

Efeito da interação entre hexâmeros de septinas e a região BD3 da proteína reguladora Borg3 no processo de formação de filamentos de septinas

A família das septinas se caracteriza por ligar nucleotídeos de guanina e formar heterocomplexos que podem se associar formando filamentos que, por sua vez, podem formar estruturas de ordem superior tais como feixes e anéis. Essas estruturas são consideradas a forma biologicamente ativa das septinas, uma vez que a forma monomérica destas proteínas não possui função conhecida. Famílias reguladoras de septinas tem ganhado cada vez mais espaço na literatura e, dentre elas, a família de proteínas chamada BORG tem sido descrita como possível reguladora da formação de filamentos de septinas e de sua arquitetura. Neste trabalho, nós estudamos a influência da região BD3 da proteína Borg3 no processo de polimerização dos hexâmeros de septinas formado pelas proteínas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 além de construções faltando combinação dos domínios C-terminais, buscando delimitar a região de interação. Os ensaios de polimerização foram realizados *in vitro* em tampões de alta e baixa força iônica e, em seguida, a amostra foi adsorvida em grades de cobre cobertas por um filme ultrafino de carbono descarregadas negativamente. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa. Em seguida, utilizamos as técnicas biofísicas de *pull-down*, desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular e SEC-MALS para caracterizar a região de interação em solução e, a partir destes dados, modelos tridimensionais foram gerados utilizando-se o programa de inteligência artificial AlphaFold2_advanced do DeepMind. Os experimentos de polimerização demonstraram que a região BD3 da proteína Borg3 é capaz de induzir a polimerização, em ambas as condições de força iônica, apenas para o complexo hexamérico selvagem. A região de interação foi determinada pelos ensaios de *pull-down* utilizando as diferentes construções das proteínas e, concluiu-se que a interação é estabelecida pelos domínios C-terminais do heterodímero SEPT6-SEPT7 e a região BD3, formando uma espécie final significativamente mais estável termicamente. Estruturas tridimensionais mostraram que a região BD3 se encaixa em um cavidade central do *coiled-coil* heterodimérico SEPT6C-SEPT7C. A validação do modelo utilizando-se os mutantes SEPT6^{E354L} e SEPT7^{K368R} permitiu demonstrar que a interação é específica e ocorre em apenas um dos lados da superfície do *coiled-coil*.

Palavras chave: septinas, filamentos, BORGs, polimerização, *coiled-coil*.

Effect of the interaction between septin hexamers and the BD3 region of the regulatory protein Borg3 on the septin filament formation process

The septin family is characterized by binding guanine nucleotides and forming heterocomplexes that can associate into filaments that, in turn, can form higher-order structures such as bundles and rings. These structures are considered the biologically active form of septins, since the monomeric form of these proteins has no known function. Regulatory families of proteins which interact with septins have gained attention in the literature and, among them, the family of proteins called BORG has been described as a possible regulator of septin filament formation and their architecture. In this work, we studied the influence of the BD3 region of the Borg3 protein on the polymerization process of septin hexamers formed by the SEPT2, SEPT6 and SEPT7 proteins along with constructs lacking combinations of the C-terminal domains in an attempt to delimit the region of interaction. Polymerization assays were carried out *in vitro* in both low and high ionic strength buffer and the sample was adsorbed onto negatively discharged copper grids covered by an ultrathin carbon film. The images were obtained by negative stain transmission electron microscopy. Pull-down assays, thermal denaturation monitored by circular dichroism and SEC-MALS were used to characterize the region of interaction in solution and, from these data, three-dimensional models were generated using the artificial intelligence program AlphaFold2_advanced from DeepMind. The polymerization experiments demonstrated that the BD3 region of Borg3 is capable of inducing polymerization in both ionic strength conditions only for the wild-type hexameric complex. The region of interaction was determined by pull-down assays using different protein constructs, and it was concluded that the interaction is established by the C-terminal domains of the SEPT6-SEPT7 heterodimer and the BD3 motif, forming a ternary species with a significantly greater thermal stability. Three-dimensional models showed that the BD3 region fits into a central cavity of the SEPT6C-SEPT7C heterodimeric coiled-coil. Validation of the model using SEPT6^{E354L} and SEPT7^{K368R} mutants showed that the interaction is specific and occurs on only one side of the coiled-coil surface.

Keywords: septins, filaments, BORGs, polymerization, coiled-coil.