nos vetores de expressão e a síntese da região *coiled-coil* dos domínios C-terminal (figura 18). No Uniprot estão anotadas as posições exatas onde começa e termina cada domínio das septinas. Com esta informação foi possível definir cada domínio como mostra a figura 18.

3.2 Síntese da região *coiled-coil* das septinas do grupo III

O domínio C-terminal das septinas é caracterizado por apresentar uma região que permite a formação de *coiled-coils*, e com o objetivo de identificar esta região, estudos de *secondary NMR chemical shifts* dos carbonos alfa ($\Delta\delta C\alpha$) foram realizados para o domínio C-terminal da SEPT2 pelo Dr. Edson Crusca.

Uma vez identificada a região do *coiled-coil* na SEPT2, a região *coiled-coil* das septinas SEPT1, SEPT4 e SEPT5 foi definida após um alinhamento de sequências entre os domínios C-terminal das quatro septinas. Posteriormente, com fins comparativos, utilizamos o servidor online *Coiled-coil Prediction*⁶⁷ para identificar o *coiled-coil* nas sequências do C-terminal das septinas SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5. Finalmente, a síntese de peptídeos correspondentes à região do *coiled-coil* foi realizada pela empresa *GenScript*. Uma massa de 20 mg de peptídeo por amostra foi adquirida e as mesmas catalogadas com a nomenclatura: SEPT1CC, SEPT2CC, SEPT4CC e SEPT5CC.

>SEPT2 (Q15019)

MSKQQPTQFINPETPGYVGFANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLTL
 DLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIEERGVLRLTLVVDTPGYGDAINCRDCFKTIIS
 YIDEQFERYLHDESGLNRRHIIDNRVHCCFYFISPFHGHLKPLDVAFMKAIHNKVNIVPV
 IAKADTLTKERERLKKRILDEIEEHNIKIYHLPDAESDEDEDFKEQTRLLKASIPFSVV
 GSNQLIEAKGKKVRGRLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRMTMLITHMQDLQEVTDLHYENFR
 SERLKRGGKRVENEDMNKDQILLEKEAELRRMQEMIARMQAQMOMQGGDGGALGHV

>SEPT4 (O43236)

MDRSLGWQGNVSPEDRTEAGIKRFLEDTTDDGELSKFVKDFSGNASCHPPEAKTWASRPQ
 VPEPRPQAPDLYDDDLEFRPPSRPQSSDNQQYFCAPAPLSPSARPRSPWGKLDPYDSSSE
 DKEYVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVNSLFLTDLYRDRKLLGAE
 RIMQTVETKHAVDIEEKGVRLRLTIVDTPGFGDAVNNTCEWKPVAEYIDQQFEQYFRDE
 SGLNRKNIQDNRVHCCLYFISPFHGHLRPLDVEFMKALHQRVNIVPILAKADTLTPPEVD
 HKKRKIREEIEHFGIKIYQFPDCSDEDEDFKLQDQALKESIPFAVIGSNTVVEARGRRV
 RGRLYPWGIVEVENPGHCDLVKLRMTMLVRTHMQDLKDVTRETHYENYRAQCIQSMTRLVV
 KERNRNKLTRESGTDFFIPAVPPGTDPETEKLIREKDEELRRMQEMLHKIQKQMKENY

>SEPT5 (Q99719)

MSTGLRYKSKLATPEDKQDIDKQYVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTL
 VHSFLFLTDLYKDRKLLSAEERISQTVETILKHTVDIEEKGVKLKLTIVDTPGFGDAVNNT
 CWKPIITDYVDQQFEQYFRDESGLNRRKNIQDNRVHCCLYFISPFHGHLRPLVDVGFMKALHE
 KVNIVPLIAKADCLVPSEIRKLKERIREIDKFGIHVYQFPECDSDEDEDFKQDRELKE
 SAPFAVIGSNTVVEAKGQVRGRLYPWGIVEVENQAHCDLVKLRNMLIRTHMHLKDVTC
 DVHYENYRAHCIQQMTSKLTQDSRMESPIPIPLPPTDAETEKLI RMKDEELRRMQEMLQ
 RMKQQMQDQ

>SEPT6 (Q14141)

MAATDIARQVGEGCRTVPLAGHVGFDSLDPQLVNKSVSQGFCFNILCVGETGLGKSTLMD
 TLFNTKFEGEPATHTQPGVQLQSNITYDLQESNVRLKLTIVSTVGFGDQINKEDSYKPIVE
 FIDAQFEAYLQEELKIRRVLHTYHDSRIHVCLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNII
 PIIAKADAISKSELTKFKIKITSELVSNVQIYQFPTDDESVAEINGTMNAHLFFAVIGS
 TEELKIGNKMMRARQYPWGTVQVENEAHCDLVKLRMLIRVNMEDLREQTHTRHYELYRR
 CKLEEMGFKDTDPDSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMFVQVRVKEKEAELKEA
 EKELHEKFDRLLKHLHQDEKKKLEDKKSLDDEVNAFKQRKTAELLQSQGSQAGGSQTLK
 RDKEKKNPWLCTE

>SEPT8 (Q92599)

MAATDLERFSNAEPEPRSLSLGGHVGFDSLDPQLVSKSVTQGFSFNILCVGETGIGKSTL
 MNTLFNTTFETEEASHHEACVRLRPQTYDLQESNVRLKLTIVDAVGFGDQINKDESYPRI
 VDYIDAQFENYLQEELKIRRSFLDYHDTRIHVCLYFITPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVN
 IIPIIAKADTISKSELHKFKIKIMGELVSNVQIYQFPTDDEAVAEINAVMNAHLFFAVV
 GSTEEVKVGNKLVRARQYPWGVVQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHSRHYELY
 RRCKLEE MGFQDSGDQSQPFSLQETYEAKRKEFLSELQRKEEEMRQMFVNKVKETELELK
 EKERELHEKFEHLKRVHQEEKRVKEKRELEETNAFNRRKAAVEALQSQAALHATSQQP
 LRKDKDKNRSIDIGAHQPGMSLSSSKVMMTKASVEPLNCSSWWPAIQCCSCLVRDATWRE
 GFL

>SEPT11 (Q9NVA2)

MAVAVGRPSNEELRNLSLSGHVGFDSLDPQLVNKSTSQGFCFNILCVGETGIGKSTLMDT
 LFNTKFESDPATHNEPGVRLKARSYELQESNVRLKLTIVDTPGFGDQINKDSDYKPIVEY
 IDAQFEAYLQEELKIKRSLFNHYHDTRIHACLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNII
 IIAKADTIAKNELHKFKSKIMSELVSNVQIYQFPTDEETVAEINATMSVHLFFAVVGST
 EEVKIGNKMAKARQYPWGVVQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHTRHYELYRR
 KLEEMGFKDTDPDSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMFVVRVKEKEAELKEAE
 KELHEKFDDLKRTHQEEKKVEDKKKELEEEVNNFQKKKAAQLQSQAQQSGAQQTKKD
 KDKKNASF

N-terminal

GTPase

C-terminal

Figura 18 - Identificação dos domínios N, G e C-terminal na sequência de aminoácidos das septinas a serem estudadas. A definição dos domínios foi baseada nas informações presentes no *Uniprot* para cada septina. Identificado inicialmente o domínio G, foram subsequentemente definidos os domínios N e C terminal. Os códigos de anotação de cada septina estão ao lado de cada nome em parêntesis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Clonagem dos domínios GTPase das septinas do grupo II e III

Para realizar os estudos da formação de complexos via interface G, inserimos as regiões codificantes dos genes correspondentes ao domínio GTPase das septinas SEPT2, SEPT4 e SEPT5 (grupo III) e SEPT6, SEPT8 e SEPT11 (grupo II) no vetor bicistrônico pET-Duet-1. Este vetor de expressão se caracteriza por apresentar dois sítios de clonagem múltipla (*MCS*, sigla em inglês), cada um precedido pelas regiões promotora (T7), operadora (*lac*) e RBS (sítio de ligação ao ribossomo). Portanto, permite a expressão de duas regiões codificadoras num único vetor, facilitando a co-expressão. Além disso, o *MCS-1* apresenta uma sequência que permite incorporar um *tag* de poli-histidina (6xHis) na proteína recombinante, o que facilita a posterior purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC).

As sequências de DNA codificante (CDS, do inglês *Coding DNA sequence*) correspondentes aos domínios GTPase das septinas SEPT4, SEPT6 e SEPT11 foram amplificadas a partir do banco de dados de plasmídeos de septinas do Grupo de Biofísica do IFSC, usando oligonucleotídeos específicos, os quais continham sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *HindIII*, *NotI*, *NdeI* e *XhoI* (tabela 1). Neste banco de plasmídeos, os CDS completos (domínios N-terminal, G e C-terminal) ou truncados (algum domínio específico) das 13 septinas humanas foram inseridos em plasmídeos de propagação ou expressão para serem usados na construção de novas versões truncadas ou novas combinações para co-expressão, como no nosso estudo.

Tabela 1 - Lista de oligonucleotídeos específicos usando para a amplificação das CDS dos domínios G de septinas.

Nome do primer	Sequência
SEPT4G-F- <i>NdeI</i>	<i>gaccatatgggcttgactttacc</i>
SEPT4G-R- <i>XhoI</i>	<i>gacctcgagccggtagtctcata</i>
SEPT6G-F- <i>HindIII</i>	<i>gacaagcttggtctctgcttcaac</i>
SEPT6G-R- <i>NotI</i>	<i>taagcgccgcctcctccagcttaca</i>
SEPT11G-F- <i>HindIII</i>	<i>gacgaagcttttctgtttcaacatc</i>
SEPT11G-R- <i>NotI</i>	<i>tattgcggccgcccccatctcttcaag</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a confirmação da amplificação das CDSs por eletroforese em gel de agarose 1%, os produtos foram submetidos a digestão por endonucleases de restrição (tabela 2). O plasmídeo pET-Duet-1 foi digerido com as endonucleases de restrição *HindIII* e *NotI*, ficando com os sítios compatíveis para a inserção dos CDS de interesse (tabela 2). Depois da digestão e análise do perfil de restrição por eletroforese em gel de agarose 1%, os produtos compatíveis foram ligados usando a enzima T4 DNA ligase. A ligação dos CDSs foi realizada da seguinte forma: a SEPT6G e SEPT11G foram ligadas no vetor pET-Duet-1 gerando as construções pET-Duet-hisSEPT6G e pET-Duet-hisSEPT11G. Estas construções foram subsequentemente digeridas com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* para gerar sítios compatíveis com SEPT4G, o que permitiu obter as construções pET-Duet-hisSEPT6G-SEPT4G e pET-Duet-hisSEPT11G-SEPT4G.

Tabela 2 - Endonucleasas de restrição utilizadas para digerir os CDSs e construções dos domínios GTPase de septinas.

CDSs amplificados e construções do banco de plasmídeos de septinas	Endonuclease que corta no extremo 5'	Endonuclease que corta no extremo 3'
SEPT4G amplificada	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>
SEPT6G amplificada	<i>HindIII</i>	<i>NotI</i>
SEPT11G amplificada	<i>HindIII</i>	<i>NotI</i>
pET-Duet-1	<i>HindIII</i>	<i>NotI</i>
pET-Tev-SEPT2G	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>
pET-Duet-hisSEPT8G-SEPT5G	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

As construções pET-Tev-SEPT2G e pET-Duet-HisSEPT8G-SEPT5G (do banco de plasmídeos), foram digeridas com as endonucleases de restrição descritas na tabela 2 para liberar os fragmentos codificantes da SEPT2G e SEPT5G. Assim SEPT8G permaneceu no vetor, agora disponível para acolher outro CDS no seu MCS-2 (pET-Duet-HisSEPT8G).

Devido a que o construto pET-Tev-SEPT2G foi tratado com *NdeI* e *XhoI*, a SEPT2G liberada foi capaz de ser inserida nos vetores com SEPT6G e SEPT11G gerando: pET-Duet-hisSEPT6G-SEPT2G e pET-Duet-hisSEPT11G-SEPT2G. Ao mesmo tempo, SEPT2G foi inserida na construção pET-Duet-hisSEPT8G previamente tratada com endonucleases (tabela 2), gerando pET-Duet-hisSEPT8G-SEPT2G. Finalmente a SEPT5G liberada do construto pET-Duet-hisSEPT8G-SEPT5G, foi ligada nas construções pET-Duet-hisSEPT6G e pET-Duet-hisSEPT11G gerando as construções pET-Duet-hisSEPT6G-SEPT5G e pET-Duet-

hisSEPT11G-SEPT5G. Todas as construções foram confirmadas inicialmente por PCR de colônias e posteriormente por sequenciamento automático de DNA.

Com três representantes de cada grupo obtivemos 9 combinações de complexos formados por septinas diferentes. O complexo formado por SEPT2G e SEPT6G foi excluído do trabalho porque foi designado como estudo do projeto de iniciação científica do aluno Higor Vinícius Dias Rosa, deixando 8 combinações para realizar nossos estudos (tabela 3).

Tabela 3 - Lista das diferentes combinações obtidas para co-expressão e co-purificação dos complexos formados pelo domínio G de septinas. SEPT2G-SEPT6Ghis foi excluída do trabalho porque foi designada para estudo do projeto de iniciação científica do aluno Higor Vinícius Dias Rosa.

		<i>Septinas do grupo II</i>		
		SEPT6G	SEPT8G	SEPT11G
<i>Septinas do grupo III</i>	SEPT2G	SEPT2G-SEPT6Ghis	SEPT2G-SEPT8Ghis	SEPT2G-SEPT11Ghis
	SEPT4G	SEPT4G-SEPT6Ghis	SEPT4G-SEPT8Ghis	SEPT4G-SEPT11Ghis
	SEPT5G	SEPT5G-SEPT6Ghis	SEPT5G-SEPT8Ghis	SEPT5G-SEPT11Ghis

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Co-expressão e co-purificação dos heterocomplexos

Os vetores de expressão contendo os CDS de interesse (tabela 3) foram inseridos em *E. coli* Rosetta (DE3) quimiocompetentes, utilizando a técnica de transformação bacteriana.⁶⁸ Após a transformação as células foram inoculadas em placa com meio LB-ágar 1.5% seletivo (suplementado com ampicilina 50 µg/mL - AMP e cloranfenicol 34 µg/mL - CLO) por 16h a 37 °C. Uma colônia isolada de cada construção foi então inoculada em 10 mL de meio LB contendo AMP/CLO e incubada por 16 h a 37 °C e agitação de 80 rpm. Após incubação, as culturas foram transferidas para um erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB com AMP/CLO para realizar os testes de expressão e solubilidade para cada construção. As culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação a 150 rpm até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Atingida a DO, a expressão das proteínas foi induzida com diferentes concentrações de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG): 0,1, 0,3, 0,5 e 0,7 mM. Para cada construção e concentração de IPTG, foram removidos 10 mL do meio de cultura em tempos diferentes após a indução da expressão: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 16 h. Cada amostra foi centrifugada a 6,000 x g por 45 min a 4°C para separar o pellet bacteriano do meio de cultura. O pellet bacteriano foi solubilizado em 1 mL tampão A (25 mM Tris-HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50

mM ácido L-glutâmico, 50 mM L-arginina, 10% (v/v) glicerol e 5 mM β -Mercaptoetanol) e submetido a lise por ultrasonicação. A fração solúvel da insolúvel foi separada por centrifugação a 16,000 x g por 30 min, a 4°C. Finalmente, a solubilidade das proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Depois dos testes de expressão, a condição que permitiu obter uma maior quantidade de proteína solúvel foi escalonada para expressar as proteínas em 1 litro de meio de cultura. Uma colônia isolada de cada construção foi incubada em 10 mL de meio LB suplementado com AMP/CLO e incubada por 16 h a 37 °C e agitação de 80 rpm. Ao final da incubação as culturas foram transferidas para um erlenmeyer contendo 1 litro de meio LB com AMP/CLO, o qual foi incubado a 37 °C sob agitação a 150 rpm até atingir uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. Atingida a DO, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 0,3 mM de IPTG, incubando por 16 h a 18 °C, sob agitação de 150 rpm.

Após 16 horas de incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 6,000 x g por 45 min, a 4 °C. Em seguida, o sedimento foi solubilizado em 25 mL tampão A. As células foram submetidas a lise por ultrasonicação com 16 ciclos de 30 segundos e intervalos de 59 segundos por cada ciclo de sonicação. A fração solúvel foi separada da insolúvel por centrifugação a 16,000 x g por 45 min, a 4 °C e transferida a um novo tubo para prosseguir com a purificação dos complexos.

A primeira etapa de purificação foi realizada por IMAC, a qual é possível pela presença de uma cauda de seis histidinas, cuja sequência codificante esta fusionada no extremo 5' das CDS que foram inseridas no *MCS-1* do pET-Duet-1. Assim, a fração do extrato solúvel contendo cada complexo foi aplicada numa coluna cromatográfica com 3 mL de resina *TALON*[®] (GE Healthcare) equilibrada com 5 vezes o volume do tampão A. Após a imobilização dos complexos na resina, foram feitas lavagens com 5X o volume do tampão A e 3X o volume do tampão A + 10 mM de imidazol (para remover contaminantes de baixa afinidade). Finalmente, os complexos foram eluidos com 5 mL de tampão A + 250 mM de imidazol. Esta etapa foi repetida duas vezes para garantir a eluição total das proteínas imobilizadas na resina.

A cromatografia de exclusão por tamanho ou exclusão molecular (SEC) foi utilizada como segunda etapa de purificação. As eluições de cada complexo, provenientes da primeira etapa de purificação, foram concentradas até um volume de 2 mL e injetadas numa coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade* acoplada num sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare). A coluna foi pre-equilibrada com tampão B (20 mM Hepes pH 7,8, 500 mM

NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM ácido L-glutâmico, 50 mM L-arginina e 10% (v/v) de glicerol). A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 1 mL/min, com uma eluição isocrática de 1,5X do volume total da coluna, sendo as proteínas monitoradas pela absorção a 280_{nm} e as frações coletadas em volume de 1 mL.

Todas as frações coletadas em ambas as etapas de purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

3.5 Caracterização biofísica

3.5.1 Determinação do estado oligomérico usando cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS)

A cromatografia de exclusão molecular analítica permite, além de separar moléculas pela sua massa molecular, identificar o estado oligomérico das espécies presentes em solução. A massa calculada, usando uma curva de calibração, é obtida principalmente pelo volume de eluição da amostra. Estes valores podem ser facilmente influenciados pelo formato da molécula, sendo que a técnica permite calcular com maior acurácia a massa de uma molécula com formato de esfera.⁶⁹ Septinas caracterizam-se por formar oligômeros e filamentos, os quais podem crescer ao longo de um único eixo, gerando estruturas em formato alongado ou de bastão; esta característica impede identificar o estado oligomérico das espécies observadas em solução com precisão a partir de uma curva padrão. Por esse motivo, optamos pela técnica do SEC-MALS que utiliza o espalhamento de luz no lugar do volume de eluição para calcular a massa molecular das espécies observadas em solução, e por consequência, o estado oligomérico.⁷⁰

Os 8 heterocomplexos eluídos da SEC, em um volume de 50 µL e uma concentração de 2 mg/mL (centrifugados a 16,000 x g por 10 min a 4 °C), foram injetados numa coluna de exclusão molecular *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (GE Healthcare) equilibrada no tampão 25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl e 5 mM MgCl₂. A coluna cromatográfica foi acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) *Waters 600* (Wyatt Technology), um detetor de espalhamento *miniDAWN TREOS* (Wyatt Technology) com a capacidade de detecção em três ângulos (43,6°, 90.0° e 136.4°) e um refratômetro *Optilab T-rEX* (Wyatt Technology). A corrida cromatográfica foi realizada sob um fluxo contínuo de 0.5

mL/min. Os dados foram analisados no programa *ASTRA* fornecido pelo próprio equipamento (*Wyatt Technology*).

3.5.2 Análise do conteúdo de nucleotídeo

Septinas são proteínas, que na maioria dos casos, ligam e/ou hidrolisam o GTP. Para determinar a presença e o tipo de nucleotídeo (GTP e/ou GDP) ligado ao heterocomplexos, as amostras purificadas foram submetidas a desnaturação química para a liberação dos possíveis nucleotídeos ligados. Posteriormente, o conteúdo liberado foi analisado por HPLC usando a metodologia descrita por Seckler, com pequenas modificações.⁷¹

Resumidamente, 500 µL de cada heterocomplexo em uma concentração de 25 µM foram incubados com 250 µL de ácido perclórico gelado (HClO₄ -1,5M) por 10 minutos para desnaturar as proteínas (nesta etapa e nas seguintes as reações foram mantidas em gelo). Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 16,000 x g por 10 min, a 4 °C para separar o precipitado da fração solúvel. Em seguida, 600 µL da fração solúvel foram transferidos para um novo microtubo e foi adicionado 100 µL de K₂HPO₄ 1M, 100 µL de KOH 3M e 80 µL de ácido acético 5M (todas as soluções geladas). A seguir, as amostras foram incubadas a -20 °C por pelo menos 1 hora e por fim descongeladas e centrifugadas a 16,000 x g por 10 min, a 4 °C. Padrões de GDP e GTP nas concentrações de 10 µM, assim como uma amostra do tampão, foram submetidos ao mesmo procedimento.

Alíquotas de 200 µL de cada amostra foram extraídas e colocadas em um microtubo de vidro. Logo depois, 150 µL foram aplicados em uma coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 10 µm, 7,5 mm x 7,5 mm (*Waters*), equilibrada em 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e acoplada num cromatógrafo *Alliance 2695*, sob monitoramento da absorbância a 253 nm. A cromatografia foi realizada sob um gradiente de NaCl como descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Gradiente utilizando na cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (minutos)	% Tampão A (25 mM Tris HCl pH 8,0)	% Tampão B (25 mM Tris HCl pH 8,0 NaCl 1M)
0	90	10
1	90	10
10	55	45
11	0	100
14	0	100
15	90	10
17	90	10

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.3 Termostabilidade usando *Tycho technology*

Esclarecer as consequências de substituir uma septina por outra do mesmo grupo num complexo foi dos principais objetivos deste trabalho. Uma forma de avaliar essa questão foi determinando as diferenças na termostabilidade para cada heterocomplexo. Assim, experimentos para determinar a temperatura de desnaturação baseado na fluorescência intrínseca do triptofano foram realizados para cada heterocomplexo usando o equipamento *NanoTemper Tycho NT.6* (*NanoTemper Technologies*, Alemanha).

As amostras, em uma concentração de 5 μ M, foram carregadas em capilares UV (*NanoTemper Technologies*, Alemanha) e submetidas a um gradiente de temperatura de 35 a 90°C sob uma taxa de aumento da temperatura de 30 °C/min. A desnaturação dos heterocomplexos foi monitorada pelas mudanças dependentes da temperatura na fluorescência do triptofano nos comprimentos de onda 330 e 350 nm. Com isso, foi determinada a temperatura de inflexão (Ti) a partir do máximo da primeira derivada da razão da fluorescência (350/330 nm). Todas as medidas foram realizadas em triplicata usando como tampão 25 mM Hepes pH 7,8, 300 mM NaCl, 5mM MgCl₂ e 5 %(v/v) glicerol.

3.6 Cristalização, coleta de dados e resolução da estrutura

Os ensaios de cristalização dos 8 heterocomplexos foram realizados usando a técnica de difusão de vapor por gota sentada automatizada, através do robô de cristalização *Crystal Gryphon* (*Art Robbins Instruments*), em placas *Intelli-plate 96-3 low profile* (*Art Robbins Instruments*). Foram usados os kits comerciais *Morpheus* (*Molecular Dimensions*), *BCS*

Screen (Molecular Dimensions) e *JCSG-plus (Molecular Dimensions)*. A proporção da solução de cristalização e proteína foi de 1:1, com os volumes de 0,2/0,2 µL, com 50 µL de solução de cristalização no reservatório. Foram usadas três concentrações de proteína para todos os heterocomplexos: 2,0, 4,0, e 6,0 mg/mL. Finalmente a placa foi selada com um filme adesivo e posteriormente mantida a 18°C com monitoramento diário.

Para os ensaios de cristalização dos *coiled-coils* SEPT1CC, SEPT2CC, SEPT4CC e SEPT5CC utilizamos a técnica de difusão de vapor por gota pendurada em placas VDXm Plate com 24 poços (*Hampton Research*). Com as proporções de 1:1 (1 µL/1 µL) de solução de cristalização e proteína, 500 µL de solução no reservatório e três diferentes concentrações de proteína (10,0, 15,0, e 20,0 mg/mL). A cristalização foi feita segundo as condições fornecidas pelo Dr. Napoleão Valadares (tabela 5). Estas condições foram base para o refinamento em fatoriais variando a concentração do agente precipitante e pH do tampão.

Tabela 5 – Condições de cristalização iniciais dos *coiled-coil* do grupo III utilizadas para refinamento.

Proteína	Condição de cristalização
SEPT1CC	0,2 M acetato de zinco, 20 % PEG3350
SEPT2CC	bis-tris Propano pH 7,0, 2,4 M malonato de sódio
	20% PEG3350, 0,2 M tiocianato de potássio, tris pH 9,1
SEPT4CC	0,1 M acetate de sódio pH 4,6, 0,2 M NH ₄ SO ₄ , 22% PEG4000
	0,2 M formato de sódio, 20% PEG3350
SEPT5CC	2,4 M malonato de sódio pH 7,0
	1,6 M NH ₄ SO ₄ , ácido cítrico pH 5,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após aproximadamente 72 horas, os cristais foram retirados da gota de cristalização cuidadosamente com um *MicroLoop (MiTeGen)* de tamanho compatível com o tamanho do cristal. Antes do resfriamento, os cristais sem crio-protetor na condição de cristalização, passaram sob uma solução crio-protetora formada por 20% de glicerol ou PEG200 e 80% da sua solução de cristalização respectiva.

A coleta de dados foi realizada nos sincrotrones *ALBA* (Barcelona, Espanha) e *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra), nas linhas *BL13-XALOC* e *I24/I04* respectivamente. Ambos têm um sistema de micro-foco (tamanho do feixe entre 1-5 µm) que complementado com um processo denominado *grid-scan*, permitem encontrar a região de máxima difração do cristal.⁷²

Os dados coletados para os heterocomplexos foram indexados, integrados e escalonados usando o programa Xia2⁷³ pelo próprio servidor do sincrotron Diamond Light Source. Antes de resolver o problema das fases, foi necessário estimar o número de moléculas na unidade assimétrica, para isso utilizamos o programa Matthew_coeff.⁷⁴ O problema das fases foi resolvido usando o programa Phaser⁷⁵ com a estrutura do heterodímero SEPT2-SEPT6 (6UPA) como modelo para a substituição molecular, estrutura resolvida pelo aluno Higor Vinícius Dias Rosa do nosso grupo de pesquisa. Em seguida, ciclos de refinamento e reconstrução da estrutura foram realizados automaticamente e manualmente com os programas phenix.refine⁷⁶ e Coot⁷⁷, respectivamente. Durante o refinamento, o comportamento dos valores de *R* e *R*_{free}, assim como os parâmetros de estereoquímica calculados pelo programa Molprobit, foram monitorados até a obtenção do modelo final.

Os dados coletados dos *coiled-coil* foram indexados, integrados e escalonados usando o programa XDS.⁷⁸ Pela dificuldade em resolver o problema das fases por substituição molecular com Phaser, optou-se pelo programa Arcimboldo_lite que realiza faseamento ab initio combinando a localização de pequenos fragmentos de hélices- α com Phaser e modificação da densidade eletrônica com SHELXE.⁷⁹ Após a obtenção de um modelo inicial, ciclos de refinamento foram realizados como descritos anteriormente.

As estruturas foram analisadas usando o programa PyMol⁸⁰, DIMPLO⁸¹, PISA⁸² e SOCKET.⁸³ Finalmente foram depositadas na base de dados de proteínas Protein Data Bank, com os códigos: 6UPR (SEPT2-SEPT8), 6UPQ (SEPT2-SEPT11), 6WBE (SEPT1CC), 6WB3 (SEPT4CC) e 6WCU (SEPT5CC).

3.7 Mutações no *switch I* da SEPT6

Para entender a importância da existência de um grupo de septinas com a incapacidade de hidrolisar o GTP, foram propostos mutantes da SEPT6 na região do *switch I* (especificamente na região da deleção da treonina catalítica) com o intuito de obter uma SEPT6 capaz de hidrolisar o GTP para GDP.

Após um alinhamento de sequência entre os domínios GTPase das septinas do grupo II, III e IV, foram selecionados os aminoácidos de 71 a 78 (5 aminoácidos do gap mais a mutação dos 3 seguintes = 8 aminoácidos) da SEPT2 e SEPT7 para ser inseridos na região inexistente na SEPT6 gerando os mutantes: SEPT6_{swI_2} e SEPT6_{swI_7} (figura 19). Os mutantes foram gerados usando a metodologia descrita por Edelheit *et al*, 2009.⁸⁴

Uma segunda versão do mutante SEPT6_{swI_2} foi planejado após análise da estrutura cristalográfica da SEPT2-SEPT6 (6UPA), sendo que além de inserir os 5 aminoácidos deletados e mutar os 3 contíguos no *switch I*, foi realizada a mutação da V102P (sendo a valina um aminoácido característico no grupo da SEPT6), gerando o mutante SEPT6_{swI_2_VxxP}. Este mutante foi encomendado pela empresa FastBio (Ribeirão Preto, Brasil).

Figura 19 - Alinhamento entre septinas do grupo I (verde), II (azul claro), III (vermelho) e IV (amarelo). Mostramos os primeiros 96 aminoácidos alinhados entre os domínios GTPases das septinas humana. Os aminoácidos do switch I inseridos em SEPT6, baseados na sequência da SEPT2 e SEPT7, assim como a mutação da valina conservada estão marcados na caixa vermelha. No alinhamento está pintado de roxo a posição da treonina catalítica, mostrando que para o grupo II (SEPT6) é um aminoácido qualquer.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os mutantes foram subclonados no pET-Duet que já apresentava a SEPT2G em um de seus MCS, com a finalidade de avaliar o impacto das mutações na formação dos complexos. Os novos heterocomplexos foram co-expressos, purificados e analisados por HPLC para o teor de nucleotídeo ligado. O mutante SEPT6_{swI_2_VxxP} foi expresso e purificado sozinho para posterior análise do teor de nucleotídeo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Especificidade de interação da interface G entre septinas do grupo II e III

4.1.1 Septinas do grupo II e III formam heterodímeros com diferentes termoestabilidades

O domínio GTPase das septinas SEPT2, SEPT4 e SEPT5 (grupo III) com as septinas SEPT6, SEPT8 e SEPT11 (grupo II) foram clonadas no vetor de expressão pET-Duet-1, gerando 9 combinações diferentes de heterocomplexos (tabela 3). Após a clonagem, os testes de expressão foram realizados para 8 combinações (excluindo SEPT2G-SEPT6G, como mencionado nos métodos) na cepa bacteriana *E. coli* Rosetta (DE3). Durante os testes de expressão foi observado a formação de heterocomplexos aparentemente equimolares por avaliação no gel de SDS-PAGE 10% para as septinas SEPT2G-SEPT8G, SEPT2G-SEPT11G, SEPT4G-SEPT6G e SEPT4G-SEPT8G, enquanto, nos heterocomplexos SEPT4G-SEPT8G, SEPT5G-SEPT6G, SEPT5G-SEPT8G e SEPT5G-SEPT11G foi observada uma banda predominante (pertencente a proteína com cauda de histidina) indicando possivelmente a falta de equimolaridade durante a expressão. Seguindo as recomendações dos colegas do grupo de pesquisa, que observaram o mesmo comportamento para outros heterocomplexos, foram encomendadas novas construções (empresa *FastBio*, Ribeirão Preto) para estes heterocomplexos alterando a posição do CDS que expressa a septina com cauda de histidina (tabela 6). Dessa forma, tivemos 4 heterocomplexos com a cauda de histidina nas septinas do grupo II (verde) e 4 heterocomplexos com a cauda de histidina nas septinas do grupo III (azul claro).

Tabela 6 - Combinações finais dos heterocomplexos estudados. Em azul estão pintadas as septinas que pertencem ao grupo II e em vermelho as septinas do grupo III. Do mesmo jeito, as construções que estão pintadas de verde apresentam a cauda de histidina nas septinas do grupo II, enquanto as que estão pintadas de azul claro nas septinas do grupo III.

	SEPT6G	SEPT8G	SEPT11G
SEPT2G		SEPT2G-SEPT8Ghis	SEPT2G-SEPT11Ghis
SEPT4G	SEPT4G-SEPT6Ghis	hisSEPT4G-SEPT8G	SEPT4G-SEPT11Ghis
SEPT5G	hisSEPT5G-SEPT6G	hisSEPT5G-SEPT8G	hisSEPT5G-SEPT11G

Fonte: Elaborada pelo autor.

As 8 combinações finais foram co-expressas de forma solúvel e co-purificadas por cromatografia de afinidade a cobalto mostrando duas bandas aproximadamente equimolares no gel de SDS-PAGE (10%) (figura 20).

Devido a tendência de formar filamentos e estruturas de ordem superior, se viu a necessidade de realizar a cromatografia de exclusão molecular para identificar a presença de diferentes estados oligoméricos. Tomando como referência o cromatograma da SEPT2G-SEPT11G, observamos três picos principais durante a purificação do heterocomplexo (figura 21A). O primeiro pico, saindo no volume de 53 mL, representa agregados proteicos ou formas oligoméricas maiores a 200 kDa (tamanho de exclusão da coluna). O segundo e terceiro picos correspondem a um dímero (81 kDa) e monômero (36 kDa), respectivamente, uma vez que os domínios N e C-terminal foram removidos dos CDSs (evitando a polimerização em filamentos).⁴³ O estado oligomérico foi estimado com uma curva de calibração (figura 21B). Analisando o gel de SDS-PAGE do cromatograma da SEPT2G-SEPT11G observamos que a equimolaridade das bandas decai quando chega ao pico 3 (figura 21C), deixando só a septina que tem a cauda de histidina (SEPT11G) em maior quantidade (o que indicaria a presença de monômeros de SEPT11G no pico 3). Este mesmo padrão de três picos foi observado nos sete heterocomplexos restantes.

Alíquotas do pico 2, foram concentradas e injetadas numa coluna analítica Superdex 200 10/300 GL para avaliar a formação de agregados proteicos e outros estados oligoméricos após a segunda etapa de purificação. Como mostra a figura 21D, os 8 heterocomplexos eluíram da coluna aproximadamente no mesmo volume com pequenas quantidades de agregados proteicos eluindo antes. O gel de SDS-PAGE mostrou que o pico predominante apresenta as duas septinas de forma equimolar (figura 21E). Isto sugeriu que o pico 2 mantém o seu estado oligomérico após a concentração da proteína e principalmente a equimolaridade das amostras, característica importante para dar continuidade ao trabalho.

Figura 20 - Gel SDS-PAGE (10%) da cromatografia de afinidade a cobalto dos heterocomplexos. Alíquotas coletadas durante a purificação das proteínas, identificando cada septina nas eluições finais. M: marcador de massa molecular, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2: eluições com 250 mM de imidazol. Todos os heterocomplexos mostram as duas septinas de forma aproximadamente equimolar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). (A) Cromatograma da SEP2G-SEPT11G mostrando 3 picos durante a purificação (HiLoad superdex 200 16/60 pg). (B) Os picos II e III foram estimados com as massas para um dímero (81 kDa) e monômero (36 kDa), respectivamente. (C) O gel SDS-PAGE mostra a presença de ambas septinas em forma equimolar no pico 2, enquanto, no pico 1 a presença da SEPT11G predomina (sugerindo um monômero em solução). Este perfil é mantido nos outros heterocomplexos. (D) Análise da homogeneidade do pico 2 de todos os heterocomplexos mostrados após a coluna analítica Superdex 200 10/300 GL, baixo as mesmas condições de purificação inicial. (E) Todos os heterocomplexos eluem em aproximadamente o mesmo volume e de forma equimolar (como mostrado nos géis de SDS-PAGE) e com pequenas quantidades de agregados proteicos eluindo antes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Confirmar o estado oligomérico do pico 2 foi necessário para continuar com a caracterização biofísica e ensaios de cristalização. As alíquotas pertencentes ao máximo do pico 2 foram concentradas e analisadas por SEC-MALS. Todos os heterocomplexos mostram um pico predominante com a massa molecular correspondente a um dímero de septinas (figura 22), como comparado com a massa molecular teórica para um heterodímero (tabela 7). Podemos notar a presença de um segundo pico, com baixa intensidade, nas amostras da SEPT2G-SEPT8G e SEPT4G-SEPT8G, correspondente à massa molecular de um monômero. Embora a presença deles nas amostras, a sua baixa intensidade indica que é apenas uma pequena população monomérica numa solução onde predomina o estado heterodimérico. Estes resultados, portanto, confirmam a presença de heterodímeros provavelmente formados

pela interface G entre septinas do grupo II e grupo III, pois foram removidos os domínios N e C-terminal das construções. Até o momento a formação de heterodímeros entre integrantes dos grupos II e III foi estudada principalmente no caso do heterodímero SEPT2-SEPT6⁸⁵⁻⁸⁶, mas também foi reportada a formação dos complexos SEPT5-SEPT8 e SEPT5-SEPT11.⁸⁷⁻⁸⁹ Para estes últimos, a formação do complexo foi confirmada por duplo híbrido, enquanto, para SEPT2-SEPT6 foi realizada a expressão recombinante dos domínios G de ambas as septinas. Embora no trabalho de Zen & Wittinghofer⁸⁵ (2014) os autores não mencionem a presença de monômeros na purificação de SEPT2-SEPT6, o perfil do cromatograma mostra pequenas quantidades de monômeros em solução. Por outro lado, Kumagai e colaboradores⁸⁶ (2016), confirmam a presença de SEPT6 monomérica durante a purificação do heterodímero (no caso era a SEPT6 que apresentava a cauda de histidina). Outro ponto a ser destacado é o uso da coluna Superdex 200 10/300 GL para a purificação dos heterodímeros em ambos os trabalhos. Mesmo a coluna tendo resolução para mostrar os heterodímeros e monômeros, o volume total dela (24 mL) não permite separar eficientemente as duas espécies em solução. Usando a coluna HiLoad Superdex 200 16/60 gd (120 mL), fomos capazes de separar dímeros de monômeros com maior eficiência. Isto é refletida na qualidade dos cromatogramas do SEC-MALS.

Septinas, por serem GTPases, tem a capacidade de ligar e hidrolisar o GTP. Tanto a estrutura cristalográfica do heterocomplexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, como diversos estudos mostraram a presença de nucleotídeos ligados em septinas expressas nos diferentes sistemas recombinantes.^{54,63-65} Sob essa premissa, realizamos a análise de conteúdo de nucleotídeo endógeno nos heterodímeros purificados.

Figura 22 - Cromatograma dos heterodímeros obtidos por SEC-MALS. Observamos o espalhamento de luz a 90° normalizado (LS), o índice refratário diferencial normalizado (dRI) e as massas moleculares correspondentes aos picos predominantes para cada heterocomplexo (linhas entre os cromatogramas). Todos os heterocomplexos mostraram uma massa molecular calculada próxima à esperada para um dímero de septinas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Massa molecular teórica e calculada pelo SEC-MALS para todos os heterodímeros de septinas.

Proteína	Massa molecular teórica	Massa molecular calculada por SEC-MALS
SEPT2G-SEPT8Ghis	63,7 kDa	$68,3 \pm 0,9$
SEPT2G-SEPT11Ghis	65,2 kDa	$67,8 \pm 0,9$
SEPT4G-SEPT6Ghis	64,3 kDa	$66,8 \pm 0,7$
hisSEPT4G-SEPT8G	64,1 kDa	$65,9 \pm 0,5$
SEPT4G-SEPT11Ghis	64,6 kDa	$65,4 \pm 0,3$
hisSEPT5G-SEPT6G	63,7 kDa	$62,1 \pm 0,6$
hisSEPT5G-SEPT8G	65,2 kDa	$65,5 \pm 0,3$
hisSEPT5G-SEPT11G	64,0 kDa	$64,6 \pm 0,4$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Identificamos tanto GTP como GDP ligado em todos os heterodímeros, em quantidades aproximadamente equimolares (figura 23). A presença de ambos os nucleotídeos é esperada, uma vez que septinas do grupo II não tem capacidade de hidrolisar o GTP para GDP, enquanto, o grupo III é cataliticamente ativo. Esses resultados coincidem com os já reportados na literatura, reforçando a importância dos nucleotídeos ligados na estabilização dos complexos de septinas, uma vez que na ausência de nucleotídeos não há formação de homo ou heterodímeros.⁹⁰⁻⁹¹ Portanto, como houve formação de heterodímeros nas nossas amostras era esperado que tenham nucleotídeo ligado.

Com amostras de qualidade, heterodímeros de septinas ligados a seus respectivos nucleotídeos, começamos a explorar métodos para avaliar a regra de Kinoshita. Escolhemos medir a termoestabilidade de cada um dos heterodímeros. Técnicas clássicas como dicroísmo circular precisam de amostras com baixo conteúdo de sal⁹², condição que desestabiliza o complexo de septina ou permite a polimerização dele.^{54,93} O NanoDSF (*Tycho System*) permite medir a temperatura de inflexão (Ti), independente do tampão das amostras. Portanto, a termoestabilidade de cada um dos heterodímeros foi medida usando o *Tycho System*.

A figura 24 mostra a razão (350nm/330nm) da primeira derivada normalizada, em função da temperatura, medida para cada heterodímero. Os heterodímeros que apresentam a SEPT2G são os mais termoestáveis com 69,4 °C para SEPT2G-SEPT11G e 65,9 °C para SEPT2G-SEPT8G (figura 24D). É importante mencionar que todos os dímeros formados com SEPT8G são os que apresentam menor valor de Ti para os heterocomplexos de septinas do grupo II e III. Em SEPT2G-SEPT11G observamos dois picos com diferentes Ti, o que poderia indicar a presença de contaminantes ou duas espécies em solução. Uma vez que no caso do heterodímero SEPT2G-SEPT8G também houve sinais de um segundo pico, e para este o SEC-MALS indicou a presença de uma pequena quantidade de monômeros (figura 22), especula-se de que a presença do segundo pico nos experimentos de termoestabilidade seja devido a monômeros existentes na solução inicial ou monômeros produto da dissociação dos heterodímeros durante o experimento.

Figura 23 - Cromatografia de troca iônica após a liberação de nucleotídeos endógenos dos heterodímeros. Os padrões GTP e GDP são mostrados em linhas pontilhadas, enquanto, as amostras de septinas nas linhas cheias. Todos os heterodímeros apresentam GTP e GDP endógeno ligado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Termoestabilidade dos heterodímeros de septinas do grupo II e III. Os gráficos em A, B e C mostram a razão da primeira derivada normalizada (350nm/330 nm) em função da temperatura. Os picos indicam a temperatura na qual a metade da população de heterodímeros presentes em solução, perderam a sua estrutura tridimensional nativa (Ti). (D) Os pares que apresentam a SEPT8G são os que tem o menor valor de Ti, enquanto, os que apresentam SEPT2G apresentam o maior valor de Ti. Isto sugere uma preferência de interação entre as combinações.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os fatores que influenciam na termoestabilidade de uma proteína são a hidrofobicidade, empacotamento entre complexos, deleção ou presença de loop curtos, número de cavidades, área da superfície de contato em complexos, substituições de aminoácidos dentro e fora de elementos de estrutura secundária, a presença de prolinas em hélices alfa, número de aminoácidos termolábeis, o número de ligações de hidrogênio e pontes salinas, entre outros.⁹⁴

Se bem alguns destes fatores podem ser avaliados analisando a sequência de aminoácidos, é necessário analisar a estrutura tridimensional de cada um dos heterodímeros para apoiar estes resultados. Portanto, realizamos tentativas de cristalização para todos os heterodímeros estudados.

4.1.2 A estrutura cristalográfica da SEPT2G-SEPT11G e SEPT2G-SEPT8G revelam interações específicas entre os grupos II e III

Com 8 heterodímeros purificados, a cristalização foi bem sucedida em 4 deles: SEPT2G-SEPT8G, SEPT2G-SEPT11G, SEPT4G-SEPT8G e SEPT5G-SEPT8G (as condições de cristalização estão descritas na tabela 8). A coleta e resolução da estrutura cristalográfica, por outro lado, foi realizada apenas para os heterodímeros SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G, pois os cristais dos outros heterocomplexos não geraram padrões de qualidade para o processamento de dados. Ambas as estruturas foram resolvidas em alta resolução com 1,86 Å para SEPT2G-SEPT11G e 2,30 Å para SEPT2G-SEPT8G, sendo as estruturas de heterocomplexos de septinas de mais alta resolução reportadas até hoje. Os parâmetros de coleta, refinamento e depósito das estruturas estão descritos na tabela 9.

Tabela 8 - Condições de cristalização de quatro heterodímeros de septinas.

Proteína	Condição de cristalização
SEPT2G-SEPT8G	100 mM MES/imidazol pH 6,5, 10% (w/v) PEG 8000, 20% (w/v) etilenoglicol e 20 mM de cada um dos seguintes reagentes: 1,6-hezanodiol, 1-butanol, (RS)-1,2,-propanodiol, 2-propanol, 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol
SEPT2G-SEPT11G	100 mM MES/imidazol pH 6,5, 10% (w/v) PEG 20000, 20% (w/v) PEG 550 MME e 30 mM de cada um dos seguintes reagentes: nitrato de sódio, hidrogenofosfato dissódico e fosfato de amônio

(continua)

(continuação)

Tabela 9 - Condições de cristalização de quatro heterodímeros de septinas.

SEPT4G-SEPT8G	100 mM MES/imidazol pH 6,5, 10% (w/v) PEG 8000, 20% (w/v) etilenoglicol e 20 mM de cada um dos seguintes reagentes: D-glicose, D-manose, D-galactose, L-fucose, D-xilose e N-acetil-D-glucosamina
SEPT5G-SEPT8G	100 mM Tris Base/bicine pH 8,5, 10% (w/v) PEG 8000, 20% (w/v) etilenoglicol e 20 mM de cada um dos seguintes reagentes: formato de sódio, acetato de amônio, citrato trisódico, potássio sódico L-tartrato e oxamato de sódio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 - Tabela cristalográfica dos heterodímeros SEPT2G-SEPT11G e SEPT2G-SEPT8G. Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.

Proteína	SEPT2G-SEPT8G	SEPT2G-SEPT11G
Código PDB	6UPR	6UPQ
Fonte de raios-X	Diamond I04	Diamond I24
Detetor	Eiger2 X 16M	Pilatus3 6M
Parâmetros da cela (Å) a; b; c α ; β ; γ	52.74, 82.80, 78.17 90.00, 103.63, 90.00	56.66, 81.86, 68.22 90.00, 97.14, 90.00
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$
Resolução (Å)	82.80 – 2.30 (2.36 – 2.30)	86.86 – 1.86 (1.91 – 1.86)
λ (Å)	0.97950	0.96863
Multiplicidade	6.9 (7.1)	5.7 (6.8)
R_{pim} (%)	5.5 (68.0)	8 (129.2)
CC (1/2)	0.992 (0.782)	0.973 (0.453)
Completeza (%)	99.2 (99.5)	99.6 (98.9)
Reflexões	119518 (14951)	347126 (25676)
Reflexões únicas	28853 (2108)	51728 (3798)
I/σ	8.0 (1.0)	5.8 (0.9)
Reflexões usadas no refinamento	28678	51621
R (%)	20.88	18.8
R_{free} (%)	25.55	21.8

(continua)

(continuação)

Tabela 11 - Tabela cristalográfica dos heterodímeros SEPT2G-SEPT11G e SEPT2G-SEPT8G.
Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.

N° de átomos na proteína	4317	4148
N° de átomos do ligante	61	61
B ($\text{\AA}^2$)	32.93	37.03
Coordinate error $\text{\AA}$ (basado no ML)	0.39	0.27
Phase error ($^\circ$)	33.88	24.59
Ramachandran Plot		
Favorecidos	95.10	96.87
Aceitos	4.71	2.74
Não aceitos	0.19	0.39
Clashcore dos átomos	4.51	2.87
RMSD da geometria ideal		
r.m.s. comprimento de ligações ($\text{\AA}$)	0.003	0.003
r.m.s ângulo de ligações ($^\circ$)	0.591s	0.687

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros de qualidade das estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB) são mostrados na figura 25. Os gráficos mostram, como pontuação de percentil, a qualidade das nossas estruturas em comparação com todas as estruturas depositadas na base de dados resolvidas por difração de raios X (barra vertical preta) e estruturas com resolução similar resolvidas também por difração de raios X (barra vertical sem preenchimento). Assim, quando as barras estiverem mais à direita no gráfico (região em azul), nossas estruturas estariam no grupo de estruturas com as melhores qualidades em termos de *Rfree*, choque estérico (*clashscore*), aminoácidos fora das regiões permitidas no Ramachandran plot (*Ramachandran outliers*), aminoácidos com orientação das cadeias laterais pouco comuns ou não permitidas (*sidechain outliers*) e a pontuação do valor R no espaço real que é uma medida da qualidade do ajuste entre os aminoácidos e os dados no espaço real (*RSRZ outliers*). Nossas estruturas, em média, apresentam os valores esperados para estruturas de boa qualidade comparadas tanto com o total de estruturas depositadas quanto com estruturas de resolução (em $\text{\AA}$) similar.

Figura 25 - Gráficos de qualidade das estruturas cristalográficas das SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G. Ambas estruturas ao ser comparadas com todas as estruturas depositadas no PDB (barra vertical em preto) e estruturas de resolução similar (barra vertical sem preenchimento), mostram valores esperados para estruturas de boa qualidade em termos de *Rfree*, *clashcore*, *ramachandran outliers*, *sidechain outliers* e *RSRZ outliers*; uma vez que ficam mais próximo a região azul.

Fonte: Adaptada de PROTEIN DATA BANK ⁹⁵

4.1.2.1 Descrição das estruturas do domínio GTPase da SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G

A SEPT2G já foi descrita formando uma interface G homodimérica quando complexada tanto com um análogo não hidrolisado de GTP (GppNHp) quanto com GDP. Também foi vista formando uma interface G heterodimérica com SEPT6 na estrutura do heterotrímero SEPT2-SEPT6-SEPT7.^{44,54} Nossas estruturas providenciam mais uma vez informações da SEPT2, mas com maior qualidade e completeza. Além disso, reportamos pela primeira vez informações estruturais do domínio GTPase das septinas SEPT8 e SEPT11 (figura 26). O enovelamento de cada monômero dos heterodímeros é igual ao já descrito para septinas.⁴² Tanto SEPT8G como SEPT11G apresentam o núcleo de seis folhas β ao redor de hélices α , além do *Septin Unique Element* (SUE), gerando o sanduíche $\alpha\beta\alpha$ que caracteriza o enovelamento de septinas (figura 26A).

A unidade assimétrica mostra para ambos os heterocomplexos um dímero, o qual é formado pela interface G. A presença do heterodímero pela interface G seria esperada se a “regra de Kinoshita” fossem validas. Numa recente publicação, apoiada na estrutura cristalográfica do heterocomplexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, foi corrigida a ordem correta de cada septina no filamento⁵⁷ (figura 15 e 16). A SEPT2 forma uma interface G fisiológica com

SEPT6, portanto, as interfaces G entre SEPT2G-SEPT8/11G são interfaces fisiológicas uma vez que elas pertencem ao mesmo grupo da SEPT6 (reforçando a regra de Kinoshita a nível molecular).

Figura 26 - Estrutura cristalográfica do domínio GTPase dos heterodímeros SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G. Se observa, em A, o clássico enovelamento sanduiche $\alpha\beta\alpha$ de septinas em SEPT8G e SEPT11G, com 6 fitas β (amarelos) ao redor de hélices α (vermelho). As estruturas em alta resolução permitiu construir a região do SUE (roxo) em sua totalidade para ambas as septinas (informações estruturais reportadas pela primeira vez para SEPT8 e SEPT11). Além disso, a unidade assimétrica (em B) mostra um heterodímero formado pela interface G, mostrando a viabilidade da substituição entre septinas do mesmo grupo (SEPT8 e SEPT11).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao comparar nossas estruturas com o heterodímero SEPT2-SEPT6 do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 (2QAG), observamos uma maior área de contato na interface G tanto para SEPT2G-SEPT8G como em SEPT2G-SEPT11G; o mesmo ocorre ao comparar com o homodímero da SEPT2 (2QNR) (figura 27 A, B e C). Na estrutura 2QAG, o *switch I* e *switch II* da SEPT2 estão totalmente desordenados (razão pela qual não são visíveis na estrutura). Na SEPT6 apenas o *switch II* está ordenado, mas com a ausência de dois aminoácidos. Na estrutura 2QNR, apenas uma subunidade do homodímero apresenta o *switch II* ordenado com ausência de dois aminoácidos (o *switch I* em ambas as subunidades está desordenado). Nas

estruturas da SEPT2G e SEPT8/11G, ambos os *switches* e o motivo *P-loop* estão ordenados e completos (figura 27 D e E).

Figura 27 - Comparação entre os heterodímeros SEPT2G-SEPT8G/11G com o heterodímero SEPT2-SEPT6 (2QAG) e o homodímero SEPT2G (2QNR). Em A, B e C uma sobreposição entre as estruturas determinadas em este trabalho e as estruturas 2QAG e 2QNR, destacando as diferenças na interface G (círculo preto). Nossas estruturas apresentam os motivos *P-loop* (amarelo), *switch I* (laranja) e *switch II* (rosa) totalmente ordenados nas 4 septinas resolvidas (regiões desordenadas nas estruturas 2QAG e 2QNR) (D e E).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Se bem a presença completa e ordenada dos *switches* nas estruturas cristalográficas pode ser um reflexo direto da alta resolução dos dados, é plausível considerar a influência do parceiro correto (um contato fisiológico) para ordenar os *switches*. Ao comparar o *switch I* de SEPT2G e SEPT8/11G (figura 28), podemos observar a presença de uma pequena hélice α na

SEPT2G e um *switch I* mais curto em SEPT8/11G (devido a uma deleção de 5 aminoácidos característica do grupo II, ver o alinhamento da figura 32). Embora estas diferenças, as conformações dos motivos *P-loop* e *switch II* são muito conservadas ao comparar a SEPT2G com SEPT8/11G (figura 27D e E). Comparando os três motivos entre a SEPT8G e SEPT11G, observamos um R.M.S.D de 0.4 Å nos seus carbonos α ($C\alpha$), o que mostra um alto grau de conservação na conformação tridimensional dos motivos. Isto sugere uma complementariedade conservada na interface G entre septinas do grupo II (SEPT6) e septinas do grupo III (SEPT2), concordando mais uma vez com a regra de Kinoshita.

Figura 28 - Comparação do *switch I* entre SEPT2G e SEPT8/11G. A sobreposição entre as estruturas da SEPT2G (vermelho), SEPT8G (azul claro) e SEPT11G (azul) mostra a diferença entre o *switch I* destas proteínas. Uma vez que o grupo II (ou da SEPT6) apresenta uma deleção de 5 aminoácidos, o *switch I* da SEPT8G e SEPT11G resulta ser mais curto ao comparar com SEPT2G, o qual apresenta uma pequena hélice α .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A presença e coordenação dos nucleotídeos no domínio GTPase foi amplamente descrito em diferentes estruturas de septinas.^{44,63–65} Para o heterocomplexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 (2QAG), foi identificada a presença de GDP e GTP ligado na SEPT2 e SEPT6, respectivamente. Embora a presença dos nucleotídeos, a baixa resolução da estrutura não permitiu identificar em detalhe as interações que mantêm os nucleotídeos ligados. Isto foi solucionado ao descrever as estruturas em alta resolução de septinas individuais como SEPT10Sm (4KV9), SEPT3 (4Z54), SEPT9 (5CYO) e SEPT7 (6N0B).

Na estrutura dos heterodímeros, foram identificados GDP em SEPT2G e GTP em SEPT8/11G (além de Mg^{+2}) (figura 29). Isto é coerente com os resultados dos experimentos de conteúdo de nucleotídeo e confirma a ligação específica de GDP com SEPT2 e GTP em septinas do grupo II (como em SEPT2-SEPT6 2QAG). Ao comparar com a estrutura 2QAG,

agora temos uma visão completa dos aminoácidos que interagem com ambos os nucleotídeos (junto com o Mg^{+2} e moléculas de água). Por outro lado, só a presença da Arg66 em SEPT2G destaca como um aminoácido diferente em relação aos já reportados nas outras estruturas. Esta arginina faz parte de um conjunto de aminoácidos nomeados como “aminoácidos característicos” para cada grupo de septinas (descritos mais adiante).

Figura 29 - Sítio ativo da SEPT2G e SEPT8G em coordenação com o GDP e GTP, respectivamente. Podemos observar a coordenação dos aminoácidos da SEPT2G (vermelho) e SEPT8G (azul) com os nucleotídeos, moléculas de água (esferas vermelhas) e o Mg^{+2} (esfera verde). Na SEPT2G, a His 159 e Glu192 (azul) pertencem a outra subunidade do heterodímero (SEPT8G). Da mesma forma, na SEPT8G a His158 e Glu191 (vermelho) pertencem a SEPT2G da outra subunidade do heterodímero.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.2 Interações via resíduos característicos explicam a especificidade de interação entre septinas dos grupos II e III

4.1.2.2.1 Identificando as regiões de contato da interface G

Identificar todas as regiões de contato na interface G dos heterodímeros é fundamental para encontrar não só as interações que mantêm a estabilidade da interface G, se não também, interações relacionadas com a especificidade entre os grupos II (SEPT6) e III (SEPT2). Para realizar uma análise mais objetiva, utilizamos o programa DIMPLOT dentro

do pacote LigPlot⁺⁸¹, para identificar as interações entre as duas subunidades dos heterodímeros SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G. Isto também foi realizado para a estrutura cristalográfica da SEPT2G-SEPT6G (2.5 Å – 6UPA) cedida gentilmente pelo aluno de mestrado Higor Vinícius Dias Rosa.

Uma vez identificadas as regiões de contato, as estruturas foram separadas por 30 Å e rotacionadas em -90° ao redor do eixo Y para a cadeia A (SEPT2G - vermelho) e 90° ao redor do eixo Y para a cadeia B (SEPT6/8/11G - azul), visualizando as estruturas como um livro aberto (figura 30). A figura deixa claro uma alta conservação de aminoácidos envolvidos na interface G dos três heterodímeros, justificando porque diferentes membros do grupo II são capazes de substituir-se ao interagir com SEPT2G, providenciando pela primeira vez as bases estruturais da “Regra de Kinoshita”. As poucas diferenças entre os três heterodímeros são: a orientação da cadeia lateral em alguns aminoácidos da superfície e interações que aparecem e/ou desaparecem na SEPT2G (roxo e rosa) e SEPT6/8/11G (azul claro). Além disso temos algumas substituições que chamam atenção como a da Pro70 em SEPT11G (Pro71 em SEPT6G) pela Glu73 em SEPT8G, o que gera uma nova ponte salina entre a Glu73 e Arg198 da SEPT2G.

Seguindo a nomenclatura sugerida na literatura⁴³, identificamos sete regiões de contato na interface G dos heterodímeros: o *P-loop*, *switch I*, *switch II*, *G4*, *trans-loop 1*, *trans-loop 2* e *β-meander*. O contato mais relevante é o observado entre o *switch I* de cada subunidade com o *trans-loop 1* da subunidade oposta. Esta interação chama mais atenção pelo motivo do *switch I* estar desordenado na estrutura 2QAG e nos homodímeros de SEPT2 (2QNR e 2QA5). O *switch I* em todas as subunidades dos nossos heterodímeros está completo e ordenado, contribuindo significativamente para a área da superfície de contato na interface G: o *switch I* da SEPT2G forma 10,6% em média da superfície de contato, enquanto, a SEPT6/8/11G formam 7,2% em média, gerando no total 17,8 % equivalente a 350 Å de área da superfície da formação do dímero pela interface G. Este contato recrutado nesta região provavelmente está relacionado com a especificidade da interface G entre septinas dos grupos II e III. Os *switches* em pequenas GTPases (como proteínas Ras), funcionam comumente como sinalizadores do sistema de chaveamento dos estados “on” e “off”⁹⁶ mas em septinas o seu papel ainda não está bem definido. Nossos resultados sugerem que em septinas, parecem ter sido reaproveitados para fazer parte da interface G (pelo menos no caso da interação entre os grupos II e III).

Figura 30 - Vista em superfície das interfaces G entre SEPT2G e septinas do grupo II. Os dímeros foram separados e rotacionados para permitir sua visualização como um livro aberto. Os aminoácidos que fazem parte da interface de contato estão coloridos de vermelho para a SETP2G e azul para as SEPT6/8/11G. Uma comparação entre os aminoácidos nos heterodímeros permitiu identificar aminoácidos que aparecem pela primeira vez na interface de contato (roxo), os que deixaram de interagir (rosa e azul claro) e os sofreram substituição (azul violeta), isto comparando em base a interface SEPT2G-SEPT11G. Foram definidas também as regiões de contato na SEPT2G-SEPT11G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 - Vista em superfície da interface G do heterodímero SEPT7G-SEPT3_{T282Y} e o homodímero SEPT7G. Os dímeros foram separados e rotacionados para permitir sua visualização como um livro aberto. Os aminoácidos que fazem parte da interface de contato estão coloridos de amarelo para a SEPT7G e verde para as SEPT3_{T282Y}. Após uma comparação dos aminoácidos que fazem parte da interface G em ambas as estruturas, identificamos a Glu58 no homodímero da SEPT7G como um novo aminoácido na interação. As regiões que fazem parte dos contatos estão descritas na estrutura da SEPT7G-SEPT3_{T282Y}. Código PDB das estruturas utilizadas: SEPT7G (6N0B) e SEPT7G-SEPT3_{T282Y} (6UQQ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparamos a interface G entre septinas do grupo II e III, com outras interfaces G fisiológicas como das SEPT7G (6N0B) e SEPT7G-SEPT3_{T282Y} (6UQQ) cedida gentilmente pelo aluno Gabriel Brognara (figura 31). Em ambas as estruturas observamos as mesmas regiões de contato identificadas para SEPT2G-SEPT6/8/11G. Porém, a presença dos *switches I* em ambas subunidades (em ambas as estruturas) estão comprometidos comparando com SEPT2G-SEPT6/8/11G. No heterodímero SEPT7G-SEPT3_{T282Y} podemos observar a ausência do *switch I* da SEPT3_{T282Y} como uma região que contribui para a interação da interface G e a SEPT7G contribuindo só com 2 aminoácidos do seu *switch I*. Isto equivale ao 3% da área da superfície de contato na interface G, comparada com os quase 18% da SEPT2G-

SEPT6/8/11G. No homodímero da SEPT7G observamos um fenômeno similar, onde uma das subunidades não contribui para a interação via interface G e a outra só com 2 aminoácidos. A diferença é que a subunidade que não contribui para o contato apresenta um *switch I* desordenado na estrutura. Com tudo, os *switches I* no homodímero da SEPT7 contribuem com apenas 2.9% da área da superfície de contato na interface G.

Estas observações deixam claro que embora a presença do seu parceiro correto nas interfaces G fisiológicas da SEPT7G e SEPT7G-SEPT3_{T282Y}, o papel do *switch I* na especificidade de interação de septinas poderia estar favorecido para a interface G formado por septinas dos grupos II e III.

Outra região interessante é a do *switch II*, que é a única que está interagindo com ela mesma nas duas subunidades, ou seja, o *switch II* da SEPT2G interage com o *switch II* da SEPT6/8/11G. A interação entre os dois *switches* será detalhada mais na frente.

4.1.2.2.2 Selecionando os resíduos característicos dos quatro grupos de septinas

Realizamos a busca por aminoácidos característicos dos diferentes grupos de septinas. Os aminoácidos característicos foram identificados após um alinhamento de sequências entre o domínio G das treze septinas humanas (figura 32). O objetivo de um alinhamento múltiplo é identificar regiões ou sequências conservadas para todas as proteínas alinhadas. Na nossa abordagem, por outro lado, buscamos por aminoácidos conservados especificamente em cada grupo de septinas (presentes em um, mas ausentes nos outros) com o intuito de identificar potenciais candidatos que participem em interações específicas e únicas para os diferentes grupos. Para o grupo III identificamos 15 aminoácidos característicos (vermelho) enquanto para o grupo II foram 25 aminoácidos (azuis, figura 32). Este conjunto de resíduos para cada grupo pode ser considerado um tipo de “impressão digital”. Inicialmente a definição usada para identificar resíduos característicos foi estritamente por aminoácidos totalmente conservados num determinado grupo e nunca observado em nenhuma sequência de outro grupo. Ao decorrer das análises nas estruturas cristalográficas, começamos a flexibilizar esta definição. Isto foi feito devido à grande similaridade de sequência entre o grupo III (da SEPT2) e IV (da SEPT7). Esta abordagem menos restrita permitiu identificar resíduos característicos no grupo III que não foram identificados inicialmente devido a sua presença única em SEPT7 (como no caso da Gly159, descrito depois).

Figura 32 - Alinhamento do domínio G entre as 13 septinas humanas. No alinhamento as septinas estão divididas em subgrupos, com seus representantes como a primeira septina do grupo. Os elementos de estrutura secundária são mostrados baseado na estrutura da SEPT2 em complexo com SEPT6 (hélices α em cilindros e fitas β em setas). Os motivos característicos de septinas estão em negrita acima da sequência de aminoácidos (*p-loop*, *switch I* etc.). Finalmente os aminoácidos característicos para cada grupo de septinas estão coloridos de vermelho para o grupo da SEPT2, azul para o grupo da SEPT6, amarelo para SEPT7 e verde para o grupo da SEPT9. Os aminoácidos característicos são definidos como conservados em todas as septinas de um grupo, mas ausentes nos outros, como por exemplo a Ala71 no grupo III. Os aminoácidos em negrita e com numeração são os principalmente mencionados durante o texto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A título de exemplo, nossa abordagem identificou a Thr282 como um aminoácido característico no grupo da SEPT3. Na mesma posição, nas outras septinas, existe uma tirosina conservada. No trabalho de Macedo *et al*⁶³, os autores identificam esta treonina como o aminoácido responsável para a SEPT3 se comportar como um monômero em solução e sem nucleotídeo endógeno ligado. Após uma mutação pela tirosina, a SETP3 forma homodímeros em solução indicando a importância da tirosina na dimerização de septinas e da treonina como um resíduo característico do grupo da SEPT9.⁶³ Com a mesma premissa, Castro *et al*⁶⁵ mostram a importância de um conjunto de resíduos característicos no grupo I e sua relação com a estabilização e características peculiares da interface NC homodimérica formada por membros deste grupo.⁶⁵ Estes resultados mostram a utilidade desta abordagem e o potencial para resíduos característicos serem determinantes da formação de interfaces específicas e, portanto, como importantes determinantes do fenômeno de polimerização das septinas.

Neste sentido, mapeamos os aminoácidos característicos do grupo III (vermelho) e II (azul) no heterodímero SEPT2G-SEPT11G (heterodímero com mais alta resolução), com o intuito de identificar interações específicas na interface G envolvendo estes aminoácidos (figura 33).

Figura 33 - Mapeamento dos aminoácidos característicos dos grupos II e III. Os aminoácidos característicos estão representados em esferas na estrutura da SETP2G-SEPT11G representada em cartum. Em vermelho os aminoácidos característicos da SEPT2G e em azul da SEPT11G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.2.3 Resíduos característicos envolvidos em interações específicas do *switch I*

A identificação dos resíduos característicos junto com a observação da importância do *switch I* na interface foi usado para investigar a base estrutural da preferência pela formação de uma interface G entre SEPT2G e o grupo II. Após o mapeamento dos aminoácidos característicos na estrutura, notamos que a maioria deles estão nas superfícies laterais de ambas as septinas. No entanto, na interface G se observa uma proximidade entre aminoácidos característicos da SEPT2G e SEPT11G (figura 33). Ao analisar em detalhe esta região, observamos uma rede de interações envolvendo tanto aminoácidos característicos dos grupos II e III, como o próprio GTP ligado na SEPT11G (figura 34A).

Explicando da direita para esquerda, temos que a interação entre a hidroxila da Thr50 da SEPT11G e o fosfato γ do GTP (via uma molécula de água) orienta o grupo metilo dela para interagir com a His73 também da SEPT11G. Isto por consequência, orienta o anel imidazol da His73 para aceitar uma ligação de hidrogênio via N ϵ 2 da cadeia principal da His158 da SEPT2G e encaixa no *trans-loop 1* (figura 34A). Vale notar que tanto Thr50 quanto His73 são resíduos característicos do grupo II, do qual SEPT11 faz parte. Embora a His73 não interaja diretamente com um aminoácido característico da SEPT2G, ela está interagindo com o *trans-loop 1* da SEPT2G que inclui dois aminoácidos característicos: a Phe156 e a Gly159. Dessa forma, estamos observando um “*hot spot*” de interação entre o *switch I* do grupo II (His73) com o *trans-loop 1* do grupo III (Phe156 e Gly159) através de aminoácidos característicos. A importância da Phe156 e Gly159 destaca quando comparamos a conformação do *trans-loop 1* da SEPT2G com o dos outros grupos de septinas (figura 34B). A conformação no caso da SEPT2G permite a cadeia lateral da His73 se encaixar perfeitamente (figura 34). A diferente conformação do *trans-loop 1* na SEPT2G parece ser uma característica intrínseca dela, pois resulta bastante similar à adotada no homodímero da SEPT2 ligada a GDP (figura 34B). Embora similar, devemos considerar que a orientação na SEPT2 homodimérica é uma conformação preliminar que atinge seu estado final frente a seu parceiro correto, ou seja, na presença da His73. O efeito do parceiro correto é também visto na correta conformação do *switch I* no grupo II que está desordenada na melhor estrutura disponível para este grupo, a SEPT10 de *Schistosoma mansoni*. Devemos destacar também a presença do GTP na rede de interações (figura 34A), sugerindo a importância de um grupo de septinas cataliticamente inativo (grupo II). O fosfato γ do GTP, junto com o Asp106 conservado em todas as septinas, orientam corretamente a Thr50 para interagir com a His73. Nos outros grupos de septinas a posição da Thr50 é substituída por uma serina, incapaz de

formar a interação hidrofóbica com a His73. Além disso, a orientação da serina nas outras estruturas em alta resolução das septinas SEPT3, SEPT7 e na própria SEPT2 (do complexo com SEPT11G) é muito variável. Isto é pela ausência do fosfato γ nas septinas dos outros grupos, que seguraria a orientação da serina via interação com seu grupo hidroxila. Em contraste, a Thr50 apresenta uma única orientação nas três estruturas dos heterodímeros (SEPT6G, SEPT8G e SEPT11G). Portanto, o fosfato γ deveria ser considerado como um “aminoácido” característico do grupo II, pois é responsável de manter a correta orientação do *switch I* da SEPT11 para interagir com o *trans-loop 1* da SEPT2 garantindo a correta formação do heterodímero. Em suma, demonstramos que a presença dos aminoácidos característicos converge para a correta organização estrutural do *switch I* e do *trans-loop 1* dos grupos II e III, respectivamente, sentando as bases moleculares da interação específica entre septinas do grupo II e III. Como efeito “co-lateral”, explicamos a razão do grupo II ter perdido a sua atividade catalítica. É necessário que sejam inativas para manter a presença do fosfato γ e daí sustentar o “*hot spot*” de interações que garante o correto pareamento na interface G entre septinas dos grupos II e III.

Figura 34 - Interação específica entre o *trans-loop 1* da SEPT2G com o *switch I* da SEPT11G. Em (A) observamos a rede de interação entre SEPT2G e SEPT11G envolvendo aminoácidos característicos. A Thr50 característica do grupo II interage com a His73 também característica do grupo, após orientação da sua cadeia lateral produto da interação com o fosfato γ do GTP via uma molécula de água. Isto permite a interação da His73 com o *trans-loop 1* da SEPT2, o qual apresenta dois aminoácidos característicos (a Phe156 e Gly159). Em (B) podemos observar que na presença do parceiro correto, o *trans-loop 1* da SEPT2G adota uma conformação que permite encaixar corretamente a His73. Os aminoácidos em azul e vermelho representam aminoácidos característicos para os grupos II e III, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Indo para o outro lado a interface G onde observamos o *switch I* da SEPT2G, temos um aminoácido característico, a Ala71, que encaixa numa cavidade formada pela SEPT11G (figura 35). A Ala71 encaixa na cavidade formada pelos aminoácidos Leu161, Ser163, Leu166 e Glu203 da SEPT11G e seus homólogos na SEPT6G e SEPT8G (ou seja, esta interação é vista nos três heterodímeros). A presença de aminoácidos com cadeia lateral alongada na mesma posição no grupo I, com uma prolina na SEPT7 e a ausência dela no grupo II (pela deleção de 5 aminoácidos no *switch I*, figura 32) sugere uma interação possível unicamente para o grupo III.

O grupo metilo da Ala71 que encaixa na cavidade, interage via contato de Van der Waals com a Ser163 da SEPT11G. Esta serina inicialmente não foi considerada como um aminoácido característico pela presença de uma treonina na SEPT10 (nas outras septinas é uma prolina conservada). Ao analisar esta serina, notamos que seu grupo hidroxila forma uma ligação de hidrogênio com a cadeia principal da Asp107 na SEPT2G, interação que poderia ser feita pela treonina da SEPT10, mas incapaz para a prolina das outras septinas. Portanto, a Ser163 pode ser considerada um resíduo característico. A cadeia lateral da Ser163 na estrutura homodimérica da SEPT10 de *Schistoma mansoni*, a única disponível do grupo para analisar as interações na ausência do parceiro correto, está orientada para fora da interface G. Portanto, a presença do parceiro correto orienta tanto o *switch I* da SEPT2G, para Ala71 interagir com a cavidade de SEPT11G, como a cadeia lateral da Ser163 para formar a ligação de hidrogênio com Asp107. Outra interação que contribui na correta orientação do *switch I* da SEPT2G é a ligação de hidrogênio formada pela cadeia principal da Ala71 com a cadeia lateral da Glu203 da SETP11G. Em conclusão, o *switch I* do grupo III utiliza um aminoácido característico (Ala71) para interagir com a região do *trans-loop I* do grupo II que apresenta também um aminoácido característico que contribui na interação (Ser163). Novamente este conjunto de resíduos gera um “*hot spot*” que só existe no caso da união entre septinas dos grupos II e III. Nenhuma outra combinação seria capaz de formar tais interações, novamente justificando a preferência da formação da interface G no caso destes dois grupos.

Finalmente, a figura 36 resume a importância do parceiro correto na orientação do *switch I* das septinas do grupo II e III. Usando como modelo a SEPT2G-SEPT11G, após a sobreposição com as estruturas homodiméricas da SEPT2, SEPT3, SEPT7 e SmSEPT10 observamos que os *switches I* da SEPT2G e SEPT11G (amarelo) estão completos e ordenados em comparação com os *switches I* das estruturas homodiméricas (preto). Além disso podemos observar a proximidade do *switch I* no heterodímero SEPT2G-SEPT11G, condição que não é

observada nas outras estruturas, sugerindo o papel do parceiro correto na conformação fisiológica do *switch I*. Isto deixa mais claro ainda a especificidade a nível molecular que existe na interface G das septinas dos grupos II e III.

Figura 35 - O *switch I* da SEPT2G interagindo com SEPT11G. O metilo do aminoácido característico Ala71 da SEPT2G encaixa na cavidade formada pelos aminoácidos Leu161, Ser163, Leu166 e Glu 203 da SEPT11G. Do outro lado, a Ser163 da SEPT11, um aminoácido considerado característico forma uma ligação de hidrogênio com Asp107 da SEPT2. A presença destes aminoácidos característicos cria outra “rede” de interação específica para septinas do grupo II e III.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Switch I em SEPT2-SEPT11

Switch I nos outros grupos

Figura 36 - Sobreposição da interface G entre heterodímeros de septinas. A SEPT2G-SEPT11G (vermelha e azul) foi sobreposta com as estruturas das septinas SEPT2, SEPT3, SEPT7 e SEPT10 de *S. mansoni*. Podemos observar que o *switch I* das septinas SEPT2G e SEPT11G estão ordenados (amarelo) e realizando um maior contato comparado com o *switch I* das outras septinas homodiméricas (preto), demonstrando a influência do parceiro correto na correta orientação dos *switches*. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.2.4 O *switch II* também contribui para a especificidade de interação da interface G entre septinas dos grupos II e III

Como mencionamos previamente, os *switches II* de ambas as subunidades nos heterodímeros estão interagindo uns com os outros (figura 30). Nos três heterodímeros, os *switches* formam na interface G uma ponte β característica em folhas- β antiparalelas, como descrito em Brognara *et al* (2019).⁹⁷ Neste trabalho, os autores sugerem que esta interação é uma característica da interface G fisiológica entre septinas uma vez que não aparece nas interfaces G promiscuas da SETP2 e SmSEPT10. Em um filamento formado por hexâmeros como unidade básica de polimerização, a SEPT7 interage com ela mesma formando uma interface G homotípica e fisiológica no centro da partícula (figura 15); é nesta estrutura em alta resolução (6N0B) que os autores mostram a formação da ponte β . Outra característica observada em algumas interfaces G promiscuas (SEPT2 e SmSEPT10) é o deslizamento da fita 3 que desordena o *switch II*.^{42,64} Nesse sentido, é evidente que a formação da ponte β é única para interfaces G fisiológicas (ou seja, frente ao parceiro correto).

Na figura 37 observamos que o *switch II* está estabilizado por voltas β do tipo II formadas ao longo dele. Estas voltas se caracterizam por incluir Gly, Asp ou Asn nas posições $i+2$.⁹⁸ O homodímero de SEPT7 mostra que a ponte- β é formada pelas cadeias principais da Asp121 e Asn123 (figura 37A). A Asn123 também faz ligações de hidrogênio com a cadeia principal da Ala120, ajudando na estabilidade da ponte β em SEPT7. Embora a ponte- β esteja presente (como previsto por Brognara *et al.* para uma interface fisiológica), no caso dos heterodímeros formados por septinas do grupo II e III o resultado é um pouco diferente, uma vez que na mesma posição da Asn123, na SEPT2G temos uma Cys111 e no grupo II uma Lys111 característica (figura 37B). Isto pode levar a duas opções: instabilidade da ponte β ou uma forma alternativa de estabilização dela.

A presença completa e ordenada do *switch II* em ambas as subunidades dos heterodímeros, sugere uma alternativa para a estabilização da ponte β . A Lys111 apresenta uma densidade eletrônica clara nos três heterodímeros, estando enterrada na estrutura e apontando para o *switch II* da SEPT2G. Por outro lado, a Cys111 da SEPT2G apresenta ocupação parcial no heterodímero SEPT2G-SEPT8G mostrando a formação de uma ponte dissulfeto com a Cys114 dela (figura 37C). Uma vez que a Lys111 pertence aos aminoácidos característicos, poderia estar relacionada com a forma alternativa de estabilidade. Embora a Cys111 em SEPT2G não é característica, é importante mencionar que a SEPT1 apresenta a

mesma cisteína (dividindo em dois o grupo III, sendo que os demais têm Asn como nos demais grupos) podendo participar nesta forma alternativa de estabilização.

Figura 37 - O *switch II* na interface G fisiológica. Em (A) o *switch II* da SEPT7 com interface G fisiológica. Em (B) o *switch II* da interface G entre SEPT2G (vermelho) e SEPT11G (azul). Em ambas as estruturas, o parceiro correto permite o ordenamento do *switch II* formando uma ponte β entre os *switches* de ambas subunidades. O *switch* está estabilizado por volta β do tipo II e em SEPT7 pela interação da Asn123 com a cadeia principal da Ala120. Esta Asn123 é substituída por uma Cys111 em SEPT2G e uma Lys111 característica do grupo II em SEPT11G. Estes aminoácidos apresentam uma proximidade que sugere uma interação entre eles. A Cys111 no heterodímero SEPT2G-SEPT8G apresenta dupla conformação formando uma ponte bissulfeto com Cys114 da própria SEPT2G (em C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos últimos anos tem sido reportada uma nova interação covalente entre os aminoácidos Lys e Cys, via um grupo metilo ou uma molécula de água, em algumas estruturas cristalográficas.^{99–101} Embora ainda em discussão a natureza química da ligação¹⁰¹, decidimos tentar reproduzir os experimentos de formação da ligação entre Lys e Cys em solução, porque em nossos heterodímeros a proximidade entre a Lys111 e Cys111 sugere a possível formação da ligação entre elas (figura 38). Embora a densidade eletrônica e a distância entre a Lys111 e Cys111 não mostre uma interação direta entre os aminoácidos, os 3,9 Å de separação e a flexibilidade de orientação para aminoácidos de lisina sugerem a possível interação entre eles em um ambiente favorável para a formação da ponte Lys-Cys.

Figura 38 - Mapa 2Fo-Fc mostrando a Lys111 em SEPT11G (azul claro) e Cys111 em SEPT2G (vermelho). A proximidade entre os aminoácidos (3,9 Å) sugere que em um ambiente favorável a formação da ponte Lys-Cys poderia ser viável.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os experimentos em solução, seguimos o protocolo descrito em Ruszkowski & Dauter.⁹⁹ Uma vez que o uso do β -mercaptoetanol no tampão de amostra (junto com o aquecimento dela) é para eliminar as ligações covalentes formadas por cisteínas na proteína, utilizamos um tampão de amostra sem β -mercaptoetanol para identificar a possível ligação Lys-Cys. Deste modo, realizamos a eletroforese SDS-PAGE com o tampão de amostra com β -mercaptoetanol como controle e sem β -mercaptoetanol. Após diferentes tempos de incubação de alíquotas do heterodímero SETP2G-SETP11G a 1 mg/mL em vapores de formaldeído (que estimula a formação da ponte metileno via cross-linking dos grupo amina e tiol¹⁰²), observamos no gel o dobro da massa molecular em relação aos monômeros sugerindo a formação de um dímero covalentemente ligado (figura 39). Apesar da presença de uma banda fraca no gel, quando comparamos nossos resultados com os reportados na literatura⁹⁹ observamos a mesma característica de “enfraquecimento” da intensidade da banda no gel após a incubação com formaldeído em relação ao tempo 0.

Com a possibilidade de formar a ponte Cys-Lys em solução, cristais da SETP2-SETP11 foram submetidos a vapores de formaldeído com o intuito de induzir a formação da ligação nas proteínas dentro do cristal. Diversos conjuntos de dados foram coletados procedentes de cristais submetidos a vapores de formaldeído em diferentes tempos, como descrito em Ruszkowski & Dauter.⁹⁹ Depois de análises exaustivos de densidade eletrônica no switch II, não foi possível identificar uma ligação covalente entre a Cys-Lys. Se bem continua uma proximidade entre ambos os aminoácidos (Lys-SETP11G e Cys-SETP2G), é necessário estudos mais a fundo nesta região para esclarecer a importância da presença da Lys e Cys em relação ao *switch II* e a ponte β , e se fisiologicamente seria possível (e relevante) a formação da ligação covalente entre subunidades de septinas dentro de um filamento.

Figura 39 - Gel SDS-PAGE 12% para a identificação da formação da ligação covalente entre SEPT2G-SEPT11G. Nas amostras incubadas com vapores de formaldeído (após 24 h) é possível observar uma banda com 66 kDa, o esperado para um dímero de septinas. Nas amostras incubadas, mas submetidas a loading buffer com beta-mercaptoetanol, não foram observadas a formação de dímeros no gel.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2.2.5 Relação da termoestabilidade e estruturas cristalográficas

Mencionamos que a termoestabilidade de uma proteína pode estar influenciada por diferentes fatores como hidrofobicidade, empacotamento entre complexos, número de cavidades, área da superfície de contato em complexos, entre outros.⁹⁴ Uma vez que não foi possível obter informações estruturais de todos os heterocomplexos, nossas análises se viram limitadas. Com tudo, observamos que os heterodímeros com maior termoestabilidade (SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G, figura 24D) foram os únicos a ser cristalizados e coletados, permitindo resolver a sua estrutura cristalográfica. Dos outros heterocomplexos só SEPT4G-SEPT8G e SEPT5G-SEPT8G (heterodímeros com os menores valores termoestabilidade, figura 24D) foram cristalizados, mas não foi possível obter dados de difração de qualidade, motivo pelo qual não resolvemos as suas estruturas. Isto pode sugerir um menor ordenamento interno no cristal dos heterodímeros com a menor termoestabilidade.

A presença da Cys111 na SEPT2G pode ser considerado um fator importante para as diferenças na termoestabilidade dos heterodímeros. Com a capacidade de formar uma ponte dissulfeto com a Cys114 da SEPT2G ou a ponte metileno com a Lys111 da SEPT6/8/11G, poderia estar relacionada com uma termoestabilidade alta para os heterodímeros formados por septinas do grupo II (SEPT6) com a SEPT2G. Na SEPT4G e SEPT5G, na mesma posição, observamos uma asparagina como nas outras septinas (ver alinhamento, figura 32), sendo os

heterodímeros SEPT4/5G-SEPT6/8/11G menos termoestáveis comparados com SEPT2G-SEPT8/11G. Se bem as diferenças na termoestabilidade dos heterodímeros pode estar influenciada pela termoestabilidade intrínseca das suas subunidades, tanto estes resultados como as estruturas cristalográficas apoiam fortemente a substituição entre septinas do mesmo grupo.

Os valores da termoestabilidade para os dímeros SEPT7-SEPT7 e SEPT7-SEPT3_{T282Y} resultam interessantes comparando-os com os heterodímeros dos grupos II e III. Os dados cedidos gentilmente pelo aluno Gabriel Brognara, mostram na figura 40 uma termoestabilidade de 58,8°C e 61,6°C para SEPT7-SEPT7 e SEPT7-SEPT3_{T282Y}, respectivamente. A estabilidade térmica destes dímeros resulta menor quando comparamos com os valores dos heterodímeros SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G (figura 24). Uma vez que temos dados estruturais destes quatro complexos, podemos realizar uma comparação em termos de estabilidade térmica e estrutura para os dímeros com as três interfaces G fisiológicas.

Figura 40 - Termoestabilidade dos dímeros SEPT7-SEPT7 e SEPT7-SEPT3. O gráfico mostra os valores de termoestabilidade do homodímero de SEPT7 (58,8°C) e o heterodímero SEPT7-SEPT3_{T282Y} obtidos por Tycho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como mostramos nas figuras 30 e 31, o *switch I* cumpre um papel importante na especificidade e estabilidade da interface G formada entre septinas dos grupos II e III, mas para SEPT7-SEPT7 e SEPT7-SEPT3_{T282Y} contribui minimamente no contato da interface G. Assim, a área da superfície de contato da interface G nos heterodímeros SEPT2G-SEPT8/11G é em média de 2033 Å², para SEPT7-SEPT3_{T282Y} é de 1717 Å² e para SEPT7-SEPT7 é de 1616 Å². Podemos relacionar então, que os complexos formados por septinas com uma maior área da superfície de contato da interface G são mais termoestáveis.

Com base nos estudos dos últimos anos, se sabe que septinas humanas podem formar heterofilamentos a partir de hexâmeros (formados por 3 septinas diferentes) ou octâmeros (com 4 septinas diferentes). Além disso, com a correção das posições de cada septina no heterofilamento, deixando as septinas do grupo III (SEPT2) no extremo do filamento, temos uma interface G entre duas SEPT7 no hexâmero (conectando dois trímeros) ou uma interface NC entre duas SEPT9 (conectando dois tetrâmeros); no octâmero SEPT7 e SEPT9 estariam formando uma interface G (figura 15 e 16). Estes resultados, portanto, sugerem uma maior estabilidade entre os heterodímeros formados por septinas dos grupos II e III no heterofilamento. A presença de uma interface G mais fraca entre homodímeros da SEPT7 ou heterodímeros SEPT7-SEPT3/9/12, permitiria a formação de filamentos a base de hexâmeros e octâmeros.

4.2 Importância de um grupo cataliticamente inativo na montagem correta do heterofilamento

Demonstramos a importância de manter o GTP ligado nas septinas do grupo II (SETP6) para sua correta interação com as septinas do grupo III (SETP2), considerando o fosfato γ do GTP como um elemento característico do grupo II (figura 34). Isto sugere a importância de manter um grupo cataliticamente inativo para a correta montagem do heterofilamento de septinas. Escassos trabalhos abordam a questão da perda de atividade catalítica e seu impacto na polimerização de septinas¹⁰³, chamando ainda mais a atenção pelo fato de ser um evento evolutivo independente em diversos grupos de organismos que apresentam septinas, isto é: as septinas cataliticamente inativas em leveduras (dois septinas sem atividade das quatro que formam o heterofilamento) evoluíram de uma septina com atividade catalítica, o mesmo fenômeno gerou as septinas cataliticamente inativas em mamíferos a partir de um ancestral ativo (uma septina sem atividade catalítica das quatro que formam o heterofilamento).³⁸⁻³⁹

As septinas, assim como muitas outras GTPases, apresentam uma treonina que interage com uma molécula de água que realiza o ataque nucleofílico no fosfato γ do GTP ligado à proteína, resultando na liberação do grupo fosfato e a formação do GDP. Esta treonina conservada (Thr78 na figura 32) está presente no motivo *switch I*. Este motivo, importante para a estabilização e hidrólise do nucleotídeo, apresenta uma deleção de 5 resíduos de aminoácidos e um aminoácido qualquer na posição 78 nas septinas do grupo II; o que está relacionado com a falta de atividade catalítica⁴⁴ (figura 32).

No campo da engenharia de proteínas resulta mais fácil eliminar a atividade de uma proteína que introduzi-la em uma inativa, sendo um grande desafio para esta área. Aceitando este desafio e com o intuito de “devolver” a atividade catalítica para a SEPT6 (representante do grupo II) e estudar seu impacto na interação com SETP2, selecionamos os aminoácidos nas posições 71 a 78 das septinas SEPT2 e SEPT7 para serem inseridos no *switch I* da SETP6, gerando os mutantes: SETP2-SEPT6_{swI_2} e SETP2-SEPT6_{swI_7} e assim reintroduzindo a treonina catalítica (figura 19).

Os mutantes foram co-expressos de forma solúvel e co-purificados sob as mesmas condições que o heterodímero nativo⁸⁶. Foram co-expressos em *E. coli* Rosetta DE3 e subsequentemente purificados por cromatografia de afinidade (IMAC) e exclusão molecular. O heterodímero nativo é purificado com excesso de SEPT6G devido à presença da cauda de histidina nela (figura 41A). Nos mutantes, diferente do nativo, quando visto o perfil de eluição na coluna de filtração em gel, o excesso de proteína monomérica (pico 2, figura 41B) diminui mostrando praticamente só heterodímeros em solução (pico 1, figura 41B). Ao analisar por SDS-PAGE o pico 1 em ambos os casos mostra duas bandas no gel (figura 41 C e D), as que foram confirmadas por espectrometria de massas como SEPT6 (banda 1) e SEPT2 (banda 2) (figura 42).

Figura 41 - Purificação dos mutantes. (A) Cromatograma da purificação por exclusão molecular do heterodímero nativo da SEPT2G-SEPT6G. (B) Cromatograma da purificação por exclusão molecular dos mutantes de SEPT6_{swI_2} (com inserção dos aminoácidos da SEPT2) e SEPT6_{swI_7} (com a inserção dos aminoácidos da SEPT7) em complexo com SEPT2G. O pico 1 é estimado para um dímero de septina e o pico 2 é estimado para um monômero. (C) e (D), os géis a 10% SDS-PAGE do pico 1 para cada mutante mostra duas bandas, o que mostra a presença das duas septinas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 42 - Espectrometria de massas dos heterodímeros mutantes da SEPT2 e SEPT6. Em A e B é mostrado o output da análise usando o *Mascot Research*, identificando a SEPT2 e SEPT6, respectivamente. Em vermelho estão indicados os peptídeos identificados no experimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A possível hidrólise do GTP nos mutantes da SEPT6G levaria a duas opções na interação com SEPT2G, a primeira seria a instabilidade do heterodímero e por consequência a incapacidade de manter a interação com SEPT2G (com monômeros em solução) e a segunda seria manter a formação do heterodímero demonstrando a falta de importância do nucleotídeo ligado (GTP ou GDP) na formação do heterodímero.

O experimento de liberação do nucleotídeo endógeno mostra a presença de GDP (SEPT2G) e GTP (SEPT6G) ligado aos heterodímeros mutantes em proporções equivalentes, revelando ainda a inatividade da SEPT6G (figura 43A). Concluímos que as mutações feitas não resultaram em atividade catalítica, mostrando que não basta colocar a treonina catalítica na posição “correta” (78) para devolver a atividade a uma septina, diferente das septinas catalíticas que ao tirar a Thr78 perdem sua atividade⁴⁴. Evidentemente a situação é mais sutil.

Figura 43 - Caracterização dos mutantes. (A) Liberação de nucleotídeo dos mutantes SETP2G-SEPT6G_{swI_2} e SETP2G-SEPT6G_{swI_7}. Ambos mutantes liberam GTP e GDP em proporções equivalentes. Este resultado mostra que os mutantes não apresentam atividade catalítica embora a Thr50 está presente. (B) O experimento de nanoDSF mostra que o T_i de ambos mutantes é menor que o do heterodímero nativo SETP2G-SEPT6G, indicando que inserção do *switch I* na SEPT6G alterou a estabilidade de interação entre SEPT2G e SEPT6G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Se bem o perfil cromatográfico dos mutantes sugere uma maior estabilidade em solução, os mutantes apresentam uma tendência a agregar mais rápido que o heterodímero nativo. Por isso realizamos medidas de nanoDSF para calcular a termoestabilidade comparando com o heterodímero nativo (figura 43B). Os mutantes são menos termoestáveis (65,7 e 66,5 °C) que o heterodímero nativo (70,7 °C) por 5° aproximadamente. Isto nos leva a questionar por que a inserção dos aminoácidos (e a Thr78) não foi suficiente para conferir atividade na proteína, mas sim para alterar a estabilidade do heterodímero.

A fim de entender estas perguntas, as estruturas cristalográficas da SEPT2G ligada ao análogo de GTP não hidrolisado - GMppNHp (3FTQ) e SEPT2G-SEPT11G foram analisadas. Uma vez que a estrutura 3FTQ está ligada a um análogo de GTP observamos os *switches I* e *II* ordenados num estado “inicial”, necessário para a hidrólise do GTP a GDP (figura 44A e 44C em verde). No estado inicial a carbonila da Thr102 interage com uma molécula de água (1) que por sua vez interage com o Mg^{+2} , deixando o *switch II* “estendido”, o que permite que a Thr78 do *switch I* realize a catalise do GTP. Uma vez liberado o fosfato γ , o Mg^{+2} e a molécula de água que o coordenam (água 1), a carbonila da Thr102 forma uma ligação de hidrogênio com a amina da cadeia principal da Tyr105 reordenando o *switch II* para o estado “final” (figura 44B). O estado final do *switch I* deixa a Thr78 afastada do sítio ativo e reorientando-o para interagir com a outra subunidade do complexo (SEPT11G no caso). O estado final do *switch II* (presente na SEPT2G do complexo com SEPT11G) é estabilizado por uma segunda ligação de hidrogênio formada entre a carbonila da Gly104 com a amina do Asp107, formando a estrutura que chamamos do *S-bend*. Assim, quando o *S-bend* estiver formado (rosa em figura 44C), a Pro103 criaria um impedimento estérico se o *switch I*

permanecesse no seu estado inicial impossibilitando o correto posicionamento da Thr78 para catalise. Ou seja, o estado final do *switch II* é incompatível com o estado inicial do *switch I*. Na SEPT11G, uma septina cataliticamente inativa, o estado inicial e o final é o mesmo uma vez que não tem liberação do fosfato γ do nucleotídeo (figura 45A). O *switch II* forma o *S-bend*, como no estado final da SEPT2G, mas com ligeiras diferenças. Na SEPT11G, na posição 102 encontramos uma valina que é um aminoácido característico do grupo e tem uma fenilalanina em lugar de tirosina na posição 104. Isto leva a formação de um *S-bend* com a metade do estado inicial, onde a carbonila da Thr101 forma uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água (2) que por sua vez interage com o fosfato γ do GTP e a água (1) que coordena o Mg^{+2} , e a outra metade com o estado final que forma uma ligação de hidrogênio entre a carbonila da Gly103 com a amina do Asp106. O *S-bend* permanente na SEPT11G estaria facilitado pela Val102 e a água 2 evitando a interação entre a carbonila da Thr101 e a água 1, o que impediria que o *switch II* fique estendido como na SEPT2G (figura 44A). O estado permanente do *S-bend* na SEPT11G (estado final para *switch II*) impediria a aproximação do *switch I* perto do fosfato γ . De tal modo nossos mutantes da SEPT6G que apresentam a Thr78 catalítica (homólogo da Thr78 do *switch I* em SEPT2) provavelmente continuam inativos por causa do impedimento estérico com o *S-bend*, que proíbe a correta conformação do *switch I* para a Thr realizar a hidrólise do fosfato γ (como mostrado na figura 45B).

Figura 44 - Estado inicial e final dos *switches I* e *II* durante a hidrólise do GTP. Na SEPT2G ligada a um análogo não hidrolisável de GTP (GMppNHp) observamos o *switch I* (verde em C) e o *switch II* (em A) no estado inicial, estado que permite a hidrólise do fosfato γ . Neste estado, a Thr78 (do *switch I*) está orientada para coordenar uma molécula de água que realiza o ataque nucleofílico. O *switch II* está “estendido”, permitindo uma ligação entre a carbonila da Thr102 e uma molécula de água (1) que coordena diretamente com o Mg^{+2} , que por sua vez é ligado pelos fosfatos β e γ do GTP. Após a hidrólise, o *switch I* é liberado para o estado final reorientando-o para interagir com a outra subunidade do complexo (SEPT11G). No *switch II* o estado final leva a formação de duas ligações de hidrogênio (em B), uma entre a carbonila da Thr102 e a amina da Tyr105 e a outra entre a carbonila da Gly104 e a amina do Asp107; formando o *S-bend*. Assim temos que a formação do *S-bend* criaria um impedimento estérico entre a Pro103 e o estado inicial do *switch I* (em C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 45 - Estado inicial e final (o mesmo estado) do *switch II* da SEPT11G. A diferença em relação a SEPT2G, SEPT11G apresenta um único estado para o *switch II* uma vez que não hidrolisa o GTP. A) O *switch II* forma o *S-bend* com a metade do estado inicial da SEPT2G, onde a carbonila da Thr101 interage com a molécula de água 2 que na sua vez coordena com o fosfato γ e a água 1, a outra metade do switch está como no estado final da SEPT2G onde a carbonila da Gly103 faz uma ligação de hidrogênio com a amina do Asp106. O estado permanente do *S-bend* estaria facilitado pela Val102 (um aminoácido característico do grupo II; é Pro nas outras septinas) e pela presença da água 2. De tal forma, embora com a Thr78 nos mutantes da SEPT6, o *S-bend* permanente na SEPT11G levaria a um impedimento estérico entre o *switch II* e o *switch I* (em B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confirmar esta hipótese encomendamos o mutante da SEPT6 que além da inserção descrita anteriormente, apresenta a mutação da Val102 (homóloga da Pro103 na SEPT2) pela prolina conservada em septinas gerando o mutante: SEPT2G-SEPT6G_{swI_2_V102P} e SEPT6G_{swI_2_V102P}.

Após a co-expressão e co-purificação do novo mutante observamos uma mudança drástica em comparação com os anteriores. Ao comparar com o perfil cromatográfico do heterodímero nativo da SEPT2G-SEPT6G, o mutante apresenta majoritariamente monômeros em solução (figura 46A) o que sugere instabilidade para a formação do heterodímero contendo o novo mutante da SEPT6G. Como o pico 1 não foi observado claramente, as alíquotas correspondentes foram concentradas e injetadas numa coluna de exclusão molecular analítica para confirmar a presença dos dímeros (o mesmo procedimento foi realizado com o pico 2). Efetivamente notamos as duas formas oligoméricas em solução, confirmando a predominância de monômeros (figura 46B).

Após observar o efeito da mutação no heterodímero, avaliamos o comportamento da SEPT6G_{swI_2_V102P} expressa sozinha. As septinas do grupo II se caracterizam por serem monoméricas em solução com ausência de GTP endógeno ligado (apo).^{85,104} O que observamos no mutante SEPT6G_{swI_2_V102P} é a presença de dois picos no cromatograma, um correspondente a um homodímero e o outro a monômeros de SEPT6G_{swI_2_V102P} (figura 46 C e D).

Por outro lado, o experimento de liberação do nucleotídeo endógeno mostrou a presença de GTP e GDP ligado no heterodímero formado pela SEPT2G e SEPT6G_{swI_2_V102P}, o que mostra ainda a falta de atividade no mutante SEPT6G_{swI_2_V102P} (figura 47A). Isto foi confirmado ao analisar o conteúdo de nucleotídeo na SEPT6G_{swI_2_V102P} expressa sozinha, onde o monômero da SEPT6G_{swI_2_V102P} apresenta GTP endógeno ligado (figura 47B). Embora este resultado mostre que ainda não obtivemos uma SEPT6G cataliticamente ativa, demonstra a importância da Val102 na estabilidade da interface G entre SEPT2G e SEPT6G. Além disso, o mutante SEPT6G_{swI_2_V102P} forma homodímeros de SEPT6G e monômeros capazes de manter o GTP ligado, condição diferente da SEPT6G nativa (figura 47B). A aparente ausência de GTP ligado nos homodímeros de SEPT6G_{swI_2_V102P} pode estar relacionado com a baixa quantidade de homodímeros obtidos durante a purificação, pois é bem estabelecido que a dimerização de septinas está relacionado diretamente com a ligação dos nucleotídeos.^{44,91,105}

Figura 46 - Purificação dos mutantes SEPT2G-SEPT6G_{swI_2_V102P} e SEPT6G_{swI_2_V102P}. Podemos observar que a mutação da valina conservada no grupo da SEPT6G (Val102) pela prolina conservada em todos os demais grupos de septinas alterou a estabilidade da formação do heterodímero entre SEPT2G e SEPT6G (A e B). Em A, observamos que em comparação com o heterodímero nativo (pontilhaz azuis), o heterodímero mutante apresenta um perfil que sugere uma maior população de monômeros em solução (linha vermelha). Para confirmar a presença de dímeros, se separaram os picos 1 e 2 e foram injetados novamente numa coluna cromatográfica de gel filtração mostrando dois populações (em B). Por outro lado, a mutação também alterou o comportamento da própria SEPT6G observando uma pequena população de dímeros em solução (C). Novamente as amostras correspondentes aos picos 1 e 2 foram injetados numa coluna cromatográfica de gel filtração, mostrando a presença das duas espécies em solução (D).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 - Liberação dos nucleotídeos nos mutantes da SEPT6G_{swI_2_V103P}. Na pequena população de heterodímeros observadas em SEPT2G-SEPT6G_{swI_2_V103P}, ainda foi identificada a presença de GTP e GDP ligado nas proteínas, indicando a falta de atividade no mutante da SEPT6 (em A). Embora o mutante da SEPT6G não apresente atividade catalítica, ele de fato mudou o comportamento da proteína uma vez que foi detectado GTP ligado na SEPT6G_{swI_2_V103P} (em B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Note-se mais uma vez a dificuldade para conferir atividade catalítica a uma septina do grupo II, no caso a SEPT6G. Nossos resultados mostram a importância da deleção na região do *switch I* neste grupo, junto com a Val102 característica, na estabilização da interface G com septinas do grupo III.

Esta parte do estudo foi elaborada antes de saber a importância dos *switches* para a interação entre septinas dos grupos II (SEPT6) e III (SEPT2). Por tanto, agora que compreendemos sua importância, planejar um mutante ativo pode ser um desafio maior do que originalmente imaginado. É importante lembrar a rede de interações específicas envolvendo resíduos característicos dos grupos II e III (figura 34). Aqui destaca a importância da orientação da His73 em manter a rede de interação em conjunto com a presença do fosfato γ . Isto levanta a questão se a introdução dos 5 resíduos no *switch I*, além da Thr78 e a mutação da Val102 na SEPT6, estaria desordenando os switches e com isso desestabilizando a interação com a SEPT2. Podemos relacionar isso com uma menor quantidade de dímeros em solução, assim como com uma menor termoestabilidade dos mutantes frente ao heterodímero nativo.

Evidentemente é necessário aprofundar os estudos relacionados com a importância do grupo cataliticamente inativo. Infelizmente, esta etapa do trabalho se viu afetada pela interrupção dos laboratórios durante a pandemia, razão pela qual esta parte do trabalho está menos completo.

4.3 Especificidade da interface NC nas septinas do grupo III

O domínio C-terminal das septinas é uma região importante para a estabilização da interface NC no filamento. Sendo confirmada a orientação paralela em solução para os *coiled-coils* formados pelo domínio C-terminal em septinas de *C. elegans*, *S. cerevisiae* e humanas^{12,49-50}, como sua importância para a correta montagem e estabilização do filamento, realizamos ensaios de cristalização dos *coiled-coils* formados pelo domínio C-terminal das septinas do grupo III. Isto com o objetivo de elucidar as interações moleculares específicas neste grupo de septinas e sua relação com o filamento.

Das quatro septinas pertencentes ao grupo III foram cristalizadas com sucesso os *coiled-coil* das septinas SEPT1CC, SEPT4CC e SEPT5CC (condições de cristalização na tabela 12). A coleta e resolução da estrutura cristalográfica também foi bem sucedida, e os

parâmetros correspondentes ao processamento de dados e à resolução da estrutura são resumidos na tabela 13. Os parâmetros de qualidade das estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) são mostrados na figura 48. Os parâmetros para as estruturas dos *coiled-coil* estão dentro dos esperados para estruturas de boa qualidade, com exceção do valor de *R_{free}* da SEPT4CC que pode ser um reflexo da alta anisotropia dos dados.

Tabela 12 - Condições de cristalização dos *coiled-coil* das septinas do grupo III.

Proteína	Condição de cristalização
SEPT1CC	200 mM de acetato de zinco e 12% w/v PEG 3350
SEPT4CC	100 mM acetato de sódio pH 4,6, 200 mM de NH ₄ SO ₄ e 16% w/v PEG 4000
SEPT5CC	100 mM ácido cítrico pH 5,0 e 1,6 M de sulfeto de amônio

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 - Tabela cristalográfica da região de *coiled-coil* das septinas SEPT1, SEPT4 e SEPT5. Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.

Proteína	SEPT1CC	SEPT4CC	SEPT5CC
Código PDB	6WBE	6WB3	6WCU
Fonte de raios-X	Alba BL13 XALOC	Alba BL13 XALOC	Diamond I04
Detetor	Pilatus 6M	Pilatus 6M	ADSC Quantum 315r
Parâmetros da cela (Å) a; b; c α ; β ; γ	26,23; 60,45; 81,64 90,00; 90,00; 90,00	25,76; 41,46; 54,59 90,00; 90,00; 90,00	22,59; 26,11; 45,47 90,00; 104,28; 90,00
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Resolução (Å)	81,64 – 2,10 (2,16 – 2,10)	33,02 – 1,35 (1,37 – 1,35)	26,11 – 1,80 (1,84 – 1,80)
λ (Å)	0,82652	0,97950	0,97950
Multiplicidade	5,7 (5,9)	12,1 (12,3)	3,0 (3,1)
R _{pim} (%)	2,7 (13,6)	2,2 (26,1)	4,0 (14,5)
CC (1/2)	0,999 (0,948)	0,999 (0,948)	0,995 (0,977)
Completeza (%)	99,2 (99,0)	99,9 (100,0)	97,4 (97,1)
Reflexões	45377 (3763)	162112 (8065)	14437 (950)
Reflexões únicas	7988 (640)	13442 (654)	4769 (306)
I/ σ	16,4 (5,6)	16,2 (2,6)	11,3 (4,5)
Reflexões usadas no refinamento	7959	13276	4768

(continua)

(continuação)

Tabela 14 - Tabela cristalográfica da região de *coiled-coil* das septinas SEPT1, SEPT4 e SEPT5. Os valores em parêntesis se referem a os valores na camada de alta resolução.

R (%)**	20,80	22,15	21,86
R _{free} (%)**	25,65	24,67	24,32
N° de átomos na proteína	882	518	551
N° de átomos do ligante	27	25	0
B (Å ²)	45,64	31,30	21,55
Coordinate error (Å) (basado no ML)	0,20	0,24	-
Phase error (°)	28,15	-	29,08
Ramachandran Plot			
Favorecidos	97,09	100,0	100,0
Aceitos	2,91	0,0	0,0
Não aceitos	0,0	0,0	0,0
Clashcore dos átomos	12,73	3,69	11,54
RMSD da geometria ideal			
r.m.s. comprimento de ligações (Å)	0,015	0,010	0,009
r.m.s ângulo de ligações (°)	1,470	0,870	1,054

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 - Gráficos de qualidade das estruturas dos *coiled-coil* SEPT1CC, SEPT4CC e SEPT5CC. As estruturas a ser comparadas com todas as estruturas depositadas no PDB (barras verticais em preto) e estruturas de resolução similar (barras verticais sem preenchimento), mostram valores esperados para estruturas de boa qualidade. A única estrutura com valores de *Rfree* muito abaixo do esperado é a SEPT4CC, que poderia se reflexo da alta anisotropia dos dados.Fonte: Adaptada de PROTEIN DATA BANK⁹⁵

Quando observamos tanto as estruturas cristalográficas de septinas individuais como a estrutura do heterocomplexo, é fácil esperar que a orientação de todos os *coiled-coils* sejam paralelas (como mostrado na figura 49). Esta suposição se vê reforçada pelos reportes de *coiled-coils* paralelos em solução para algumas septinas.^{49,50,106}

Figura 49 - Orientação esperada para os *coiled-coils* de septinas. Da estrutura cristalográfica do heterocomplexo (modificada de 2QAG para representar a SEPT3) podemos esperar uma orientação paralela entre os *coiled-coils* das septinas a partir da projeção do seu C-terminal (setas pretas saindo para cima do octâmero).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao resolver a estrutura cristalográfica da SEPT4CC observamos um *coiled-coil* antiparalelo com um ângulo de empacotamento de -27° , orientação inesperada para os *coiled-coils* de septinas (figura 50A). Identificamos a fase *abcdefg* do *coiled-coil* a partir da estrutura, com aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* (verde) e aminoácidos hidrofóbicos nas posições *d* (roxo) (figura 50B). Esta condição foge do observado em um *coiled-coil* clássico onde ambas as posições *a* e *d* são hidrofóbicas e forma a faixa de interações na interface entre as duas hélices. Além disso, devido a orientação antiparalela os aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos são distribuídos na estrutura de tal forma que a deixa com um lado da interface hidrofílica e outra hidrofóbica (figura 50C e D). O lado hidrofóbico do *coiled-coil* é estabilizado por interações hidrofóbicas como em um *coiled-coil* clássico, enquanto o lado hidrofílico está estabilizado por uma rede de ligações de hidrogênio formada pelos aminoácidos das posições *a* de ambas as hélices (figura 51). Esta rede de ligações é possível pela própria natureza antiparalela do *coiled-coil*: os aminoácidos nas posições *a* de uma hélice estão deslocados ao longo do eixo da hélice em relação as próximas posições *a* que vem da outra hélice. Este deslocamento faz com que as cadeias laterais dos aminoácidos nas posições *a* fiquem intercalados (figura 51A). Existe uma conveniência entre a orientação antiparalela e a sequência de aminoácidos nas 4 posições *a* do *coiled-coil* ao longo da estrutura (E-D-Q-Q, figura 51B). Quando as duas hélices são alinhadas antiparalelamente, com as cadeias laterais intercalando, o arranjo fica como mostrado na figura 51B. Desta forma as cargas negativas de Glu e Asp nunca são adjacentes (sempre tem pelo menos um Gln entre eles).

SEPT4CC (Antiparalelo)

Figura 50 - *Coiled-coil* antiparalelo da SEPT4CC. (A) A estrutura cristalográfica mostrou além da orientação antiparalela inesperada (setas pretas) da SEPT4CC, a fase *abcdefg* do *coiled-coil*. (B) Nesta fase, aminoácidos hidrofílicos estão nas posições *a* (verde) enquanto aminoácidos hidrofóbicos estão nas posições *d* (roxo). (C e D) isto permite a formação de um lado hidrofílico e um lado hidrofóbico na interface do *coiled-coil*, condição única para *coiled-coil* antiparalelos uma vez que esta orientação deixa todos os aminoácidos das posições *a* de um lado e os das posições *d* no outro. Em B, as setas azuis indicam a direção da sequência de aminoácidos nas duas cadeias. As setas pretas indicam como as cadeias laterais saindo das posições *a* da hélice de baixo (os *knobs*) encontram os *holes*, em formato de diamante, formado por quatro cadeias laterais da hélice de cima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 51 - O lado hidrofílico do *coiled-coil* antiparalelo da SEPT4CC é estabilizado por uma rede de ligações de hidrogênio formada pelos aminoácidos nas posições *a*. (A) A natureza antiparalela do *coiled-coil* permite que os aminoácidos nas posições *a* em ambas as hélices são intercalados, permitindo a rede de interações. (B) O antiparalelismo, também permite que os aminoácidos intercalados nas posições *a* (E-D-Q-Q) nunca deixem a E e D adjacentes (evitando a repulsão de cargas). As setas azuis indicam a direção da sequência de aminoácidos nas duas cadeias. As setas pretas indicam a rede de ligações de hidrogênio como vistas em A.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura da SEPT1CC apresenta as mesmas características que a SEPT4CC, com a diferença de ter quatro hélices na unidade assimétrica formando dois *coiled-coils*. Ambos os *coiled-coils* da unidade assimétrica da SEPT1CC são antiparalelos, com um lado hidrofílico e um lado hidrofóbico como em SEPT4CC (figura 52). Em ambos os *coiled-coil* se observa a rede de ligações de hidrogênio que estabilizam o lado hidrofílico. Embora ambos os *coiled-coils* apresentem as mesmas características, um deles (formado pelas subunidades A e C) tem um deslizamento de uma volta (um *heptad repeat* – 7 aminoácidos) entre as hélices (figura 52B). Isto ocasiona a perda de interações entre as hélices do *coiled-coil* no extremo C-terminal. Apesar desta perda, a natureza anfipática da interface do *coiled-coil* é mantida.

Figura 52 - *Coiled-coil* da SEPT1CC. Apresenta as mesmas características que o *coiled-coil* da SEPT4CC: (A e D) *coiled-coil* antiparalelo, (B e E) com aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* e aminoácidos hidrofóbicos nas posições *d*. (C e F) Isto permite formar um lado hidrofílico e outro hidrofóbico na interface de contato das duas hélices. Diferente da SEPT4CC, a SEPT1CC tem dois dímeros na unidade assimétrica com a presença de dois *coiled-coils*. Um deles como visto em SEPT4CC (em A, B e C) e outro que apresenta um deslizamento de uma volta (7 aminoácidos) de uma hélice em relação a outra, perdendo interações próximas ao C-terminal (em D, E e F). Embora este deslizamento, o *coiled-coil* C-deslocado ainda mantém a característica anfipática. Em B e E, as setas azuis indicam a direção da sequência de aminoácidos nas duas cadeias. As setas pretas indicam como as cadeias laterais saindo das posições *a* da hélice de baixo (os *knobs*) encontram os *holes*, em formato de diamante, formado por quatro cadeias laterais da hélice de cima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados mostram três descobertas importantes em relação a *coiled-coils* e septinas. A primeira é a orientação antiparalela inesperada para *coiled-coils* de septinas, porque a partir das estruturas cristalográficas esperamos a formação de *coiled-coils* paralelos entre septinas do grupo III (ver figura 49). A segunda é que as estruturas dos *coiled-coils* apresentam uma interface de contato anfipática (um lado hidrofílico e outro lado hidrofóbico),

onde até a data uma única estrutura de *coiled-coil* reportada em abril de 2020 tem a mesma característica¹⁰⁷, apresentando este novo tipo estrutural de *coiled-coil*. E a terceira é o deslocamento do *coiled-coil* de uma hélice em relação à outra, como visto em SEPT1CC, que mostra um grau de flexibilidade estrutural intrínseca (pelo menos neste caso) que talvez poderia ser visto como um deslizamento entre hélices de *coiled-coils* formados por filamentos adjacentes (como explicado mais na frente).

Por outro lado, a estrutura cristalográfica da SETP5CC (diferentes dos anteriores mencionados) apresentou um *coiled-coil* paralelo na unidade assimétrica (figura 53A). A fase deste *coiled-coil* mostra aminoácidos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* como num *coiled-coil* clássico (figura 53B), deixando dois lados hidrofóbicos estabilizando a interface do *coiled-coil* (figura 53 C e D). Como um *coiled-coil* clássico, apresenta um empacotamento *knobs into holes* como diamante, onde um aminoácido na posição *a* de uma das hélices encaixa no *hole* formado por quatro aminoácidos nas posições *d-g-a-d* da outra hélice (setas pretas da figura 53B e figura 54A). No caso do *knob* ser um aminoácido na posição *d*, o *hole* é formado pelos aminoácidos *a-d-e-a* da outra hélice (figura 54B). Embora a SEPT5CC apresente as características de um *coiled-coil* clássico, ainda apresenta diferenças dentro deste grupo de *coiled-coils* clássicos. A sequência da SEPT5CC tem uma Ile, duas Leu e uma Met nas posições *a*, enquanto nas posições *d* tem uma Thr, uma Lys, duas Met e uma Gln. *Coiled-coils* paralelos e diméricos, apresentam comumente Leu nas posições *d*.¹⁰⁸ Por tanto, apesar de apresentar as características de um *coiled-coil* clássico ainda assim não é tão típico (com duas Leu nas posições *a*). Outro aminoácido que chama atenção é a Lys na posição *d* que está no centro do *coiled-coil* (vista no *hole* da figura 54A). Como mostra a figura, embora a presença de um aminoácido carregado na interface, ele está contribuindo principalmente com sua região hidrocarboneto para fazer contatos hidrofóbicos no *knob into hole*.

SEPT5CC (Paralelo)

Figura 53 - *Coiled-coil* da SEPT5CC. A estrutura mostra um *coiled-coil* paralelo (setas pretas em A), com uma fase *abcdefg* com aminoácidos hidrofóbicos (roxo) tanto nas posições *a* e *d* como em *coiled-coils* clássicos (em B). Isto permite que a interface de contato entre as hélices este estabilizada por interações hidrofóbicas (em C e D). Devido a ser um *coiled-coil* paralelo, os aminoácidos das mesmas posições estão no mesmo nível como mostrado em C. Em B, as setas azuis indicam a direção da sequência de aminoácidos nas duas cadeias. As setas pretas indicam como as cadeias laterais saindo das posições *a* da hélice de baixo (os *knobs*) encontram os *holes*, em formato de diamante, formado por quatro cadeias laterais da hélice de cima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 54 - *knobs into holes* na estrutura cristalográfica da SEPT5CC. Na figura podemos observar o mapa 2Fo-Fc dos aminoácidos que formar parte dos *knobs* e os *holes*. Os aminoácidos hidrofóbicos das posições *a* e *d* estão pintados de roxo e os que não formam parte deles em ciano. (A) O *knob* da posição *a* se encaixa no *hole* formado pelos aminoácidos *a*, *d*, *g* e *a* da outra hélice. (B) O *knob* da posição *d* se encaixa no *hole* formado pelos aminoácidos *a*, *e*, *d* e *a* da outra hélice.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com estes resultados temos dois pontos a serem discutidos: o primeiro seria a natureza anfipática da interface encontrada nos *coiled-coils* antiparalelos e o segundo a própria existência destes *coiled-coils* antiparalelos nas SETP1CC e SEPT4CC, uma vez que esperamos *coiled-coils* paralelos tomando como referência a projeção do C-terminal na estrutura do heterocomplexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 (além dos dados em solução para as outras espécies).^{12,49,50,54} Além disso, discutiremos sobre a relação entre as duas interfaces de contato vistas nos *coiled-coils*, a interface totalmente hidrofóbica e a interface anfipática.

Como mencionamos, os *coiled-coil* são caracterizados por ter interfaces hidrofóbicas produto dos aminoácidos nas posições *a* e *d* (independente da orientação). Existem poucos casos em que são encontrados aminoácidos polares (carregados ou não) nestas posições e que conferem especificidade para a orientação (paralelo/antiparalelo), o estado oligomérico e sensibilidade ao pH.^{109–112} Embora encontrados nestas posições, estes aminoácidos costumam ser raros aparecendo em um ou, no máximo, dois *heptad repeat* ao longo do *coiled-coil*^{113–114}, como por exemplo: NxxI/Lxxx, I/LxxNxxx (Asn na posição *a* e *d*) encontrado no auto transportador trimérico de adesina (TAAs).¹¹³ Outro exemplo é da kinase Nek2, um *coiled-coil* paralelo com o registro Lxx[RK]Exx que poderia adotar dois registros diferentes com R/K nas posições *d* e outro com E nas posições *a*. Esta hipótese ainda não foi confirmada devida a ausência da estrutura do *coiled-coil*.¹¹⁵ Recentemente foi relatado a estrutura da proteína Dld1 de *Serendipita indica* (fungo fitopatogênico), um *coiled-coil* antiparalelo o qual apresenta majoritariamente alaninas nas posições *a* e histidinas nas posições *d*.¹⁰⁷ Devido a orientação antiparalela, forma uma interface com um lado hidrofóbico e outro hidrofílico (com as His intercaladas, formando uma rede de interações) como visto nas nossas estruturas antiparalelas.

Após de um levantamento na literatura e não identificar um *coiled-coil* com um lado hidrofílico e outro hidrofóbico (além da Dld1), utilizamos o servidor CC+ Database Coiled-coil¹¹⁶ para identificar estruturas de *coiled-coils* com estas características. Usando a fase [EDNQSTH]^{a/d}-X(6)-[EDNQSTH]^{a/d}-X(6)-[EDNQSTH]^{a/d}-X(6)-[EDNQSTH]^{a/d}-X(6) para identificar *coiled-coils* com pelo menos 4 *heptad repeats*, o servidor sugere poucas sequências mas nenhuma delas apresenta na sua estrutura *coiled-coils* com interfaces anfipáticas (um lado da interface hidrofílica e outro hidrofóbica) até o 9 de janeiro de 2020 que foi a última atualização do servidor (por isso não foi identificada Dld1). Acreditamos, portanto, estar frente a um novo motivo estrutural, um *coiled-coil* natural com uma sequência de aminoácidos compatível para formar interfaces mistas hidrofílica/hidrofóbica. Mais uma vez, é importante mencionar que este motivo seria possível unicamente para *coiled-coils*

antiparalelos porque nesta orientação estariam posicionados os aminoácidos *a* em um lado e os aminoácidos *d* no outro lado da interface (figuras 50 e 52), diferente para *coiled-coils* paralelos que apresentam uma mistura de aminoácidos *a* e *d* em ambos os lados (figura 53). Outra característica que favorece a estabilização dos *coiled-coil* antiparalelos são os aminoácidos carregados ou polares na posição *a* (E-D-Q-Q), que se tratando de um *coiled-coil* paralelo ocorreria repulsões eletrostáticas desestabilizando o *coiled-coil* (todos os aminoácidos *a* estão no mesmo nível, como na figura 55). Embora SEPT5CC é um *coiled-coil* paralelo, ele não apresenta os aminoácidos carregados como mostra a figura 55; o que será discutido mais na frente.

Figura 55 - Distribuição dos aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* do *coiled-coil*. (A) A orientação antiparalela nas SEPT1CC e SEPT4CC permite que os aminoácidos nas posições *a* (no lado hidrofílico) permaneçam intercalados ao longo do *coiled-coil* formando uma rede de ligações de hidrogênio e neutralizando possível repulsão de cargas. (B) Por outro lado, num *coiled-coil* paralelo hipotético com as mesmas características, teríamos os aminoácidos carregados no mesmo nível produzindo repulsão por cargas. As setas pretas senilizam a direção das hélices.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tratando-se de um novo motivo estrutural, é possível que a presença inesperada de *coiled-coils* antiparalelos para as septinas SETP1CC e SETP4CC esteja relacionada com alguma função biológica. Deste modo, começamos a realizar análises das sequencias de aminoácidos dos *coiled-coil* das quatro septinas SEPT1CC, SETP2CC, SEPT4CC e SEPT5CC.

Os servidores online para predição da fase (*abcdefg*) e orientação dos *coiled-coil* a partir da sequência de aminoácidos foram mais bem desenvolvidos nos últimos anos, permitindo predizer estas características em *coiled-coils* com maior precisão.¹¹⁷ Utilizando o servidor LOGICOIL¹¹⁸ para analisar nossas sequencias, observamos que todos os *coiled-coils* do grupo da SEPT2 são preditos como paralelos com uma fase que mantém aminoácidos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* (figura 56A). Na saída do servidor observamos a fase

(*register*) para cada sequência de aminoácidos onde ressaltamos de roxo as posições *a* e *d*. Também mostra o estado oligomérico com sua orientação mais provável segundo uma pontuação. Para as sequências de SEPT1CC, SEPT4CC e SEPT5CC o estado mais provável é um dímero paralelo, enquanto para SEPT2CC o mais provável é um tetrâmero paralelo. Utilizando uma opção que permite sugerir a fase *abcdefg* para a sequência analisada, submetemos a sequência dos *coiled-coils* com a fase observada na estrutura cristalográfica da SEPT4CC onde os aminoácidos nas posições *a* seriam hidrofílicos (verde na figura 56B). Como resultado obtivemos um *coiled-coil* dimérico antiparalelo para SEPT1CC e SEPT2CC, um *coiled-coil* tetramérico antiparalelo para SEPT4CC e um dímero paralelo para SEPT5CC (figura 56B). Analisando a pontuação observada em SEPT5CC, os valores são muito próximos em ambas as orientações, com um valor de 1,02 para a orientação antiparalela e 1,04 para a paralela. Comparando a diferença entre as orientações nas outras sequências, e os valores para GCN4 (o clássico zíper de leucina) com 1,51 para paralelo e 0,72 para antiparalelo, podemos sugerir que SEPT5CC poderia adotar a orientação antiparalela com o registro observado na estrutura da SEPT4CC.

Estes resultados sugerem que as quatro sequências poderiam adotar ambas orientações com fases diferentes. Então, após um alinhamento de sequências entre SEPT1CC, SEPT2CC, SEPT4CC e SEPT5CC definimos o que seriam as fases para *coiled-coils* antiparalelos (figura 57A) e paralelos (figura 57B), segundo as estruturas cristalográficas da SEPT4CC (antiparalela) e SEPT5CC (paralela). Com as fases para a orientação antiparalela, nas quatro sequências observamos aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* (verde, em figura 57A) e hidrofóbicos nas posições *d* (roxo, em figura 57A), enquanto para as fases da orientação paralela aminoácidos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* (roxo, em figura 57B). Embora todas as sequências mantem as mesmas características em ambas as orientações, a SEPT2CC é a mais diferente entre as quatro.

A User Input: >SEPT1CC
 MARCOIL predicted region: 1
 Sequence: DTEKLI~~REKDEELRRMQEMLEKMQAQM~~QQS
 Register: cdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcd
 Result of prediction:
 Most probable state is **PARALLEL DIMER**
 Second most probable state TRIMER

 ANTI PARA TRIM TETRA
 Raw score is **0.93 1.21** 0.98 0.93

User Input: >SEPT2CC
 MARCOIL predicted region: 1
 Sequence: NNDQIL~~LEKEAELRRMQEMLARMQAQM~~QM
 Register: cdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcd
 Result of prediction:
 Most probable state is **TETRAMER**
 Second most probable state **PARALLEL DIMER**

 ANTI PARA TRIM TETRA
 Raw score is **0.92 1.2** 0.89 1.23

User Input: >SEPT4CC
 MARCOIL predicted region: 1
 Sequence: ETEKLI~~REKDEELRRMQEMLEKMQAQM~~QKS
 Register: cdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcd
 Result of prediction:
 Most probable state is **PARALLEL DIMER**
 Second most probable state **TETRAMER**

 ANTI PARA TRIM TETRA
 Raw score is **0.94 1.17** 0.96 1.07

User Input: >SEPT5CC
 MARCOIL predicted region: 1
 Sequence: ETEKLI~~RMKDEELRRMQEMLQRMKQMQ~~QDQ
 Register: cdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcd
 Result of prediction:
 Most probable state is **PARALLEL DIMER**
 Second most probable state TRIMER

 ANTI PARA TRIM TETRA
 Raw score is **0.93 1.2** 1 0.95

(continua)

(continuação)

B User Input: >SEPT1CC
Sequence: DTEKLIREKDEELRRMQEMLEKMQAQMQQS
Register: fgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefg
Result of prediction:
Most probable state is **ANTIPAPARALLEL DIMER**
Second most probable state TETRAMER

	ANTI	PARA	TRIM	TETRA
Raw score is	1.06	0.87	0.86	1.04

User Input: >SEPT2CC
Sequence: NKDQIILEKEAEELRRMQEMIARMQAQMOMQ
Register: fgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefg
Result of prediction:
Most probable state is **ANTIPAPARALLEL DIMER**
Second most probable state TETRAMER

	ANTI	PARA	TRIM	TETRA
Raw score is	1.06	0.91	0.77	1.03

User Input: >SEPT4CC
Sequence: ETEKLIREKDEELRRMQEMIHKIQKMKEN
Register: fgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefg
Result of prediction:
Most probable state is **TETRAMER**
Second most probable state ANTIPAPARALLEL DIMER

	ANTI	PARA	TRIM	TETRA
Raw score is	1.07	0.87	0.76	1.14

User Input: >SEPT5CC
Sequence: ETEKLIRMKDEELRRMQEMIQRMKQQMQDQ
Register: fgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefg
Result of prediction:
Most probable state is **PARALLEL DIMER**
Second most probable state ANTIPAPARALLEL DIMER

	ANTI	PARA	TRIM	TETRA
Raw score is	1.02	1.04	0.72	0.99

Figura 56 - Saída do servidor LOGICOIL para a predição das quatro sequências de septinas do grupo III. (A) Na saída observamos o nome da sequência analisada, a sequência de aminoácidos ingressada, a fase (register) predita pelo programa, o estado mais provável para a sequência (estado oligomérico e orientação) e na linha final a pontuação para definir a orientação e estado oligomérico. Todas as sequências são preditas como *coiled-coils* paralelos com SEPT2CC como tetrâmero e as outras três como dímeros. (B) Igual que em A, são mostradas as sequências analisadas e a predição para o estado e orientação mais provável, com a diferença que neste caso impusemos a fase como vista na estrutura antiparalela da SEPT4CC. Como resultados todos foram preditas como antiparalelas, a exceção de SEPT5CC que apresenta duas pontuações muito próximas para ambas as orientações (sugerindo uma flexibilidade para orientação nesta sequência baixo a fase antiparalela da estrutura da SEPT4CC). Com tudo, podemos concluir que as quatro sequências de septinas terias a capacidade de formar *coiled-coils* com duas orientações diferentes utilizando fases diferentes. Em ambas as figuras os aminoácidos hidrofóbicos nas posições *a* e *d* são pintados de roxo e os aminoácidos hidrofílicos de verde.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 57 - Alinhamento de sequência da região *coiled-coil* das septinas do grupo III ou grupo da SEPT2. Após o alinhamento as fases *abcdefg* segundo as estruturas antiparalelas e paralelas foram definidas nas sequencias. Desta forma observamos que segundo a fase para o *coiled-coil* antiparalelo, todas as septinas apresentam aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* e aminoácidos hidrofóbicos nas posições *d*. Quando fazemos a mesma análise com a fase do *coiled-coil* paralelo, todas as posições *a* e *d* dos *coiled-coil* apresentam aminoácidos hidrofóbicos. Estes resultados sugerem que todo os *coiled-coil* do grupo III teriam a capacidade de adotar as duas orientações, paralela e antiparalela.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com as fases para a orientação antiparalela, SEPT2CC apresenta 4 aminoácidos diferentes conservados nas posições *a* e *d* em relação as outras sequências. Com a fase da orientação paralela observamos o mesmo, com 3 aminoácidos diferentes conservados nas posições *a* e *d*. Isto deixa a SEPT2CC como a menos conservada no grupo, o que poderia estar relacionado com a dificuldade de obter cristais e subsequentemente sua estrutura cristalográfica.

Contudo, estes resultados sugerem que as sequencias dos quatro *coiled-coils* de septinas do grupo III teriam a capacidade de adotar as duas orientações, antiparalelas e paralelas com duas fases diferentes. Como não foi possível identificar esta dualidade nas estruturas cristalográficas, ou seja, não observamos as duas orientações em cristais diferentes para a mesma sequência, um método que combina a predição da estrutura *ab-initio* com docking molecular¹¹⁹⁻¹²⁰ foi realizado em colaboração com o Dr. Ingemar André da Universidade de Lund. O método realiza uma simulação para construir o modelo homomérico do *coiled-coil* mediante inserção de fragmentos e manter a interação mais favorável entre as cadeias com docking molecular durante *simulated annealing* (método *Fold'n'Dock*). Depois os modelos são refinados em base a uma função de energia de *Rosetta* para todos os átomos da molécula. Para cada sequência (4 sequências do grupo III) foram construídos inicialmente 50,000 modelos independentes, dos quais os 100 com menor energia foram agrupados e destes grupos o modelo com a menor energia foi submetido a refinamento final, gerando o melhor modelo.

Os resultados na figura 58A mostra o gráfico de energia (RFU) em função do RMSD (Å) para cada sequência modelada. Podemos observar os 50,000 modelos independentes simulados (pontos azuis) explorando completamente a visão do enovelamento dos *coiled-coils*

(mostrando todos os estados energéticos possíveis de enovelamento). Com esta estratégia é possível encontrar modelos com diferentes orientações (paralelas e antiparalelos), por isso a forma côncava dos gráficos onde nos extremos dos valores de RMSD representam orientações diferentes¹²⁰ (explicado mais na frente). Como mencionamos, os 100 melhores modelos para cada orientação são agrupados e o modelo de menor energia por grupo é submetido a 20 ciclos de refinamento (pontos em vermelho), gerando finalmente deste grupo o modelo com menor energia. Este modelo é utilizado para comparar com todos os outros modelos gerados obtendo um valor de RMSD das estruturas, sendo que para todas as sequências de septinas o modelo paralelo foi o de menor energia. Então no gráfico temos que os modelos paralelos teriam um menor valor de RMSD quando comparados com o modelo de menor energia (esquerda no gráfico) e os modelos de orientação diferente estariam com valores mais altos (direita no gráfico).

Figura 58 - Simulações dos *coiled-coil* homodímeros das septinas do grupo III ou SEPT2. (A) Foram gerados 50 000 modelos para cada septina (pontos coloridos), observado duas populações com mínimos de energia (pontos vermelhos). Embora diferença no RMSD entre elas seja considerável, não houve grande diferença do mínimo de energia. Cada população está relacionada com uma orientação para os *coiled-coil*, a de menor RMSD com *coiled-coils* paralelos e a de maior RMSD com *coiled-coils* antiparalelos. Isto mostra a capacidade de obter duas soluções com mínimos de energia próximos para as nossas sequencias de *coiled-coils*. (B) A comparar os modelos com a estruturas cristalográfica, observamos uma boa predição da orientação das cadeias laterais. Além disso, foi possível reproduzir o lado hidrofílico (aminoácidos em verde) e o lado hidrofóbico (aminoácidos em roxo) nos *coiled-coils* antiparalelos de todas as septinas. As setas no meio das hélices mostram a sua direção, diferenciando os *coiled-coils* paralelos e antiparalelos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O que é surpreendente destes resultados são duas coisas, a primeira que os modelos com orientações diferentes apresentam energias parecidas (pontos vermelhos) sugerindo a possibilidade de duas orientações para as sequências (sugerido pelas análises de sequência). A

segunda é a acurácia para reproduzir as estruturas quando comparadas com as estruturas cristalográficas mostradas na figura 58B. Comparando o modelo antiparalelo para SEPT4CC e o modelo paralelo com SEPT5CC, vemos a prescrição de modelado a nível atômico do método *Fold'n'Dock* pois apresentam um RMSD dos carbonos α da cadeia principal de 1,2 e 1,3 Å respectivamente. Além disso, o método foi capaz de identificar o registro com aminoácidos hidrofílicos nas posições *a* no *coiled-coil* da SEPT4CC (lembrando que o método utiliza inserção de fragmentos de estruturas conhecidas para construir os modelos), portanto, é necessário destacar a capacidade do método para identificar este novo motivo estrutural.

As simulações, então, sugerem fortemente que todas as sequências dos *coiled-coil* das septinas do grupo III tem a capacidade de adotar as duas orientações, paralela e antiparalela, utilizando diferentes interfaces de contato. Contudo, é necessário mostrar como a sequência de aminoácidos dos *coiled-coils* das septinas se adaptam para formar estas duas orientações com interfaces diferentes.

Identificando o consenso de aminoácidos para cada posição da fase *abcdefg* (para a orientação paralela e antiparalela) nas sequências de *coiled-coil* de septinas, podemos observar o deslocamento dos aminoácidos em relação aos registros para cada orientação (figura 59). Na figura mostramos os aminoácidos consenso para cada posição desde o N-terminal (acima) até o C-terminal (mais em baixo), além dos aminoácidos hidrofóbicos mostrados em roxo e os não hidrofóbicos em verde. Assim temos, nas posições *a* para a orientação paralela, os aminoácidos Ile, Leu, Leu e Met como consenso desde o N até o C-terminal das sequências. Outras posições como *c* e *d*, na orientação paralela, apresentam 5 aminoácidos consenso porque segundo a definição do registro observamos cinco posições *c* e *d* diferentes ao longo da sequência (figura 57B). Quando vamos para a orientação antiparalela, observamos que as posições dos aminoácidos são deslocadas. Os aminoácidos nas posições *a* (paralela) passam as posições *d* no antiparalelo, os das posições *d* (paralelo) passam para a posição *g* e os das posições *e* (paralelo) passam para as posições *a* no antiparalelo. Isto mostra que não é suficiente só mudar a orientação das hélices se não que é necessário reorientar os aminoácidos na nova fase, o que é realizado com certa facilidade para as sequências de septinas.

Figura 59 - Deslocamento dos aminoácidos a passar de uma orientação paralela para antiparalela. Vemos a distribuição das posições *abcdefg* numa das hélices do *coiled-coil* paralelo (vermelho) e antiparalelo (azul). Os aminoácidos são deslocados em relação a orientação onde aminoácidos nas posições *a* no paralelo passam a posição *d* no antiparalelo, por exemplo. Um consenso dos aminoácidos para cada posição é mostrado indo o N-terminal até o C-terminal de arriba para baixo, respectivamente. Algumas posições como *c* e *d* no paralelo (*f* e *g* no antiparalelo) apresentam 5 aminoácidos devido a que encontramos 5 posições *c* e *d* ao longo da sequência. Os aminoácidos hidrofóbicos estão pintados de roxo e os não hidrofóbicos de verde.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados geram um novo conceito relacionado ao papel dos *coiled-coil* na polimerização e estabilização dos filamentos de septinas. Como mencionamos na seção 1.2, para septinas realizar as suas funções é necessário a formação de heterofilamentos e subsequentemente as estruturas de maior ordem como anéis ou redes, por tanto, fica claro que o estado funcional das septinas é o heteropolímero e estruturas de maior ordem.⁵³ Sabemos também a importância do C-terminal, na interface NC, para a formação e estabilização do filamento.⁴³ Recentemente foi relatada a relação entre uma protease do Zika vírus (NS2B-NS3) que ataca células nervosas com a septina 2 humana (SEPT2).¹²¹ No estudo, onde o objetivo era identificar proteínas envolvidas em divisão de células neuronais que eram atacadas pela protease NS2B-NS3, observaram que SEPT2 era clivada no aminoácido 306 produzindo inibição da divisão celular. Embora os autores não mencionem no trabalho qual seria a região clivada, o aminoácido 306 está no final da hélice α_6 , por tanto, a protease cliva o C-terminal da SEPT2. Uma vez que a posição das septinas humanas no heterofilamento foi corrigida, com septinas do grupo da SEPT2 nos extremos do octâmero (figura 60 A2)⁵⁷ ou hexâmeros, fica mais evidente a importância das septinas do grupo da SEPT2 no extremo da unidade básica de polimerização. Isto valoriza ainda mais a importância do C-terminal do

grupo da SEPT2 na estabilização e possivelmente na polimerização de filamento de septinas, pois quando ele é clivado as células neuronais sofrem efeitos dramáticos.¹²¹ Num experimento realizado pela aluna de doutorado Deborah Mendonça, onde é expresso o hexâmero SEPT2-6-7 com o C-terminal da SEPT2 clivado, foi observado uma instabilidade para formar filamentos alongados e filamentos pareados em solução (em baixa ou alta concentração de sal, 50 e 300 mM NaCl respectivamente) (figura 60B). Na imagem foi possível identificar, na maioria dos casos hexâmeros de septinas (sinalizados pelas setas) e filamentos curtos. Isto confirma a importância do C-terminal das septinas do grupo da SEPT2 para a formação de filamentos a partir de hexâmeros ou octâmeros.

Os domínios C-terminal das septinas leveduras são os mais bem estudados. No trabalho onde foi identificada a posição de cada septina de levedura no octâmero (figura 60 A1), observaram a interação entre filamentos adjacentes separados por 15-25 nm de distância.⁵⁰ Nomeados como “trilho de trem”, os filamentos estão em registro um em relação ao outro, ou seja, Cdc11 de um filamento está alinhada com a Cdc11 do outro filamento. Também mostraram que o C-terminal da Cdc11 não era indispensável para a formação do octâmero e a subsequente formação de filamentos e trilhos de trem. Por outro lado, sugerem que a formação do trilho de trem seria por um *coiled-coil* tetramérico e antiparalelo das Cdc12 e Cdc3 dos filamentos adjacentes; apoiado em que o comprimento do C-terminal destes septinas é compatível com as distancias 15-25 nm. Outro trabalho publicado pouco depois pelo mesmo grupo, mostram a importância do C-terminal da Cdc11, Cdc12 e Cdc3 na polimerização do filamento sob uma monocamada lipídica (DOPC + PIP2).⁹³ Na monocamada lipídica, as septinas de levedura formam trilhos de trem como reportados nas micrografias em solução. Porém, a distância que separa os filamentos pareados se vê reduzida (condição não comentada pelos autores). Também observaram que quando o C-terminal da Cdc11 é deletado, filamentos são formados com tendência reduzida a interagir lateralmente (aumento no espaçamento entre filamentos pareados no trilho de trem). Quando o C-terminal da Cdc12 é removido, a interação entre filamentos adjacentes se vê reduzida mais ainda. Num mutante duplo onde o C-terminal da Cdc12 e Cdc3 foram removidos, filamentos pareados com espaçamento curto foram formados, indicando a importância do C-terminal da Cdc11 para formar este tipo de interação lateral (com espaçamento curto) entre filamentos adjacentes.⁹³

Sabemos que as septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 formam heterofilamentos.⁵⁸ Após co-expressar essas septinas e observá-las por *negative stain* (micrografia cedida gentilmente pela aluna Deborah Mendonça), em condições de baixo sal foi possível identificar filamentos pareados com espaçamento curto (~5 nm) e a interação

entre filamentos pareados separados por a distância de ~20 nm compatível com o observado por Bertin *et al*⁵⁰ para o trilho de trem (figura 60C). Relacionando cada septina de levedura e humana no filamento, Cdc11 e SEPT2 ocupam o extremo do octâmero. Com isso, podemos relacionar que o C-terminal das septinas que se encontram no extremo do octâmero seriam responsáveis por interações curtas nos filamentos pareados e a interação entre dois filamentos pareados poderia ser feita usando o C-terminal da Cdc12-Cdc3 ou SEPT6-SEPT7.

Figura 60 - Formação de filamentos pareados como estruturas de maior ordem. (A) Uma representação da estrutura de um octâmero formado por septinas de levedura (A1) e septinas humanas (A2). Com Cdc11 e SEPT2 no extremo dos filamentos, em ambos os casos seriam as septinas encargadas da polimerização de filamentos a partir de octâmeros. As setas saindo dos octâmeros representam os C-terminais das subunidades que contribuem para a estabilização do filamento. (B) Micrografias de negative stain mostram que quando é removido o C-terminal da SEPT2, no trîmero SEPT2-6-7, não há formação de filamentos pois se observam unicamente hexâmeros em baixas concentrações de sal (círculos e setas pretas). (C) Para o trîmero SEPT2-6-7 nativo, em baixas concentrações de sal podemos observar a formação de filamentos pareados com dois espaçamentos diferentes: com ~5nm (setas pretas) de separação dois filamentos adjacentes são pareados e estes, por sua vez, interagem com outros filamentos pareados separados por ~20 nm de distância. Isto é compatível com o observada para septinas de levedura onde se observam interações laterais de filamentos com espaçamentos curtos e compridos⁹⁶. A estrutura do octâmero foi feito usando como referência a estrutura do trîmero SEPT2-6-7 com código PDB 2QAG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Então, como a capacidade de adoptar duas orientações (paralelo e antiparalelo) por parte dos *coiled-coils* das septinas do grupo da SEPT2 se relacionaria com o pareamento lateral de filamentos adjacentes?

Com base nos nossos resultados e os dados da literatura apresentados, nós propomos um modelo que mostra a importância de ter sequências de *coiled-coils* com a capacidade adoptar duas orientações (figura 61). Para septinas realizar suas funções é necessário a polimerização das subunidades em filamentos, onde tanto as interfaces G e NC são importantes para sua estabilização. Num heterofilamento de crescimento em uma direcção, *coiled-coils* paralelos das septinas do grupo da SEPT2 seriam os responsáveis de ajudar na estabilização dele (vermelho na figura 61A). Nesta orientação, os *coiled-coils* estariam estabilizados por interações hidrofóbicas como visto num *coiled-coil* clássico. A orientação paralela em filamentos únicos se vê apoiada que em solução, as condições seriam mais favoráveis para estabilizar esta orientação (como num *coiled-coil* clássico de interface hidrofóbica). Por este motivo, provavelmente, os estudos em solução por RMN para os *coiled-coils* das septinas do grupo da SEPT2 indicam uma preferência pela orientação paralela.¹²²

Quando filamentos estão em contato com membranas, em condições favoráveis formam interações laterais.⁹³ Nosso modelo propõe que as interações laterais de espaçamento curto entre filamentos adjacentes são facilitadas por *coiled-coils* antiparalelos das septinas do grupo da SEPT2 (figura 61B e C). Esta proposta se baseia em três observações: (1) o espaçamento curto apresenta um comprimento de ~5nm, compatível com o tamanho do C-terminal das septinas do grupo SEPT2. (2) No ambiente com membrana, o lado hidrofílico do *coiled-coil* antiparalelo estaria apontando preferentemente para ela, excluindo o solvente tornando as interações hidrofílicas mais estáveis (posições *a* na figura 61C). Se o lado hidrofílico estivesse exposto ao solvente dificilmente a orientação antiparalela seria estável (lembrando da preferência da orientação paralela em solução).¹²² (3) O grau total de giro do *coiled-coil* antiparalelo ao longo dos 30 aminoácidos é de 70-80°, o que faz com que o lado hidrofílico este sempre apontando para a mesma direcção ao longo das hélices. Com isto, a nossa proposta sugere que a região no C-terminal capaz de formar *coiled-coil* nas septinas do grupo da SEPT2 num filamento, interage com o C-terminal da septina do filamento adjacente formando *coiled-coils* antiparalelos (uma vez que os filamentos pareados estão em registo). Uma vez que no modelo os filamentos nos extremos dos filamentos mantem um dos C-termais livres (figura 61B) permite o seu crescimento lateral a incorporar-se mais filamento na membrana. Portanto, diferente do modelo do trilho de trem que limita as interações laterais

para dois filamentos com um *coiled-coil* tetramérico antiparalelo⁵⁰, o crescimento lateral seria “infinito”.

Figura 61 - Modelo de interação de filamentos adjacentes usando *coiled-coils* camaleônicos. (A) O heterofilamento de septinas está estabilizado pelas interfaces G e NC. O C-terminal das septinas do grupo da SEPT2 (vermelho), formariam *coiled-coils* paralelos na interface NC homotípica no heterofilamento. Estes *coiled-coils* antiparalelos, estariam estabilizados por interações hidrofóbicas como em *coiled-coils* clássicos. (B) Quando filamentos se posicionam sob membranas, interações pareadas entre filamentos são formadas⁹⁶. Nesta interação de filamento adjacentes, os C-terminais das septinas do grupo da SEPT2 (vermelho) de filamentos diferentes em registro formariam *coiled-coils* antiparalelos. Esta orientação garante que além da interação pareada entre filamentos, a interação com a membrana seja estabilizada. (C) Com o lado hidrofílico apontando para o lado da membrana, garante que as interações hidrofílicas (posições *a*, em verde) se mantenham estáveis, enquanto o lado hidrofóbico (posições *d*, em roxo) repele o solvente (pontos vermelhos). Este modelo, por tanto, explicaria a rede de interações de filamentos pareados por espaçamento curto observado por micrografias tanto nas septinas de levedura como nas septinas humanas. As bolinhas representam SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul), SEPT7 (amarelos) e SEPT9 (verde). A orientação dos *coiled-coils* da septinas vermelhas está representado pelas setas amarelas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÕES

Septinas, são proteínas que para realizar as suas funções formam heterofilamentos a partir de hexâmeros ou octâmeros, os quais são utilizados para formar estruturas de ordem maior como anéis, redes, gaiolas etc. Se bem conhecemos a posição de cada subunidade no heterofilamento e os tipos de interfaces que o estabilizam, ainda não sabemos como estas subunidades são montadas em uma ordem específica. Isto ganha importância uma vez que defeitos na montagem do heterofilamento estão relacionados com disfunções celulares e doenças. Nosso trabalho, permite sentar as bases moleculares da especificidade de interação entre septinas dos grupos II e III, assim como propor um modelo que permite a interação de filamentos pareados quando septinas interagem com membranas.

As estruturas cristalográficas dos heterodímeros de SEPT2G-SEPT8G e SEPT2G-SEPT11G, revelam interações na interface G utilizando aminoácidos característicos para cada grupo de septinas, por tanto, as interações vistas nestes heterodímeros não podem ser reproduzidas por interações com septinas dos outros grupos através da interface G. Estas interações estão principalmente no *switch I* e *switch II* de cada subunidade, sendo os *switches* importantes para esta especificidade. Como estas características de especificidade a nível molecular foram observadas em ambos os heterodímeros, nosso trabalho também senta as bases moleculares das regras de substituição de septinas ou Regras de Kinoshita.

Por outro lado, após uma análise de estrutura cristalográfica, sequências de aminoácidos e simulações, os *coiled-coils* das septinas do grupo III mostraram a capacidade de adotar orientação paralela e antiparalela nas mesmas sequências de aminoácidos. Isto permitiu propor um modelo onde a orientação paralela se formaria no heterofilamento único de septinas, estabilizado por interações hidrofóbicas como em *coiled-coils* clássicos. Quando diversos filamentos entrariam em contato com membranas, a formação de filamentos pareados em registro estaria facilitada pela orientação antiparalela. Este *coiled-coil* antiparalelo, apresenta um empacotamento inédito com um lado hidrofílico e outro hidrofóbico. O lado hidrofílico estaria apontando para o lado da membrana, sendo excluído o solvente pelo lado hidrofóbico, e estabilizando o lado hidrofílico com uma rede de ligações de hidrogênio. Este modelo, diferente do proposto por Bertin *et al*⁵⁰, permitiria a interação pareada entre mais de dois filamentos adjacentes.

REFERENCIAS

- 1 HARTWELL, L.H.; CULLOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.66, n.2, p.352-359,1970.
- 2 BYERS, B.; GOESTCH, LG. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal Cell Biology*, v.69, n.3, p.717-721,1976.
- 3 HAARER, B.K.; PRINGLE, J.R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Molecular and Cellular Biology*, v.7, n.10, p.3678-3687,1987.
- 4 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J.R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Journal of Biological Chemistry*, v.392, n.8-9, p.681-687,2011
- 5 ONISHI, M.; PRINGLE J.R. *The nonopisthokont septins: how many there are, how little we know about them, and how we might learn more*. New York: Elsevier Ltd, 2016. v.136, p.1-19. DOI 10.1016/bs.mcb.2016.04.003.
- 6 FARKAŠOVSKÝ, M. Septin architecture and function in budding yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v.401, n.8, p.903-919,2020.
- 7 NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The mammalian septin interactome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.5, n.3, p.1-9,2017.
- 8 DULAL, N.; ROGERS, A.; WANG, Y.; EGAN, M. Dynamic assembly of a higher-order septin structure during appressorium morphogenesis by the rice blast fungus. *Fungal Genetics and Biology*, v.140, n.103385,2020.
- 9 ZHANG, X.; GONZÁLEZ, J.B.; TURGEON, B.G. Septins are required for reproductive propagule development and virulence of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Fungal Genetics and Biology*, v.135, n.103291,2020.
- 10 RIQUELME, M.; AGUIRRE, J.; BARTNICKI-GARCÍA, S.; BRAUS, G.H.; FELDBRÜGGE, M.; FLEIG, U.; HANSBERG, W.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KAMPER, J.; KUCK, U.; MOURIÑO-PÉREZ, R.R.; TAKESHITA, N.; FISCHER, R. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.82, n.2, p.1-47, 2018.
- 11 CHEN, D.D.; HASTIE, E.; SHERWOOD, D.R. Endogenous expression of UNC-59/Septin in *C. elegans*. *Journal of Cell Biology*, v.193, n.6, p.1065-1081,2019.
- 12 JOHN, C.M.; HITE, R.K.; WEIRICH, C.S.; FITZGERALD, D.J.; JAWHARI, H.; FATY, M.; SCHLAPFER, D.; KROSCHEWSKI, R.; WINKLER, F.K.; WALZ, T.; BARRAL, Y.; STEINMETZ, M.O. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO Journal*, v.26, n.14, p.3296-3307,2007.

- 13 ZERAIK, A.E.; GALKIN, V.E.; RINALDI, G.; GARRATT, R.C.; SMOUT, M.J.; LOUKAS, A.; MANN, V.H.; ARAUJO, A.P.U.; DEMARCO, R.; BRINDLEY, P.J. Reversible paralysis of *Schistosoma mansoni* by forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin that affects septins. *International Journal for Parasitology*, v.44, n.8, p.523-531,2014.
- 14 ZERAIK, A.E.; STAYKOVA, M.; FONTES, M.G.; QUINLAN, N.R.; ARAUJO, A.P.U.; DEMARCO, R. Biophysical dissection of schistosome septins: Insights into oligomerization and membrane binding. *Biochimie*, v.131, p.96-105,2016.
- 15 O'NEILL, R.S.; CLARKE, D. Partial functional diversification of drosophila melanogaster septin genes sep2 and sep5. *G3: genes, genomes, genetics*, v.6, n.7, p. 1947-1957,2016.
- 16 AKHMETOVA, K.; BALASOV, M.; SVITIN, A.; CHESNOKOVA, E.; RENFROW, M.; CHESNOKOV, I. Phosphorylation of pnut in the early stages of drosophila embryo development affects association of the septin complex with the membrane and is important for viability. *G3: genes, genomes, genetics*, v.8, n.1, p.27-38,2018.
- 17 GE, S-Q.; WU, Y-L.; ZHU, J-L.; TIAN, Y.; WANG, S-S.; GAO, Z-Q. Preliminary investigation of the effects of an FCF inhibitor interference with Septin in the early stage embryos in mice. *Molecular Medicine Reports*, v.19, n.5, p.4401-4406,2019.
- 18 SHEN, Y-R.; WANG, H-Y.; TSAI, Y-C.; KUO, Y-C.; WU, S-R.; WANG, C-Y.; KUO, P-L. The SEPT12 complex is required for the establishment of a functional sperm head-tail junction. *Molecular Human Reproduction*, v.26, n.6, p.402-412,2020.
- 19 MARQUARDT, J.; CHEN, X.; BI, E. Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton*, v.76, n.1, p.7-14,2019.
- 20 GLOMB, O.; GRONEMEYER, T. Septin organization and functions in budding yeast. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.4, n.11, p.1-6,2016.
- 21 GLADFELTER, A.S.; PRINGLE, J.R.; LEW, D.J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, n.6, p.681-689,2001.
- 22 TAKIZAWA, P.A.; DERISI, J.L.; WILHELM, J.E.; VALE, R.D. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, v.290, n.5490, p.341-344,2000.
- 23 HSU, S.C.; HAZUKA, C.D.; ROTH, R.; FOLETTI, D.L.; HEUSER, J.; SCHELLER, R.H. Subunit composition , protein interactions , and structures of the mammalian brain sec6 / 8 complex and septin filaments. *Neuron*, v.20, n.6, p.1111-1122,1998.
- 24 TOKHTAEVA, E.; CAPRI, J.; MARCUS, E.A.; WHITELEGGE, J.P.; KHUZAKHMETOVA, V.; BUKHARAEVA, E.; DEISS-YEHIELY, N.; DADA, L.A.; SACHS, G.; FERNANDEZ-SALAS, E.; VAGIN, O. Septin dynamics are essential for exocytosis septin dynamics are essential for exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, v.290, n.9, p.5280-5297,2015.
- 25 FUNG, K.Y.Y.; DAI, L.; TRIMBLE, W.S. *Cell and molecular biology of septins*. New York: Elsevier Ltd, 2014. v.310, p.289-339. DOI 10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4.

- 26 CESARIO, M.M.; ENSRUD, K.; HAMILTON, D.W.; BARTLES, J.R. Biogenesis of the posterior-tail plasma membrane domain of the mammalian spermatozoon: targeting and lateral redistribution of the posterior-tail domain-specific transmembrane protein ce9 during spermiogenesis. *Developmental Biology*, v.169, n.2, p.473-486,1995.
- 27 KUO, Y-C.; LIN, Y-H.; CHEN, H-I.; WANG, Y-Y.; CHIOU, Y-W.; LIN, H-H.; PAN, H-A.; WU, C-M.; SU, S-M.; HSU, C-C.; KUO, P-L. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Human Mutation*, v.33, n.4, p.710-719,2012.
- 28 KUO, Y-C.; SHEN, Y-R.; CHEN, H-I.; LIN, Y-H.; WANG, Y-Y.; CHEN, Y-R.; WANG, C-Y.; KUO, P-L.. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *Journal of Cell Science*, v.128, n.5, p.923-934,2015.
- 29 HU, Q.; MILENKOVIC, L.; JIN, H.; SCOTT, M.P.; NACHURY, M.V.; SPILIOTIS, E.T.; NELSON, W.J. A Septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science*, v.329, n.5990, p.436-439,2010.
- 30 FLIEGAUF, M.; KAHLE, A.; HÄFFNER, K.; ZIEGER, B. Distinct localization of septin proteins to ciliary sub-compartments in airway epithelial cells. *Biological Chemistry*, v.395, n.2, p.151-156,2014.
- 31 PALANDER, O.; EL-ZEIRY, M.; TRIMBLE, W.S. Uncovering the roles of septins in cilia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.5, n.36, p.1-7,2017.
- 32 MIRVIS, M.; STEARNS, T.; NELSON, W.J. Cilium structure , assembly , and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal*, v.475, n.14, p.2329-2353,2018.
- 33 TORRACA, V.; MOSTOWY, S. Septins and bacterial infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.4, n.127, p.1-8,2016.
- 34 MOSTOWY, S. Multiple roles of the cytoskeleton in bacterial autophagy. *PLoS Pathogens*, v.10, n.11, p.1-7,2014.
- 35 DOLAT, L.; HU Q.; SPILIOTIS, E.T. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological Chemistry*, v.395, n.2, p.123-141,2014.
- 36 YAMAZAKI, T.; OWARI, S.; OTA, S.; SUMIYA, N.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, K.; NAGUMO, T.; MIYAMURA, S.; KAWANO, S. Localization and evolution of septins in algae. *Plant Journal*, v.74, n.4, p.605-614,2013.
- 37 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.H.; STUHLMANN, H.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; TRIMBLE, W.S.; WARE, J.; ZELEZNIK-LE, N.J.; ZIEGER, B. Mammalian Septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v.13, n.12, p.4111-4113, 2002.

- 38 CAO, L.; DING, X.; YU, W.; YANG, X.; SHEN, S.; YU, L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Letters*, v.581, n.28, p.5526-5532,2007.
- 39 PAN, F.; MALMBERG, R.L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, v.7, n.103, p.1-17,2007.
- 40 ZHANG, J.; KONG, C.; XIE, H.; MCPHERSON, P.S.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W.S. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, v.9, n.24, p.1458-1467,1999.
- 41 GARCIA, W.; ARAUJO, A.P.U.; OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M.R.M.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, v.45, n.46, p.13918-13931,2006.
- 42 VALADARES, N.F.; D' MUNIZ, H.P.; ARAUJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. Septin structure and filament assembly. *Biophysical Reviews*, v.9, n.5, p.481-500,2017.
- 43 WEIRICH, C.S.; ERZBERGER, J.P.; BARRAL Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.9, n.6, p.478-489,2008.
- 44 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.106, n.39, p.16592-16597,2009.
- 45 SHEFFIELD, P.J.; OLIVER, C.J.; KREMER, B.E.; SHENG, S.; SHAO, Z.; MACARA, I.G. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.5, p.3483-3488,2003.
- 46 SALA, F.A.; VALADARES, N.F.; MACEDO, J.N.A.; BORGES, J.C.; GARRATT, R.C. Heterotypic coiled-coil formation is essential for the correct assembly of the septin heterofilament. *Biophysical Journal*, v.111, n.12, p.2608-2619,2016.
- 47 CRICK, F.H. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallography*, v.6, n.44, p.689-697,1953.
- 48 PARRY, D.A.D. Coiled-coils in α -helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. *Bioscience Reports*, v.2, n.12, p.1017-1024,1982.
- 49 LOW, C.; MACARA, I.G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, v.281, n.41, p.30697-30706,2006.
- 50 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P.; PARK, S-S.; GARCIA III, G.; PATANWALA, I.; NG, H-L.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.24, p.8274-8279,2008.

- 51 DE ALMEIDA, I.M.; VALADARES, N.F.; GARCIA, W.; DAMALIO, J.C.P.; MACEDO, J.N.A.; ARAUJO, A.P.U.; BOTELLO, C.A.; ANDREU, J.M.; GARRATT, R.C. Septin C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.62, n.2, p.317-328,2012.
- 52 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology*, v18, n.1, p.54-60,2006.
- 53 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.13, n.3, p.183-194,2012.
- 54 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KUHLMANN, D.; MACARA, I.G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v.449, p.311-317,2007.
- 55 KINOSHITA, M.; FIELD, C.M.; COUGHLIN, M.L.; STRAIGHT, A.F.; MITCHISON, T.J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell*, v.3, n.6, p.791-802,2002.
- 56 KIM, M.S.; FROESE, C.D.; ESTEY, M.P.; TRIMBLE, W.S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *Journal of Cell Biology*, v.195, n.5, p.815-826,2011.
- 57 MENDONÇA, D.C.; MACEDO, J.N.; GUIMARÃES, S.L.; BARROSO DA SILVA, F.L.; CASSAGO, A.; GARRATT, R.C.; PORTUGAL, R.V.; ARAUJO, A.P.U. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton*, v.76, n.9-10, p.457-466,2019.
- 58 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v.134, n.4, p.491-496,2003.
- 59 NAKAHIRA, M.; MACEDO, J.N.A.; SERAPHIM, T.V.; CAVALCANTE, N.; SOUZA, T.A.C.B.; DAMALIO, J.C.P.; REYES, L.F.; ASSMANN, E.M.; ALBORGHETTI, M.R.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U.; ZANCHIN, N.I.T.; BARBOSA, J.A.R.G.; KOBARG, J. A Draft of the human septin interactom. *PLoS One*, v.5, n.11, p.1-12,2010.
- 60 SANDROCK, K.; BARTSCH, I.; BLÄSER, S.; BUSSE, A.; BUSSE, E.; ZIEGER, B. Characterization of human septin interactions. *Biological Chemistry*, v.392, n.8-9, p.751-761,2011.
- 61 SELLIN, M.E.; HOLMFELDT, P.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, v.22, n.23, p.4588-4601,2011.
- 62 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. *Biological Chemistry*, v.392, n.8-9, p.791-797,2011.
- 63 MACEDO, J.N.A.; VALADARES, N.F.; MARQUES, I.A.; FERREIRA, F.M.; DAMALIO, J.C.P.; PEREIRA, H.M.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. *Biochemical*

Journal, v.450, n.1, p.95-105,2013.

64 ZERAIK, A.E.; PEREIRA, H.M.; SANTOS, Y.V.; BRANDAO-NETO, J.; SPOERNER, M.; SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U.; DEMARCO, R. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, v.289, n.11, p.7799-7811,2014.

65 CASTRO, D.K.S.V.; DA SILVA, S.M.O.; PEREIRA, H.M.; MACEDO, J.N.A.; LEONARDO, D.A.; VALADARES, N.F.; KUMAGAI, P.S.; BRANDAO-NETO, J.; ARAUJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. *IUCr Journal Biology/Medicine*, v.7, p.462-479,2020.

66 UNIPROT. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em: 28 out. 2020.

67 COILED-coil prediction. Disponível em: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_lupas.html, Acesso em: 28 out. 2020.

68 HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, v.166, n.4, p.557-580,1983.

69 WHITAKER, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration of sephadex. *Analytical Chemistry*, v.35, n.12, p.1950-1953,1963.

70 GUSKOV, A.; SLOTBOOM, D.J. Size exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering (SEC-MALLS) to determine protein oligomeric states. In: PEBAY-PEYROLL, H. (eds.) *From molecules to living organisms*. Oxford: Oxford University Press, 2016. v.102, cap.6, p.171-183. (Lecture notes in the Les Houches School).

71 SECKLER, R.; WU, G-.; TIMASHEFF, S.N. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate: formation and assembly of a stoichiometric complex. *Journal of Biological Chemistry*, v.265, n.13, p.7655-7661,1990.

72 WOJDYLA, J.A.; PANEUCCI, E.; MARTIEL, I.; EBNER, S.; HUANG, C-Y.; CAFFREY, M.; BUNK, O.; WANG, M. Fast two-dimensional grid and transmission X-ray microscopy scanning methods for visualizing and characterizing protein crystals. *Journal of Applied Crystallography*, v.49, p.944-952,2016.

73 WINTER, G. XIA2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *Journal of Applied Crystallography*, v.43, p.186-190,2010.

74 KANTARDJIEFF, K.A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein–nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, v.12, n.9, p.1865-1871,2003.

75 MCCOY, A.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; ADAMS, P.D.; WINN, M.D.; STORONI, L.C.; READ, R.J. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, v.40, p.658-674,2007.

- 76 ADAMS, P.D.; AFONINE, P.V.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V.B.; DAVIS, I.W.; ECHOLS, N.; HEADD, J.J.; HUNG, L-W.; KAPRAL, G.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; MCCOY, A.J.; MORIARTY, N.W.; OEFFNER, R.; READ, R.J.; RICHARDSON, D.C.; RICHARDSON, J.S.; TERWILLIGER T.C.; ZWART, P.H. PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogrica Section D: biological crystallography*, v.66, n.2, p.213-221,2010.
- 77 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogrica Section D: biological crystallography*, v.60, n.12, p.2126-2132,2004.
- 78 KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogrica Section D: structural biology*, v.66, n.2, p.133-144,2010.
- 79 SAMMITO, M.; MILLÁN, C.; FRIESKE, D.; RODRIGUEZ-FREIRE, E.; BORGES, R.J.; USÓN, I. ARCIMBOLDO_LITE: single-workstation implementation and use. *Acta Crystallogrica Section D: structural biology*, v.71, n.9, p.1921-1930,2015.
- 80 THE PYMOL Molecular Graphics System.version 1.2r3pre'.Disponivel em: <http://pymol.sourceforge.net/overview/index.htm>. Acesso em: 28 out.2020.
- 81 WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, v.8, n.2, p.127-134,1995.
- 82 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, v.372, n.3, p.774-797,2007.
- 83 WALSHAW, J.; WOOLFSON, D.N. SOCKET: A program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures. *Journal of Molecular Biology*, v.307, n.5, p.1427-1450,2001.
- 84 EDELHEIT, O.; HANUKOGLU, A.; HANUKOGLU, I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, v.9, n.61, p.1-8,2009.
- 85 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biological Chemistry*, v.395, n.2, p.169-180,2014.
- 86 KUMAGAI, P.S.; MARTINS, C.S.; SALES, E.M.; Rosa, H.V.D.; MENDOÇA, D.C.; DAMALIO, J.C.P.; SPINOZZI, F.; ITRI, R.; ARAUJO, A.P.U. Correct partner makes the difference: Septin G-interface plays a critical role in amyloid formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.133, p.428-435,2019.
- 87 MARTINEZ, C.; SANJUAN, M.A.; DENT, J.A.; KARLSSON, L.; WARE, J. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochemical Journal*, v.382, n.3, p.783-791,2004.
- 88 BLASER, S.; JERSCH, K.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; ZGAGA-GRIESZ, A.; BUSSE, A.; ZIEGER, B. Human septin - septin interaction: CDCrel-1 partners with

KIAA0202. *FEBS Journal*, v.519, p.169-172,2002.

89 BLASER, S.; ROSELER, 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. *Journal of Pathology*, v.210, p.231-241,2008.

90 FARKASOVSKY, M.; HERTER, P.; VOB, B.; WITTINGHOFER, A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biological Chemistry*, v.386, n.7, p.643-656,2005.

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

92 MILES, A.J.; WALLACE, B.A. *Circular dichroism spectroscopy for protein characterization: pharmaceutical applications*. New York: Elsevier Ltd, 2015. cap.6, p.109-137. DOI 10.1016/B978-0-444-59573-7.00006-3.

93 BERTIN, A.; MCMURRAY, M.A.; THAI, L.; GARCIA III, G.; VOTIN, V.; GROB, P.; ALLYN, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *Journal of Molecular Biology*, v.404, n.4, p.711-731,2010.

94 KUMAR, S.; TSAI, C-J.; NUSSINOV, R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, v.13, n.3, p.179-191,2000.

95 PROTEIN Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 28 out. 2020.

96 VETTER, I.R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide – binding switch in three dimensions. *Science*, v.294, n.5545, p.1299-1304,2001.

97 BROGNARA, G.; PEREIRA, H.M.; BRANDÃO-NETO, J.; ARAUJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. Revisiting SEPT7 and the slippage of β -strands in the septin family. *Journal of Structural Biology*, v.207, n.1, p.67-73,2019.

98 WILMOT, C.M.; THORNTON, J.M. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. *Journal of Molecular Biology*, v.203, n.1, p.221-232,1988.

99 RUSZKOWSKI, M.; DAUTER, Z. Structural studies of *medicago truncatula* histidinol phosphate phosphatase from inositol monophosphatase superfamily reveal details of penultimate step of histidine biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v.291, n.19, p.9960-9973,2016.

100 RUSZKOWSKI, M.; DAUTER, Z. On methylene-bridged cysteine and lysine residues in proteins. *Protein Science*, v.25, n.9, p.1734-1736,2016.

101 WANG, J. Crystallographic identification of spontaneous oxidation intermediates and products of protein sulfhydryl groups. *Protein Science*, v.28, n.3, p.472-477,2019.

102 METZ, B.; KERSTEN, G.F.A.; HOOGERHOUT, P.; BRUGGHE, H.F.; TIMMERMANS, H.A.M.; JONG, A.; MEIRING, H.; HOVE, J.T.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN, D.J.A.; JISKOOT, W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.8, p.6235-6243,2004.

103 JOHNSON, C.R.; STEINGESSER, M.G.; WEEMS, A.D.; KHAN, A.; GLADFELTER, A.; BERTIN, A.; MCMURRAY, M.A. Guanidine hydrochloride reactivates an ancient septin hetero-oligomer assembly pathway in budding yeast. *Elife*, v.9, n.54355, p.1-31,2020.

104 HOFF, C. *Estudos estruturais da septina humana SEPT11*. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,2008.

105 MENDOZA, M.; HYMAN, A.A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Current Biology*, v.12, n.21, p.1858-1863,2002.

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

107 NOSTADT, R.; HILBERT, M.; NIZAM, S.; ROVENICH, H.; WAWRA, S.; MARTIN, J.; KUPPER, H.; MIJOVILOVICH, A.; URSINUS, A.; LANGEN, G.; HARTMANN, M.D.; LUPAS, A.; ZUCCARO, A. A secreted fungal histidine- and alanine-rich protein regulates metal ion homeostasis and oxidative stress. *New Phytologist*, v.227, n.4, p.1174-1188,2020.

108 RAMOS, J.; LAZARIDIS, T. Computational analysis of residue contributions to coiled-coil topology. *Protein Science*, v.20, n.11, p.1845-1855,2011.

109 MONERA, O.D.; KAY, C.M.; HODGES, R.S. Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of α -helical chains in two-stranded α -helical coiled-coils. *Biochemistry*, v.33, n.13, p.3862-3871,1994.

110 RÄMISCH, S.; LIZATOVIĆ, R.; ANDRÉ, I. Exploring alternate states and oligomerization preferences of coiled-coils by de novo structure modeling. *Proteins*, v.83, n.2, p.235-247,2015.

111 GONZALEZ, L.; WOOLFSON, D.N.; ALBER, T. Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. *Nature Structural Biology*, v.3, n.12, p.1011-1018,1996.

112 SCHNARR, N.A.; KENNAN, A.J. pH-triggered strand exchange in coiled-coil heterotrimers. *Journal of the American Chemistry Society*, v.125, n.21, p.6364-6364,2003.

113 HARTMANN, M.D.; RIDDERBUSCH, O.; ZETH, K.; ALBRECHT, R.; TESTA, O.; WOOLFSON, D.N.; SAUER, G.; DUNIN-HORKAWICZ, S.; LUPAS, A.N.; ALVAREZ, B.H. A coiled-coil motif that sequesters ions to the hydrophobic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.106, n.40, p.16950-16955,2009.

- 114 FLETCHER, J.M.; BARTLETT, G.J.; BOYLE, A.L.; DANON, J.J.; RUSH, L.E.; LUPAS, A.N.; WOOLFSON, D.N. N@a and N@d: oligomer and partner specification by asparagine in coiled-coil interfaces. *ACS Chemical Biology*, v.12, n.2, p.528-538,2017.
- 115 CROASDALE, R.; IVINS, F.J.; MUSKETT, F.; DAVITER, T.; SCOTT, D.J.; HARDY, T.; SMERDON, S.J.; FRY, A.M.; PFUHL, M. An undecided coiled coil: the leucine zipper of Nek2 kinase exhibits atypical conformational exchange dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, v.286, n.31, p.27537-27547,2011.
- 116 TESTA, O.D.; MOUTEVELIS, E.; WOOLFSON, D.N. CC+: a relational database of coiled-coil structures. *Nucleic Acids Research*, v.37, p.315-322,2009.
- 117 LI, C.; CHING-HAN-CHANG, C.; NAGEL, J.; POREBSKI, B.T.; HAYASHIDA, M.; AKUTSU, T.; SONG, J.; BUCKLE, A.M. Critical evaluation of in silico methods for prediction of coiled-coil domains in proteins. *Briefings in Bioinformatics*, v.17, n.2, p.270-282,2016.
- 118 VINCENT, T.L.; GREEN, P.J.; WOOLFSON, D.N. LOGICOIL—multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. *Bioinformatics*, v.29, n.1, p.69-76,2013.
- 119 RÄMISCH, S.; LIZATOVIĆ, R.; ANDRÉ, I. Automated de novo phasing and model building of coiled-coil proteins. *Acta Crystallographica Section D: biological crystallography*, v.71, n.3, p.606-614,2015.
- 120 ANDRÉ, I.; BJELIC, S. Computational assessment of folding energy landscapes in heterodimeric coiled coils. *Proteins*, v.86, n.7, p.790-801,2018.
- 121 LI, H.; SAUCEDO-CUEVAS, L.; YUAN, L.; ROSS, D.; JOHANSEN, A.; SANDS, D.; STANLEY, V.; GUEMEZ-GAMBOA, A.; GREGOR, A.; EVANS, T.; CHEN, S.; TAN, L.; MOLINA, H.; SHEETS, N.; SHIRYAEV, S.A.; TERSKIKH, A.V.; GLADFELTER, A.S.; SHRESTA, S.; XU, Z.; GLEESON, J.G. Zika virus protease cleavage of host protein septin-2 mediates mitotic defects in neural progenitors. *Neuron*, v.101, n.6, p.1089-1098,2019.
- 122 CAVINI, I. A. *Monomeric states of the beta-amyloid peptide investigated under high pressure by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. 2018.202p. Thesis (Doctor in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,2018.