

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ADRIANO DE FREITAS FERNANDES

Estudos biofísicos e estruturais das septinas de *Drosophila melanogaster*

São Carlos

2023

ADRIANO DE FREITAS FERNANDES

Estudos biofísicos e estruturais das septinas de *Drosophila melanogaster*

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

2023

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.

Fernandes, Adriano de Freitas

Estudos biofísicos e estruturais das septinas de *Drosophila melanogaster* / Adriano de Freitas Fernandes; orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

177 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Filamentos oligoméricos. 2. Modelagem computacional. 3. Difração de raios-X. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

A Deus, minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo ter permitido.

Minha família pelo apoio em todos os momentos: Dona Cida (minha mãe), André, Ana, Elder, Luana, Samuel, Denise, Vilson, Eduarda, Sr. Ranulpho e todos os demais.

À minha noiva, Giovana.

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pela orientação, conselhos, discussões, paciência, ajuda para a realização deste projeto e pela confiança em mim depositada.

Ao B-2 e a Jéssica por tantos anos de amizade e parceria, sofrimentos e alegrias desde os primeiros passos no laboratório e pela companhia até a conclusão deste trabalho. Em especial à Rê pela amizade e pelos diversos almoços.

Aos colegas de laboratório: Ítalo, Diego, Higor, Jhon, Rafael, Deborah, Daniela, Fernanda, Jakeline, Eloy, Gabriel, Everton, Leonardo, Maminha e tantos outros!

Aos técnicos de laboratório do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas” que em muito me ajudaram: Susana, Bel, Andressa, Fernando e Humberto.

Aos professores Fernando Bachega e Mário de Oliveira Neto pelas conversas e diversas contribuições.

Em especial, ao Prof. Alessandro Silva Nascimento pela enorme contribuição com as análises computacionais!!!

Aos demais professores do IFSC: Profa. Ana Paula Araújo, Prof. João Renato e Prof. Otavio Thiemann.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela infraestrutura oferecida para os experimentos de SAXS e toda a infraestrutura disponibilizada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pelas instalações e contribuição para a formação.

À CNPq pelo apoio financeiro fornecido (140739/2017-3).

*“Se te oferecerem um assento em um foguete não pergunte qual é o assento,
apenas embarque”*

Sheryl Sandberg, COO Facebook

RESUMO

FERNANDES, A. F. **Estudos biofísicos e estruturais das septinas de *Drosophila melanogaster***. 2023. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

As septinas são proteínas conhecidas originalmente por atuarem na formação do septo durante brotamento em *Saccharomyces cerevisiae*. Foram descritos em fungos e animais, e ausentes em plantas e bactéria. Apresentam como principais características um domínio conservado de ligação aos nucleotídeos de guanina (GTP/GDP) e a formação de filamentos oligoméricos, que são estruturas altamente organizadas. Para os estudos de septinas deste trabalho foi escolhido como organismo modelo *Drosophila melanogaster*, ou mosca-da-fruta, um organismo modelo representante da classe dos insetos. Esta espécie possui cinco genes codificantes às septinas Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 e Pnut e filamentos se formam a partir da polimerização de hexâmeros lineares, sendo que o mais bem caracterizado tem a seguinte organização Sep1-Sep2-Pnut-Pnut-Sep2-Sep1. Apesar do conhecimento dos genes relativos às septinas de *Drosophila melanogaster*, ainda há carência de informações estruturais que permitiriam compreender a montagem do hexâmero da forma correta. Neste estudo foram investigados parâmetros biofísicos e estruturais destas septinas em solução, bem como avaliada a formação de complexos diméricos e o hexâmero formado por um representante de cada grupo. Foi determinada a estrutura do heterodímero Sep1(G).Sep2(G) por difração de raios-X com resolução de 2,4 Å, sendo este o primeiro resultado experimental com informações estruturais para septinas desta espécie. Além disto, foram realizadas modelagens computacionais por homologia, dinâmica molecular e experimentos de *Adaptive Steered Molecular Dynamics* (ASMD) a fim de investigar os aminoácidos fundamentais para estabilizar as interações entre subunidades essenciais para a polimerização e por consequência, suas funções celulares. Mutagênese sítio-dirigida foi usada para testar hipóteses que surgiram a partir da modelagem e serviu para demonstrar uma diferença estrutural importante na interface central do hexâmero quando comparado com o complexo humano equivalente.

Palavras-chave: Filamentos oligoméricos. Modelagem computacional. Difração de raios-X.

ABSTRACT

FERNANDES, A. F. **Biophysical and structural studies of *Drosophila melanogaster* septins.** 2023. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Septins are proteins originally known to act in septum formation during budding in *Saccharomyces cerevisiae*. They have been described in fungi and animals, and absent in plants and bacteria. Their main characteristics are a conserved guanine nucleotide binding domain (GTP/GDP) and the formation of oligomeric filaments, which are highly organized structures. For the septins of interest in the present study, *Drosophila melanogaster*, or fruit fly, a model organism representing the insect class, was chosen as the model organism. This species has five genes encoding septins Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 and Pnut and filaments are formed from the polymerization of linear hexamers, the best characterized having the following organization Sep1-Sep2-Pnut-Pnut-Sep2-Sep1. Despite the knowledge of the genes related to *Drosophila melanogaster* septins, there is still a lack of structural information that would allow us to understand the hexamer assembly correctly. In this study, biophysical and structural parameters of these septins in solution were investigated, as well as the formation of dimeric complexes and the hexamer formed by a representative of each group. The structure of the Sep1(G).Sep2(G) heterodimer was determined by X-ray diffraction with a resolution of 2.4 Å, which is the first experimental result with structural information for septins of this species. Furthermore, computational modeling by homology, molecular dynamics and *Adaptive Steered Molecular Dynamics* (ASMD) experiments were carried out in order to investigate important amino acid residues which stabilize the interactions between subunits for polymerization and, consequently, their cellular functions. Site-directed mutagenesis was used to test hypotheses that emerged from the modeling and served to demonstrate an important structural difference at the central hexamer interface when compared to the equivalent human complex.

Keywords: Oligomeric filaments. Computer modeling. X-ray diffraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Identificação de filamentos de septinas, através de microscopia de fluorescência, durante o processo de divisão celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 2 -	Localização das septinas nos processos celulares.	27
Figura 3 -	Diagrama das estruturas secundárias dos domínios G.	28
Figura 4 -	Esquema simplificado da organização proteica das septinas, com destaque para a região polibásica, domínio de ligação a GTP (com os motivos G1, G3 e G4), o elemento único de septina (Septin Unique Element - SUE) e a região prevista como <i>coiled-coil</i> (não necessariamente presente em todas as septinas)	29
Figura 5 -	Classificação das septinas humanas no Grupo I (SEPT3, SEPT9, SEPT12), característico pelo C-terminal curto, Grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14), caracterizada pela ausência de atividade catalítica, Grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5) com N-terminal de tamanho variável e Grupo IV (SEPT7)	30
Figura 6 -	Classificação das septinas de <i>D. melanogaster</i> . Verifica-se a presença do Grupos II (Sep2 e Sep5), Grupo III (Sep1 e Sep4) e Grupo IV (Pnut), porém não é possível observar a presença de septinas do Grupo I	31
Figura 7 -	Alinhamento entre septinas <i>H. sapiens</i> e <i>D. melanogaster</i> separadas em grupos.....	33
Figura 8 -	Análise 2D de partículas únicas de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo para os complexos.....	35
Figura 9 -	Unidade básica do heterocomplexo de septinas humanas mais bem caracterizado atualmente.....	37
Figura 10 -	Enovelamento do domínio G de uma septina. Na estrutura os elementos de estrutura secundária são representados como hélices e fitas	38
Figura 11 -	Interações específicas que estabiliza a interface G e interface NC de septinas.....	40
Figura 12 -	Sequência de aminoácidos das proteínas de <i>D. melanogaster</i> classificadas pelos domínios N-terminal, GTPase e C-terminal	48
Figura 13 -	Princípio de simulação por ASMD	63
Figura 14 -	Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% resultante da purificação das septinas de <i>D. melanogaster</i>	69
Figura 15 -	Análise da purificação das proteínas por meio de cromatografia de exclusão molecular em 280 nm.....	70
Figura 16 -	Purificação do complexo hexamérico de <i>Drosophila melanogaster</i> Sep1(NGC).Sep2(NGC).Pnut(NGC).Pnut(NGC).Sep2(NGC).Sep1(NGC)	71

Figura 17 -	Análise da purificação das combinações heterodímeros do Grupo II, Grupo III e Pnut _{mut}	72
Figura 18 -	Cromatogramas obtidos por SEC-MALS para as construções contendo o domínio GTPase de <i>Drosophila melanogaster</i>	74
Figura 19 -	Curva de desnaturação obtida por CD através de variação térmica para as formas monoméricas NGC e G	77
Figura 20 -	Curva de desnaturação obtida por CD através de variação térmica	79
Figura 21 -	Comparação dos diferentes T _M 's.....	81
Figura 22 -	Verificação do conteúdo de nucleotídeo co-purificado.....	82
Figura 23 -	Alinhamento entre representantes dos subgrupos SEPT2, SEPT6 e SEPT7 das septinas humanas com as septinas de <i>Drosophila</i> , separadas por grupos	84
Figura 24 -	Medidas de SAXS.	86
Figura 25 -	Predição de cristalização para as septinas individuais de <i>D. melanogaster</i> realizada pelo XtalPred Server.	91
Figura 26 -	Cristais de septinas de <i>Drosophila melanogaster</i>	93
Figura 27 -	Gráfico de parâmetros gerais referente a qualidade da estrutura cristalográfica de Sep1(G).Sep2(G) (PDB ID: 8DKT)	95
Figura 28 -	Estrutura cristalográfica de Sep1(G).Sep2(G).....	96
Figura 29 -	Comparativo das regiões de switch I, P-loop e switch II das septinas humanas (SEPT2 e SEPT11) e de drosófila (Sep1(G) e Sep2(G)).....	97
Figura 30 -	Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G entre Sep1.Sep2 e SEPT2.SEPT11.....	100
Figura 31 -	Alinhamento realizado para Sep1(G).Sep2(G) entre a estrutura cristalográfica (em cinza) e estrutura predita por AlphaFold (em vermelho para Sep1(G) e azul para Sep2(G))	102
Figura 32 -	Redes de interação envolvendo resíduos característicos dos grupos na interface G da estrutura predita de Sep1(G).Sep2(G).....	103
Figura 33 -	Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G entre os grupos II e III. Comparação entre Sep1.Sep5, Sep4.Sep2 e Sep4.Sep5.....	105
Figura 34 -	Redes de interação envolvendo resíduos característicos dos grupos na interface G de heterodímeros do Grupo II e Grupo III de <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Figura 35 -	Comparação entre os bolsões hidrofóbicos formados no <i>trans-loop1</i> de Sep2 e Sep5	108
Figura 36 -	Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G para o Grupo IV.....	112
Figura 37 -	Fatores que influenciam na estabilidade de Pnut e SEPT7	113
Figura 38 -	Análise ASMD em SEPT7	116

Figura 39 -	Cálculo da energia de interação em homodímeros ao longo do tempo de simulação	118
Figura 40 -	Análise ASMD em SEPT7, SEPT7mut, Pnut e Pnut _{mut}	119
Figura 41 -	Evolução temporal das análises de ASMD para SEPT7(G), Pnut(G) e mutantes	120
Figura 42 -	Alinhamento das sequências N-terminais para os grupos II, III e IV de septinas humanas e de drosófila.....	126
Figura 43 -	Monitoramento da flexibilidade de hexâmeros.....	128
Figura 44 -	Projeção da primeira componente (PC1) sobre a estrutura do hexâmero de septinas humanas.....	130
Figura 45 -	Projeção da segunda componente (PC2) sobre a estrutura do hexâmero humano.....	131
Figura 46 -	Esquema de como o hexâmero pode ficar contra uma membrana curva com base na dobra lateral preferida da partícula.....	132
Figura 47 -	Energias potenciais de interação em função do tempo para uma trajetória de dinâmica molecular monitorando cada par de interface do hexâmero de septinas humano composto por SEPT2, SEPT6 e SEPT7	134
Figura 48 -	Energias potenciais de interação em função do tempo para uma trajetória de dinâmica molecular monitorando cada par de interface do hexâmero de septinas de drosófila composto por Sep1, Sep2 e Pnut	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Exemplos de septinas em diferentes organismos	26
Tabela 2 -	Propriedades das proteínas estudadas neste trabalho de doutorado	45
Tabela 3 -	Propriedades dos heterodímeros estudados	49
Tabela 4 -	Massa molecular teórica e calculada pelo SEC-MALS para as diversas amostras de septinas	75
Tabela 5 -	Temperatura de <i>melting</i> comparativa entre os as proteínas individuais de drosófila.	78
Tabela 6 -	Temperatura de <i>melting</i> comparativa entre os heterodímeros de drosófilas e alguns dímeros de humanos.....	80
Tabela 7 -	Parâmetros estruturais obtidos para as análises de SAXS.....	85
Tabela 8 -	Condições de cristalização para dímeros de septinas de <i>D. melanogaster</i>	92
Tabela 9 -	Parâmetros cristalográficos referentes à obtenção da estrutura de Sep1(G).Sep2(G).....	94
Tabela 10 -	Análise de PISA para os modelos de dímeros de septinas do Grupo II e Grupo III de <i>D. melanogaster</i> obtidos por <i>AlphaFold</i>	104
Tabela 11 -	Análise de PISA para os modelos de dímeros de septinas canônicas e mutantes do Grupo IV de <i>D. melanogaster</i> e <i>H. sapiens</i> obtidos por MODELLER.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ASMD	Dinâmica Molecular Direcionada Adaptativa
CD	Dicroísmo Circular
CDC	<i>Cell Division Cycle</i>
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DM	Dinâmica Molecular
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GEF	<i>Guanine-Exchange Factors</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
HMR	<i>Hydrogen Mass Repartitioning</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Broth
NS-EM	Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo
NVT	Ensemble de temperatura e volume constantes
NPT	Ensemble de temperatura e pressão constantes
MS	Espectrometria de Massa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PISA	<i>Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies</i>
PMF	Potencial de Força Média
SAXS	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo
SEC	Cromatografia por Exclusão Molecular
SEC-MALS	<i>Size Exclusion Chromatography - Multi Angle Light Scattering</i>
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de Sódio de Poliacrilamida
SMD	Dinâmica Molecular Direcionada
SUE	<i>Septin Unique Element</i>
T _M	Temperatura de <i>melting</i>
VT	Variação Térmica

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução e Objetivos	23
1 INTRODUÇÃO ÀS SEPTINAS.....	25
1.1 SEPTINAS: FUNÇÃO	26
1.2 SEPTINAS: ESTRUTURA	27
1.3 SEPTINAS HUMANAS.....	30
1.4 SEPTINAS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	30
1.5 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE SEPTINAS.....	36
1.6 JUSTIFICATIVA.....	40
1.7 OBJETIVOS	41
1.7.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	41
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
Capítulo 2: Fundamentos Teóricos e Metodologia	43
2.1 BIOLOGIA MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS.....	45
2.1.1 ESTUDOS DE PROTEÍNAS INDIVIDUAIS E SEUS DOMÍNIOS G.....	45
2.1.2 ESTUDOS DE COMPLEXOS PROTEÍCOS.....	48
2.1.3 OBTENÇÃO DE PNUT.MUTANTE.....	49
2.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR ACOPLADA AO ESPALHAMENTO DE LUZ A MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS)	50
2.3 ANÁLISE DO ENOVELAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA COM ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	51
2.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE NUCLEOTÍDEOS	52
2.5 ENSAIOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	53
2.7 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO, COLETA DE DADOS E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA.....	54
Capítulo 3: Caracterização Biofísica	67
3.1 OBTENÇÃO DAS SEPTINAS DE <i>D. melanogaster</i>	69
3.2 INVESTIGAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO EM SOLUÇÃO POR MEIO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR ACOPLADA AO ESPALHAMENTO DE LUZ A MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS)	73
3.3. ANÁLISE DO ENOVELAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA POR ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	76
3.5. ENSAIOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	85
Capítulo 4: Caracterização Estrutural Interface G - Grupo II e Grupo III	89
4.1 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE Sep1(G).Sep2(G)	91
4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE Sep1(G).Sep2(G) COM SEPT2-SEPT11 HUMANA	96
4.3 COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE Sep1(G).Sep2(G) COM SUA ESTRUTURA PREDITA POR <i>ALPHAFOLD</i>	101

4.4 ANÁLISE DOS DEMAIS HETERODÍMEROS DO GRUPO II E GRUPO III DE <i>D. melanogaster</i>	103
Capítulo 5: Caracterização Estrutural Interface G - Grupo IV	109
5.1 ESTABILIDADE DA INTERFACE G DE Pnut.Pnut E SEPT7.SEPT7	111
5.2 ANÁLISES DE DINÂMICA MOLECULAR DIRECIONADA ADAPTATIVA (ASMD)	115
Capítulo 6: Estudo da flexibilidade e energias de formação de oligômeros de septinas	123
6.1 ESTUDOS DA FLEXIBILIDADE DOS OLIGÔMEROS DE SEPTINAS	125
6.2 ANÁLISE DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DO HEXÂMERO DE SEPTINAS HUMANAS	133
6.3 ANÁLISE DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DO HEXÂMERO DE SEPTINAS DE <i>D. melanogaster</i>	136
Capítulo 7: Considerações Finais e Perspectivas	139
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	141
REFERÊNCIAS	143
ANEXO A – Sequência de nucleotídeos das proteínas de <i>Drosophila Melanogaster</i>	157
ANEXO B – Exemplo de script utilizado para a modelagem utilizando o MODELLER.	161
APÊNDICE – Artigos científicos publicados pelo aluno durante o período de doutorado.	163

Capítulo 1
Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO ÀS SEPTINAS

Em 1971, Leland H. Hartwell identificou quatro genes fundamentais para a conclusão do ciclo de replicação celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, denominando-os por *ScCDC3*, *ScCDC10*, *ScCDC11* e *ScCDC12* devido ao fato destes genes estarem envolvidos no ciclo de divisão celular (*Cell Division Cycle*). (1-2) Posteriormente, constatou-se que mutações nestes genes impedem a formação de estruturas filamentosas responsáveis pela separação da célula-mãe da célula-filha. (3) Estes genes foram identificados indiretamente por microscopia de fluorescência, como sendo diretamente relacionados à formação destas estruturas filamentosas formadas no septo entre as células mãe e filha (4), como observado na Figura 1. Devido a esta função na participação de formação do septo celular, que foi a primeira função associada com estas proteínas, elas passaram a ser identificadas como septinas. (5)

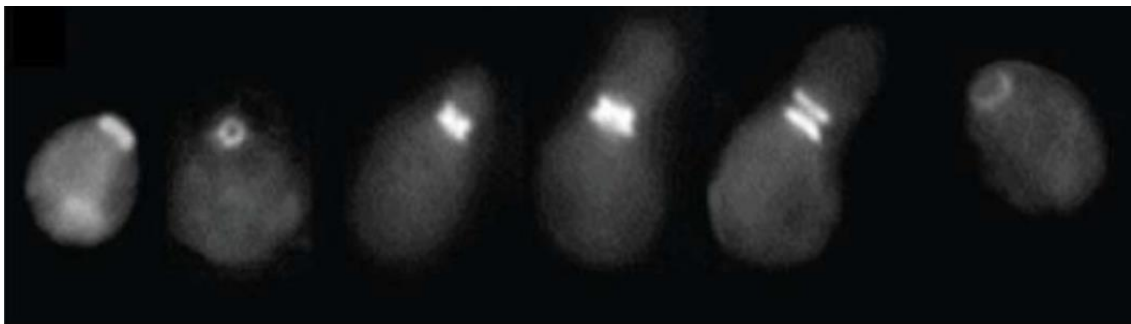


Figura 1 - Identificação de filamentos de septinas, através de microscopia de fluorescência, durante o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: Adaptada de GLADFELTER *et al.*(4)

Verificou-se mais tarde a presença de septinas em outros organismos, particularmente eucariotos, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tais como fungos (eg. *Candida albicans* (6)), platelmintos (eg. *Schistosoma mansoni* (7)), artrópodes (eg. *Drosophila melanogaster* (8)) e mamíferos. (6) Entretanto, ainda não foi relatada nenhuma anotação genômica de septinas em plantas. (9)

O número de genes de septinas pode variar bastante entre as espécies, sendo único em *Chlamydomonas reinhardtii* (9-10) e 13 em humanos (11), como pode ser observado na Tabela

1. Além dos genes já descritos, é possível verificar que o número de produtos proteicos pode ser ainda maior, devido às isoformas promovidas por *splicing* alternativo. (12)

Tabela 1 - Exemplos de septinas em diferentes organismos.

Organismo	Septinas	Total
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SEPI	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CDC3; CDC10; CDC11 ; CDC12; Shs1; Shs3; Spr28	7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spn1; Spn2; Spn3; Spn4; Spn5; Spn6; Spn7	7
<i>Candida albicans</i>	Cdc3; Cdc10; Cdc11; Cdc12; Shs7; Spr3; Spr28	7
<i>Eremothecium gossypii</i>	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6; Hyp7	7
<i>Aspergillus nidulans</i>	ASPA; ASPB; ASPC; ASPD; ASPE	5
<i>Neurospora crassa</i>	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6	6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	UNC-61; UNC-59	2
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sep1 ; Sep2 ; Sep4; Sep5; Pnut	5
<i>Xenopus laevis</i>	Hyp1; SEPT2	2
<i>Schistosoma mansoni</i>	SEPT5; SEPT7.1; SEPT7.2; SEPT10	4
Mamíferos*	SEPT1; SEPT2 ; SEPT3 ; SEPT4; SEPT5; SEPT6 ; SEPT7 ; SEPT8 ; SEPT9 ; SEPT10; SEPT11 ; SEPT12 ; SEPT14	13

* Em mamíferos estão incluídos os organismos *Homo sapiens*, *Mus musculus* (SEPT10a e SEPT10b) e *Rattus norvegicus* (SEPT10a e SEPT10b, (-) SEPT14). Destaque em negrito para proteínas que possuem informações estrutural já conhecidas, em especial para Sep1 e Sep2, as quais foram determinadas neste presente trabalho.

Fonte: Adaptada de WEIRICH *et al.* (13)

1.1 SEPTINAS: FUNÇÃO

Apesar das septinas terem sido relacionadas primeiramente com o processo de citocinese, sabe-se atualmente que elas participam de diversos processos celulares, como a manutenção da estrutura da célula (formando filamentos, anéis, redes e barreiras de difusão em membranas), determinação da polaridade celular, espermatogênese, exocitose, ciliogênese, fagocitose, tráfego de vesículas, motilidade, formação de gaiolas e apoptose (Figura 2). (13-21) Devido a sua diversidade funcional, e principalmente a sua associação com componentes

proteicos do citoesqueleto, as septinas são consideradas o quarto componente do citoesqueleto junto com os microtúbulos, filamentos de actina e filamento intermediário. (21)

Além disso, devido ao fato das septinas formarem filamentos e interagirem com proteínas associadas a membranas, microfilamentos e microtúbulos, tem-se que as mesmas ainda podem atuar como barreiras de difusão e plataformas (*scaffolds*) de interação com outras biomoléculas. (21) Devido ao seu papel em processos celulares importantes, não é de se surpreender de que mutações em septinas ou expressão ectópica foram associados a diversas doenças humanas tais como Doença de *Alzheimer*, Síndrome de *Down*, Doença de *Parkinson* e tumores. (22-25)

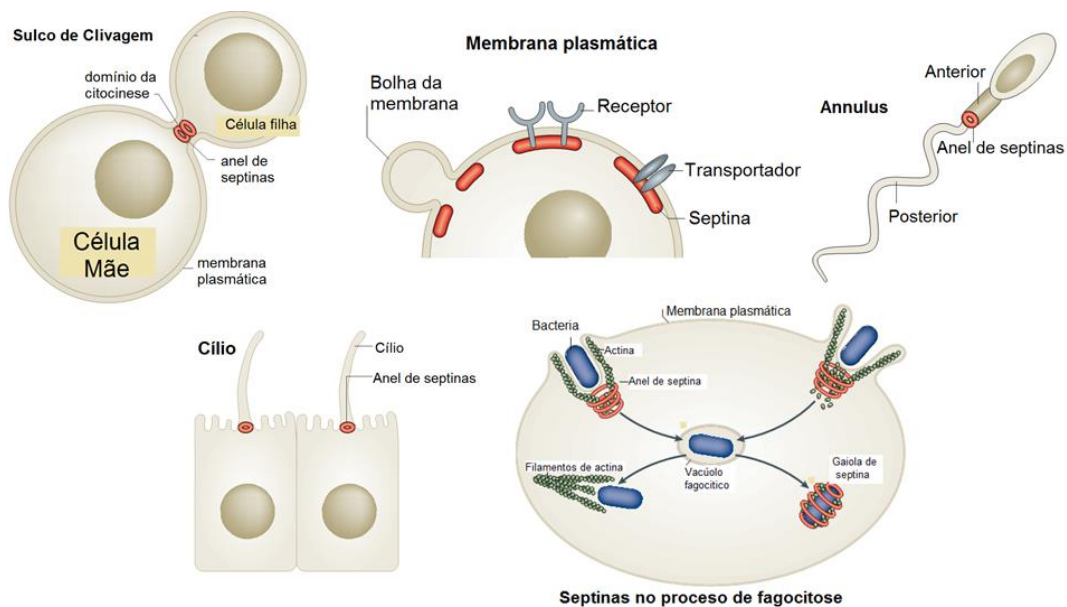


Figura 2 - Localização das septinas nos processos celulares.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY; COSSART. (21)

1.2 SEPTINAS: ESTRUTURA

As septinas geralmente possuem a capacidade de se ligar a nucleotídeos de guanina (GTP ou GDP), sendo que algumas possuem a capacidade de hidrolisar o GTP. São proteínas que apresentam uma massa molecular entre 30 a 65 kDa e são pertencentes à superclasse das *P-loop* GTPases, que pode ser exemplificada pela superfamília das pequenas GTPases - Ras de ligação a GTP, cuja estrutura é formada por seis fitas- β e cinco hélices- α como visto na (Figura 3). (6)

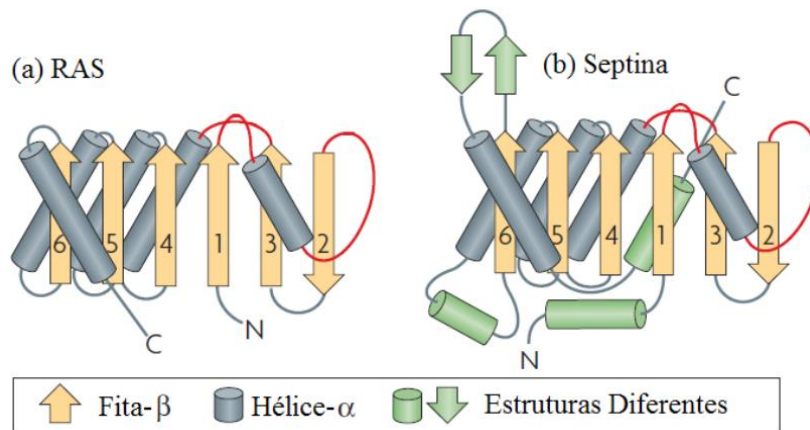


Figura 3 - Diagrama das estruturas secundárias dos domínios G. A) Ras pequenas GTPases e (B) septinas, ressaltando a conservação das estruturas de hélices- α e fitas- β (evidenciados em cinza e laranja, respectivamente), as alças características da superclasse P-1.

Fonte: Adaptada de WEIRICH *et al.* (6)

A superfamília Ras é composta por proteínas que possuem a capacidade de hidrolisar e trocar nucleotídeos de guanina em taxas moderadas. Por consequência disto, verifica-se a existência de dois estados relativamente estáveis *in vivo*, sendo que a proteína pode estar ligada ao GTP (forma ativa) ou ao GDP (forma inativa). Desta forma, a regulação da atividade enzimática destas proteínas pode ser mediada através da ação de fatores de troca de GTPs (GEF, *Guanine-Exchange Factors*) e de ativação GTPásica (GAPs, *GTPase activator proteins*).

Apesar de serem bem descritas as proteínas pertencentes à família Ras, ainda pouco se sabe sobre o mecanismo de regulação e importância da atividade GTPásica em septinas. (6) Observou-se que o tipo de nucleotídeo pode influenciar na interação das septinas com fosfolipídios de membrana (26), com outras proteínas (27) e até com elas próprias durante o processo de construção de um filamento. (28-30) Entretanto, ainda há uma grande escassez de conhecimento sobre o total mecanismo de atividade GTPásica em septinas.

Septinas apresentam três domínios estruturais característicos: domínio N-terminal variável, um domínio de ligação ao nucleotídeo (GTP/GDP) e um domínio C-terminal variável com uma região predita para estruturação em *coiled-coil* (Figura 4). (31)

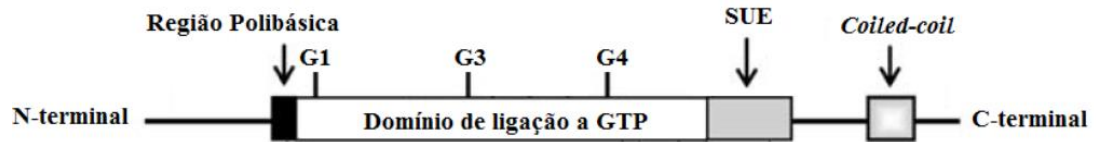


Figura 4 - Esquema simplificado da organização proteica das septinas, com destaque para a região polibásica, domínio de ligação a GTP (com os motivos G1, G3 e G4), o elemento único de septina (*Septin Unique Element* - SUE) e a região prevista como *coiled-coil* (não necessariamente presente em todas as septinas).

Fonte: Adaptada de HALL *et al.*(32)

O domínio N-terminal das septinas possui uma região polibásica que é nomeada como hélice-alfa zero ($\alpha 0$), presente na porção extrema do domínio, próximo ao domínio GTPase. É proposto que esta hélice seja capaz de interagir com membranas celulares. (26) O restante do domínio N-terminal é previsto por ser inteiramente desestruturado. (26,33)

O domínio localizado na região central das septinas, domínio de ligação ao nucleotídeo (ou domínio G) é altamente conservado, apresentando no mínimo 75% de similaridade entre septinas da mesma espécie. (31) Este domínio possui uma região específica que difere as septinas de outras GTPases, a região *Septin Unique Element* (SUE), sendo este elemento encontrado exclusivamente em septinas. O propósito da hidrólise de GTP no contexto celular ainda não é totalmente elucidado, seja para a polimerização em heterocomplexos ou para a participação nos mais diversos processos biológicos. Entretanto, estudos realizados com mutantes em septinas que não fossem capazes de ligar ao GTP, apresentaram formação, aparência e localização celular e/ou funções alteradas. (30,34-35)

Já o domínio C-terminal apresenta uma região predita para a formação de *coiled-coils*. Neste motivo há a presença de duas ou mais hélices anfipáticas que se enrolam entre si ao redor de um centro hidrofóbico, podendo ser paralelas ou antiparalelas. Em leveduras (*S. cerevisiae*), verificou-se que o domínio C-terminal é requerido para a interação entre CDC3 e CDC12. (36) Outro dado importante é que a porção C-terminal de septinas atua na estabilização dos filamentos para a interação de filamentos adjacentes de septinas permitindo a formação de estruturas de maior complexidade (redes, anéis). (37) Já estudos com septinas humanas sugerem que *coiled-coils* paralelos entre SEPT6 e SEPT7 estabilizam a formação do filamento enquanto que *coiled-coils* antiparalelos em SEPT4 são responsáveis pela interação entre filamentos adjacentes. (38-40)

1.3 SEPTINAS HUMANAS

Em humanos, há um total de 13 septinas as quais foram divididas e classificadas em 4 grupos baseados na similaridade de sequências de aminoácidos (Figura 5). (31,41) Estes grupos possuem características específicas, como o tamanho do domínio C-terminal (que é curto no Grupo I) ou devido à atividade catalítica (ausência no Grupo II).

Desta forma, classifica-se no Grupo I as SEPT3, SEPT9 e SEPT12, que apresentam um domínio C-terminal curto (sem apresentar uma sequência característica de *coiled-coils*). No Grupo II estão SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14, sendo que estas proteínas são preditas por não possuir atividade catalítica. (42) Já no Grupo III estão presentes SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5, sendo estas proteínas capazes de realizar a hidrólise do GTP (junto com grupos I e IV). Separadamente, está SEPT7 classificada no Grupo IV (Figura 5). (42,43)

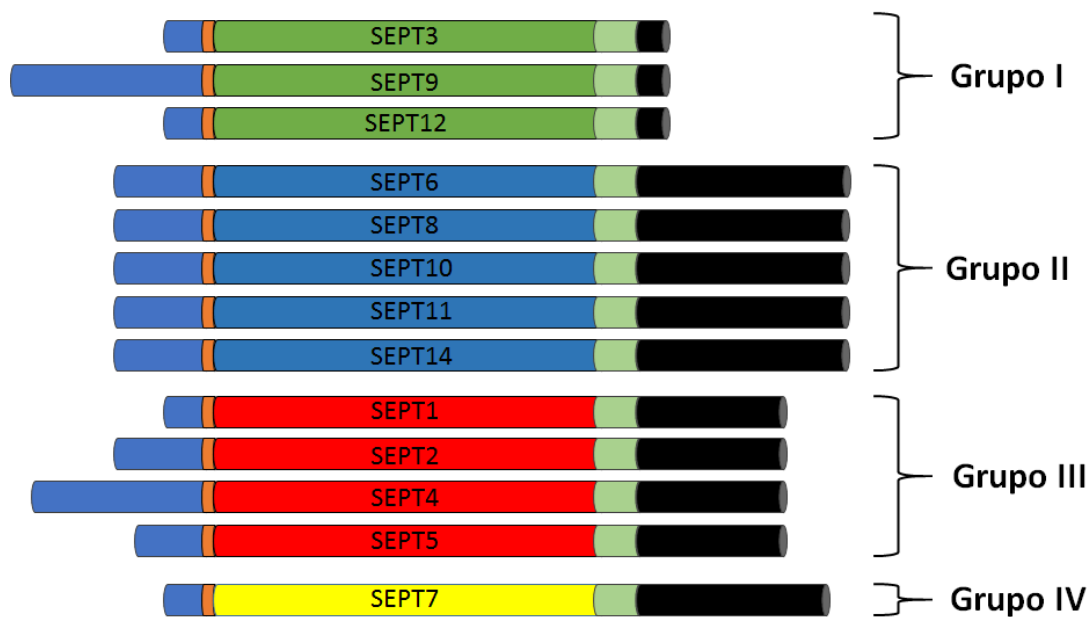


Figura 5 - Classificação das septinas humanas no Grupo I (SEPT3, SEPT9, SEPT12), característico pelo C-terminal curto, Grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14), caracterizada pela ausência de atividade catalítica, Grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5) com N-terminal de tamanho variável e Grupo IV (SEPT7).

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4 SEPTINAS DE *Drosophila melanogaster*

A mosca-da-fruta, ou *Drosophila melanogaster* é um organismo modelo versátil que tem sido usado em pesquisas biomédicas e de ciência básica para se estudar uma ampla gama de fenômenos. (44) Há muitas vantagens técnicas do uso de *D. melanogaster* sobre modelos de

vertebrados; eles são fáceis e baratos de cultivar em condições de laboratório, têm um ciclo de vida relativamente curto, produzem um grande número de embriões depositados externamente e podem ser geneticamente modificados de várias maneiras. (44) Pesquisas usando *D. melanogaster* auxiliaram em avanços importantes em nossa compreensão da biologia regenerativa contribuindo assim para a medicina regenerativa, bem como para as mais diversas áreas do conhecimento e da pesquisa básica. (44)

A *Drosophila melanogaster* possui cinco genes para as septinas: Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 e Pnut. Estas proteínas podem ser classificadas em três diferentes grupos, baseado na similaridade da sequência de aminoácidos comparado com as septinas humanas. As Sep1 e Sep4 são pertencentes ao Grupo III, as Sep2 e Sep5 estão classificadas no Grupo II, enquanto a Pnut está no Grupo IV (Figura 6).

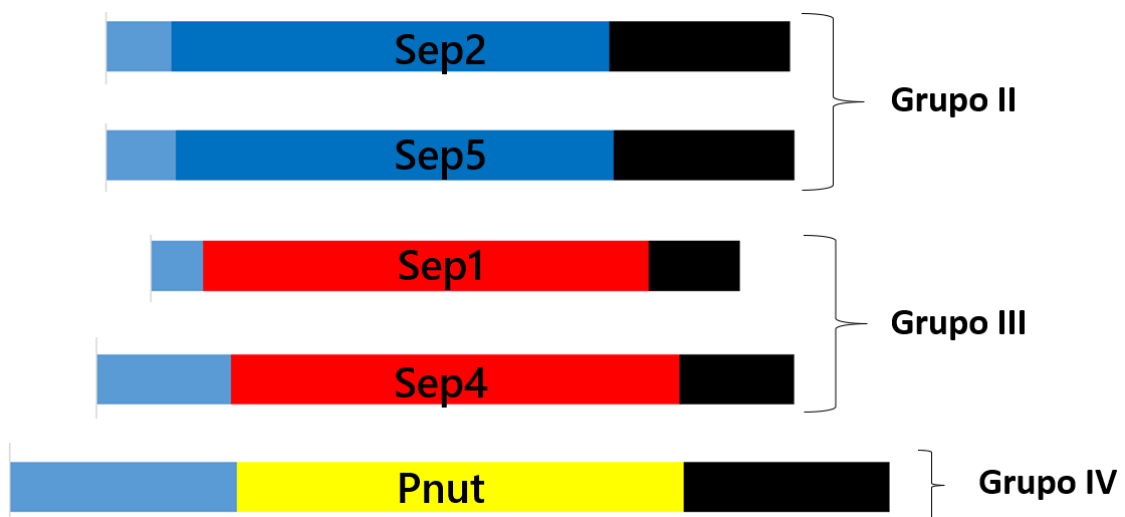


Figura 6 - Classificação das septinas de *D. melanogaster*. Verifica-se a presença do Grupos II (Sep2 e Sep5), Grupo III (Sep1 e Sep4) e Grupo IV (Pnut), porém não é possível observar a presença de septinas do Grupo I. Destaque para o tamanho equivalente do domínio N-terminal (azul) e C-terminal (preto).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora as septinas possuam diferentes números de representantes em diferentes espécies com tamanhos das regiões N-terminal e C-terminal bastante variáveis, o domínio GTP-ase é bastante conservado. (46) Na Figura 7 a seguir, encontra-se o alinhamento do domínio central catalítico comparando septinas humanas e de *Drosophila melanogaster*. O alinhamento mostra a conservação da sequência de aminoácidos do domínio G entre septinas humanas e de

drosófila, destacando os resíduos característicos dos grupos nas cores vermelha, amarelo, azul e verde. Um resíduo característico é aquele que é conservado apenas em um grupo de septinas e diferente na mesma posição em septinas dos outros grupos (Rosa *et al.* 2020). Por exemplo temos a treonina do *P-loop* característica das septinas do subgrupo SEPT6 (em azul), que nas septinas dos outros grupos é uma serina. Esta treonina é importante para a especificidade de interação entre septinas dos subgrupos SEPT6 e SEPT2 (Rosa *et al.* 2020), o que demonstra a importância dos resíduos característicos na especificidade da montagem do filamento. Este alinhamento será usado para descrever características estruturais em maior detalhe na seção 1.5 e ao longo da discussão desta tese de doutorado.

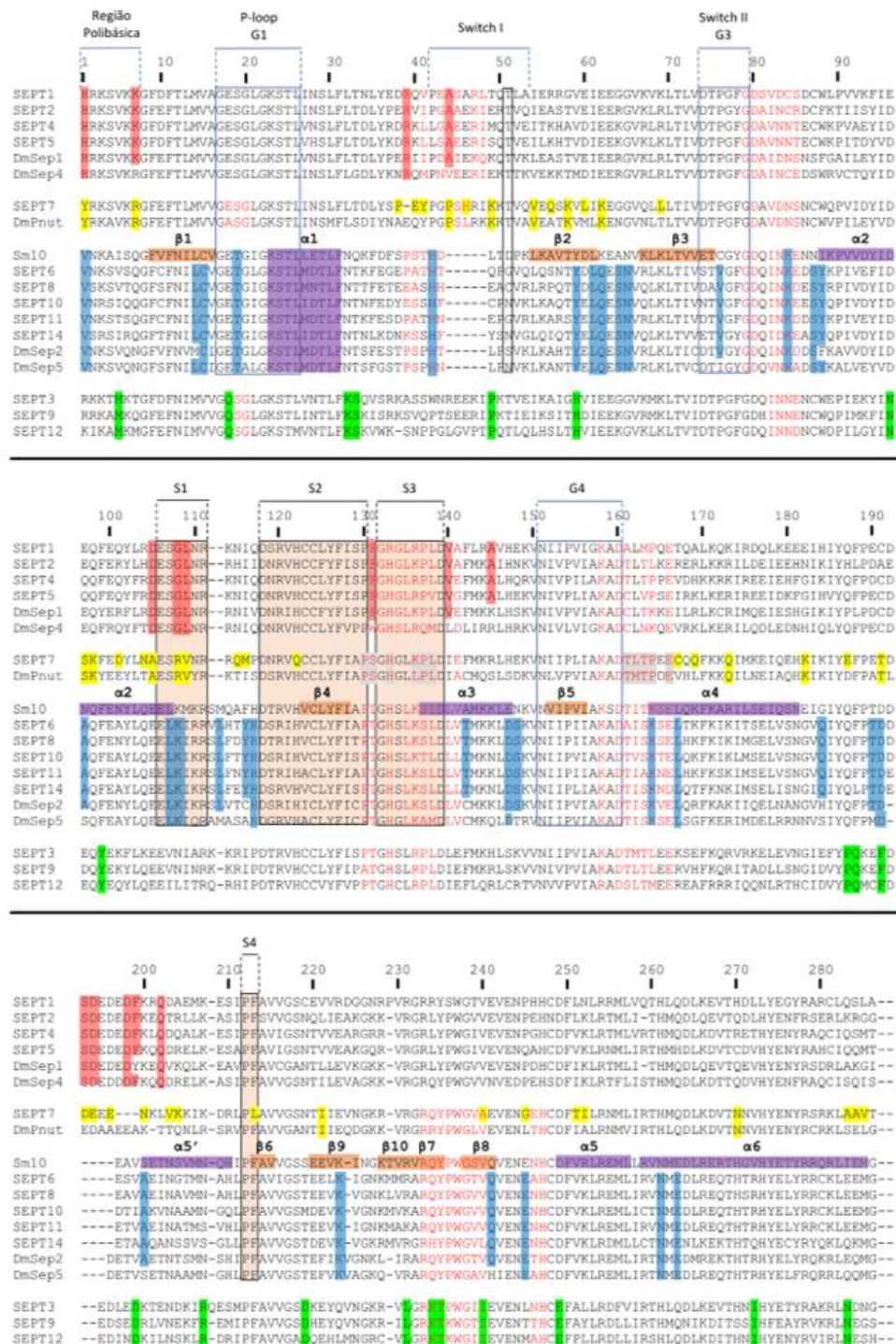


Figura 7 - Alinhamento entre septinas *H. sapiens* e *D. melanogaster* separadas em grupos. Em destaque (em quatro cores diferentes, conforme o grupo: vermelho, amarelo, azul e verde), resíduos característicos para cada grupo de septinas baseado em septinas humanas. Quando o mesmo resíduo é conservado também em septinas de drosófila, é destacado na mesma cor. Septinas de *Drosophila melanogaster* contém Dm no início do nome enquanto humanas não possuem um marcador no nome. Algumas regiões conservadas em pequenas GTPases (*P*-loop, switch I, switch II, motivos G1, G3, G4) e em septinas especificamente (S1-S4) são demonstradas. Fonte: Elaborada pelo autor.

As cinco septinas de *D. melanogaster* se localizam similarmente na oogênese, incluindo anéis que flanqueiam os canais do anel germinativo. (45) Algumas mutações em septinas aumentam o fenótipo mutante da bazuca, um componente chave no estabelecimento da polaridade celular, sugerindo uma ligação entre a função da septina e a polaridade celular. (45-46)

Em *D. melanogaster*, a deleção do gene *pnut* resulta em um fenótipo letal com células multinucleadas por meio do bloqueio da citocinese. (8) A proteína Pnut e Sep1 estão associadas ao anel contrátil das células em divisão (47) em que Pnut, que inicialmente localizava-se no córtex na interfase, desloca-se para o sulco de clivagem durante a anáfase.

Estudos realizados com mutações nas septinas Sep2 e Sep5 demonstraram que as moscas conseguem chegar à fase adulta, porém se tornam inférteis. (48) Já mutações em Pnut levam as moscas à morte, indicando que esta proteína é essencial para a citocinese. (8) Estudos realizados por meio da localização celular da proteína Pnut constataram sua ausência em células do folículo quando há deleção nas Sep2 e Sep5, indicando que os complexos de septina não se formam na ausência destas proteínas. (45)

Pouco se tem descrito sobre a Sep4 de *D. melanogaster*. Em 2012, Sep4 foi usada como modelo de estudo relacionado à doença de *Parkinson*, uma vez que seu ortólogo humano (SEPT4) foi relacionada com esta doença. Desta forma, constatou-se também que a superexpressão de Sep4 no cérebro é tóxica para os neurônios e interage fisicamente com a região *park*, responsável pela Doença de *Parkinson*. (49) Esta pesquisa deixa evidente a importância de *Drosophila melanogaster* como um organismo modelo de estudos em biologia molecular.

A primeira caracterização bioquímica de um complexo de septinas de *D. melanogaster* revelou a existência do complexo hexamérico composto por Pnut, Sep1 e Sep2, com duas cópias de cada produto gênico. Entretanto, o estudo individual destas proteínas *in vitro*, bem como a taxa de formação deste complexo ainda não foi investigada. Este heterocomplexo foi purificado por cromatografia de afinidade por meio do uso de anticorpos, sendo verificado por análises de *Western blot* que este era capaz de se polimerizar em hetero-filamentos. (50)

Alguns dos trabalhos mais importantes sobre septinas de drosófila são os realizados por Mavrikis e colaboradores (28,51). Estes pesquisadores realizaram a purificação das septinas de drosófila e de humanos para isolar os hexâmeros. Estes complexos foram isolados e analisados

por meio de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo (NS-EM) (Figura 8). Além disto, foi verificada a localização celular das septinas por meio da técnica de Microscopia de Fluorescência de Reflexão Interna Total (TIRF). Para isto, 1 mM de actina e 0,1 mM de septinas de *Drosophila* marcadas foram testados em diferentes combinações como descrito por Mavrakis *et al.* (28) Nessas condições, as septinas estão predominantemente presentes como hexâmeros cuja estrutura mais detalhada será descrita no Capítulo 6 desta tese. (28) Estes resultados confirmam a capacidade de interação de septinas com actinas, sendo também participantes da composição do citoesqueleto.

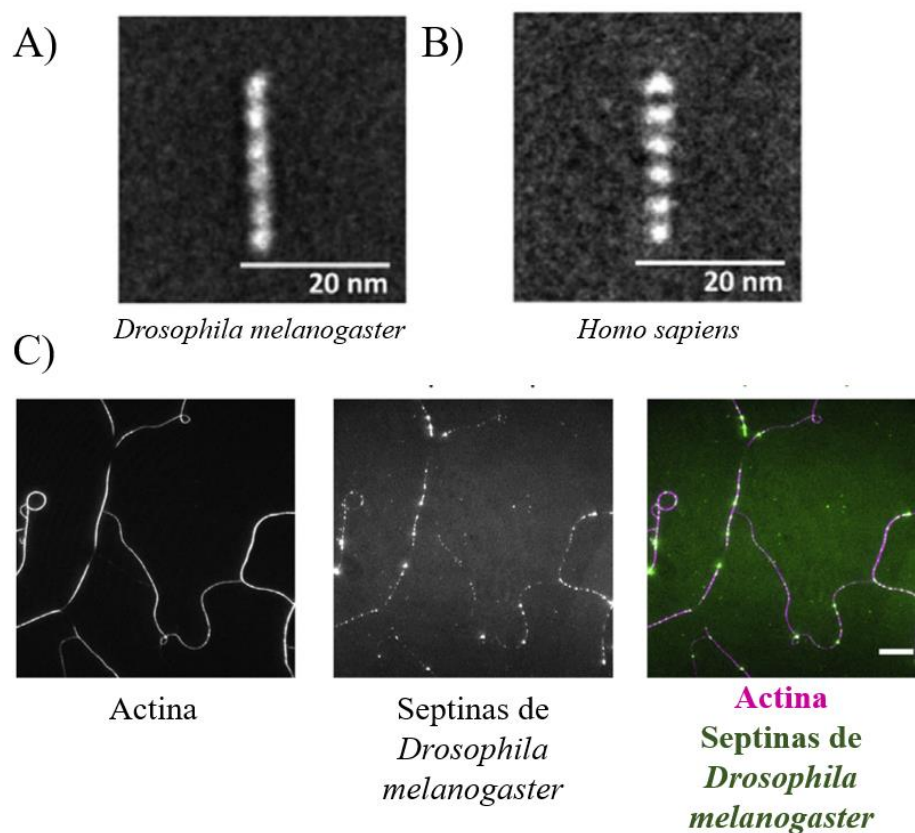


Figura 8 - Análise 2D de partículas únicas de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo para os complexos A) Sep1.Sep2.Pnut.Pnut.Sep2.Sep1 e B) SEPT2.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2. C) Imagens de fluorescência de reflexão interna total da comontagem de actina e septina reconstituída *in vitro*. Marcação realizada com AF594-actina com razão molar de 10% (esquerda), e AF488-*Drosophila* com razão molar de 10% (meio) e a imagem composta (direita) como descrito por Mavrakis *et al.*

Fonte: Adaptada de MAVRAKIS *et al.* (28,51)

1.5 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE SEPTINAS

As septinas realizam suas funções celulares através da polimerização. Esta capacidade de interação é indispensável para suas funções e seu efeito de polimerização foi observado em diversos organismos como leveduras, nematódeos, platelminto, mosca, camundongo e humanos. (52) Em todos os casos, os polímeros são formados a partir de uma unidade básica específica e que se difere para cada organismo: em leveduras a unidade básica é um octâmero, em nematódeos, um tetrâmero, em platelmintos e em mosca, um hexâmero e em humanos pode ser um hexâmero ou octâmero (7,37,53-55) Em eucariotos normalmente é verificado a co-expressão de mais de um gene de septinas, o que permite a formação de heterofilamentos a partir de oligômeros compostos por mais de uma septina. (56)

Os heterofilamentos formados por septinas de leveduras e septinas humanas são os melhores estudados. (37,57) Estes estudos revelaram que a unidade básica de polimerização está formada por três ou quatro septinas diferentes com uma ordem bem específica. Verificou-se também que na formação destes complexos uma septina pode ser substituída por outra, desde que pertença ao mesmo grupo (descrito na seção 1.3). Esta substituição é permitida pela “Regra de Kinoshita”. (13,43) De acordo com esta regra, cada septina analisada individualmente em um complexo, pode ser substituída por qualquer outra septina pertencente ao mesmo grupo de septinas sem que haja grandes alterações na complexação de filamentos. (32) Isto sugere que para a formação do filamento, há uma especificidade de interação por grupos de septinas. (55)

Em 2007, Sirajuddin e colaboradores determinaram pela primeira vez a estrutura de um heterocomplexo hexamérico de septinas humanas. (57) Esta estrutura cristalográfica foi depositada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (58) com resolução de 4 Å, em que era proposto que a ordem das diferentes septinas no hexâmero era SEPT7.SEPT6.SEPT2.SEPT2.SEPT6.SEPT7. (57) Entretanto, estudos posteriores utilizando microscopia eletrônica de transmissão realizados por Mendonça e colaboradores (59) do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas” – IFSC/USP, levaram a uma revisão da ordem das septinas humanas mostrando que a correta é: SEPT2.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2 (Figura 9). Esta ordem foi mais uma vez confirmada por Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-EM), sendo obtida experimentalmente uma estrutura com uma resolução global de ~3,6 Å e uma resolução local entre 3,0 Å a 5,0 Å (PDB ID: 7M6J). A partir destes resultados, foi mais uma vez verificado

que no centro do heterofilamento hexamérico está presente uma interação entre duas subunidades de SEPT7 enquanto SEPT2 está no extremo do hexâmero.

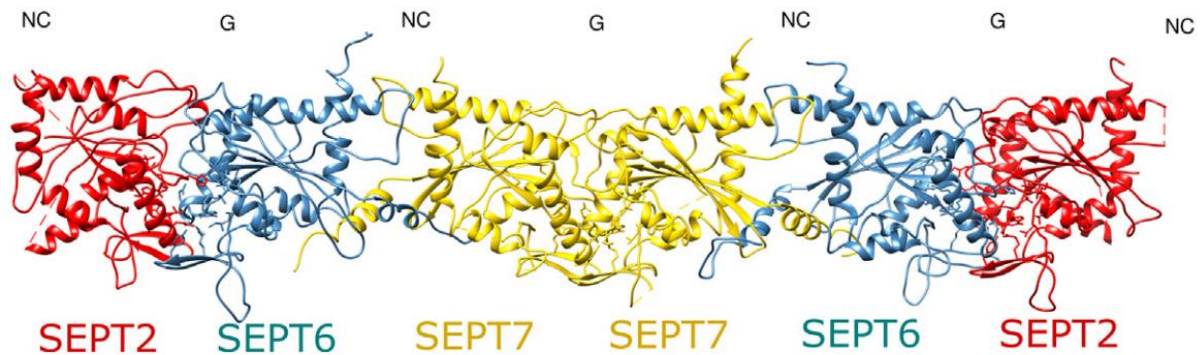


Figura 9 - Unidade básica do heterocomplexo de septinas humanas mais bem caracterizado atualmente. É composto pelas septinas humanas SEPT7 (amarelo), SEPT6 (azul) e SEPT2 (vermelho). É possível observar as interfaces de contato (interface G e interface NC).

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.* (60)

Embora a baixa resolução da estrutura do heterocomplexo resolvido por Sirajuddin e colaboradores em 2007 (57), esta permitiu identificar 4 interfaces de contato que estabilizam o heterofilamento; identificadas também por Mendonça e colaboradores em 2021. (60) Duas das interfaces nomeadas como interface G, formadas pelos domínios de ligação ao nucleotídeo de duas septinas diferentes (heterotípica SEPT2 e SEPT6) ou de duas septinas iguais (homotípica, SEPT7) (Figura 9). A outra interface presente é denominada NC, formadas pelas regiões N- e C-terminais do domínio G, junto com contribuições dos domínios N e C. Estas interfaces podem ser também heterotípicas (SEPT6 e SEPT7) ou homotípicas (entre duas SEPT2). Esta última interface é o que permite a polimerização de dois hexâmeros durante a formação de um filamento. Ambas as estruturas dos heterocomplexos permitiu também identificar a presença de GTP ligado em SEPT6 e GDP ligado em SEPT2 e SEPT7 (como esperado pelas suas características dos grupos). Com base no arranjo do hexâmero mostrado na Figura 9, e levando em conta as similaridades sequenciais (Figura 7) é possível deduzir que o arranjo do hexâmero observado para septinas de *Drosophila* (Figura 8) deve ser **Sep1-Sep2-Pnut-Pnut-Sep2-Sep1** com uma interface NC entre Pnut e Sep2 e interfaces G unindo Sep1/Sep2 e Pnut/Pnut. Uma interface potencial NC fica exposta nas extremidades do hexâmero, como no caso humano.

Ao longo dos anos, a resolução de estruturas cristalográficas de septinas individuais ou de complexos heterodiméricos em alta resolução proporcionou informação detalhada das

características estruturais, principalmente do domínio G, de septinas. (61) A Figura 10 mostra o enovelamento de uma septina, com seus principais motivos estruturais importantes tanto na ligação e mecanismo de hidrólise do nucleotídeo como na formação das interfaces G e NC. Os motivos *P-loop* (verde), *switch I* (Sw1) e *switch II* (Sw2) são importantes para a ligação e hidrólise do GTP para GDP. As regiões do *trans-loop1* e *trans-loop2* (Tr1 e Tr2) importantes para a formação da interface G (juntos com os motivos previamente mencionados). As regiões polibásica (PB1 e PB2) junto com a hélice $\alpha 5'$ importantes para a estabilização da interface NC. (61) Finalmente, no modelo é destacado em laranja o *Septin Unique Element*, um motivo que diferencia as septinas das outras pequenas GTPases e demonstrado como importantes no processo de polimerização de septinas em filamentos.

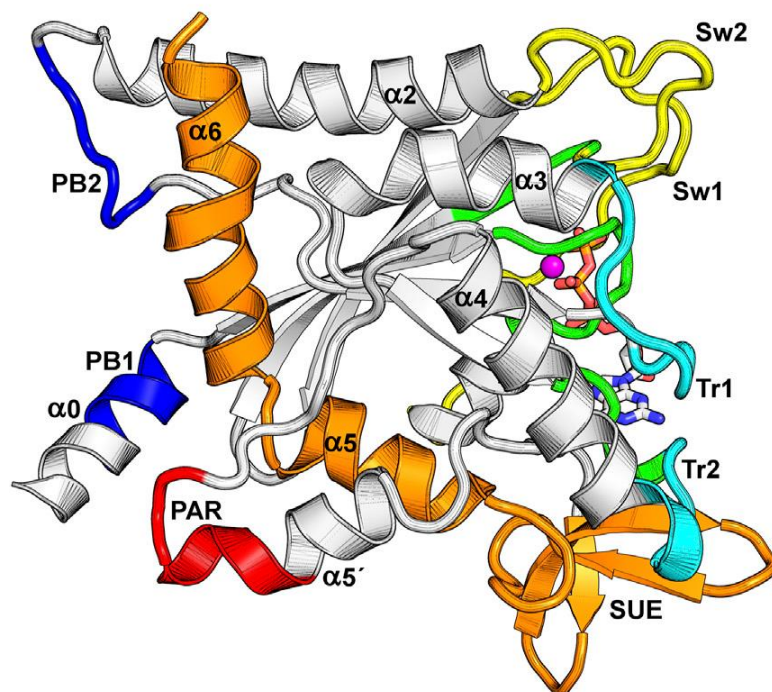


Figura 10 - Enovelamento do domínio G de uma septina. Na estrutura os elementos de estrutura secundária são representados como hélices e fitas. São destacados os motivos e regiões importantes para a ligação do nucleotídeo GTP/GDP e para a formação das interfaces G e NC. Sw1: *switch I*; Sw2: *switch II*; Tr1: *trans-loop1*; Tr2: *trans-loop2*; PB: região polibásica; PAR: região poliácida; SUE: *Septin Unique Element*.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.* (60)

Rosa *et al.* (2020), descreve que o *switch I* determina a seletividade na interface G formada entre as septinas dos grupos II e III. (61) Este motivo estrutural contribui significativamente para a área de contato na interface G entre as septinas dos grupos II e III.

(61) Isso levanta a possibilidade de que a seletividade que une os membros desses dois grupos pode estar relacionada a interações seletivas envolvendo resíduos característicos do grupo encontrados nas regiões do *switch I*. Duas redes de interações envolvendo resíduos característicos nos *switches I* de ambas as subunidades do heterodímero formado por SEPT2-SEPT6 foram identificadas. (62) A primeira envolvendo uma treonina (do *P-loop*) e uma histidina (do *switch I*) característica em SEPT6, interagindo numa cavidade formada por dois resíduos característicos do *trans-loop1* da SEPT2 (uma fenilalanina e glicina) Thr característica (Figura 11A). A segunda rede de interação envolve a cadeia lateral de Ala71 pertencente ao *switch I* de SEPT2 (Grupo III), que interage numa cavidade formada pelos resíduos Leu161, Ser163, Leu166 e Glu203 de SEPT11 (Grupo II) (Figura 11B). (61)

Outra interação importante que ocorre na interface G é dada via *switch II*. As estruturas cristalinas de homodímeros e heterodímeros tornaram possível demonstrar que a ordenação completa do *switch II* está relacionada com a formação de interfaces G fisiológicas. (30,42,61,63-64) A estrutura que resulta do emparelhamento das duas regiões *switch II* é mostrada na Figura 11C. Em geral, este emparelhamento não surge em interfaces G promíscuas, que frequentemente aparecem em estruturas cristalinas de domínios G isolados de uma única septina. Os resíduos envolvidos na ponte β da interface são mostrados como bastões e as duas ligações de hidrogênio que definem a ponte são mostradas como traços pretos em Figura 11C. As ligações de hidrogênio que estabilizam as voltas β também são indicadas. Em SEPT7, ligações de hidrogênio adicionais são formadas entre a cadeia lateral de Asn123 e a cadeia principal. Em SEPT2 este resíduo é substituído por uma Cys e em SEPT11 por uma Lys. Essas duas cadeias laterais estão enterradas sob a ponte β .

A formação dos heterofilamentos de septinas estão também estabilizados pela interface NC, interface formada principalmente pelos domínios N e C-terminais de septinas iguais ou diferentes. (65) Nesta interface, como na interface G, existem interações envolvendo regiões específicas tanto dos domínios N e C-terminais como a contribuição do próprio domínio G (PB1 dentro da hélice α_0 , PB2, PAR e α_6 mostrados na Figura 11C). Uma das outras regiões que contribuem na interface NC é *hook-loop*. O *hook-loop* é uma região no final do domínio N-terminal, antes da hélice α_0 , que participa de uma interação do tipo *domain-swapping*. Desta forma, o *hook-loop* de uma subunidade fica enterrado numa cavidade do seu parceiro formada pela interface NC (Figura 11D). (65,66) Nesta região, um aminoácido destaca-se dentro dos outros. Uma fenilalanina se mostra como sendo crucial para a estabilização da interface NC entre parceiros. (65) Em estruturas conhecidas, esta fenilalanina, antes da hélice α_0 , está

enterrada em um bolsão hidrofóbico que auxilia na ancoragem da hélice dentro da interface NC. Destacam-se também alguns resíduos essenciais para a interface NC e/ou conformação de $\alpha 0$ (Phe(HL), Phe($\alpha 0$) e Pro($\alpha 0$)); indicados em apenas uma cadeia (para maior clareza) na Figura 11E. Essas fenilalaninas atuam como âncoras e são conservadas nos grupos SEPT2, SEPT6 e SEPT7, mas são mutadas para isoleucinas no grupo SEPT3, o que pode estar relacionado à mobilidade $\alpha 0$ adicional neste último.

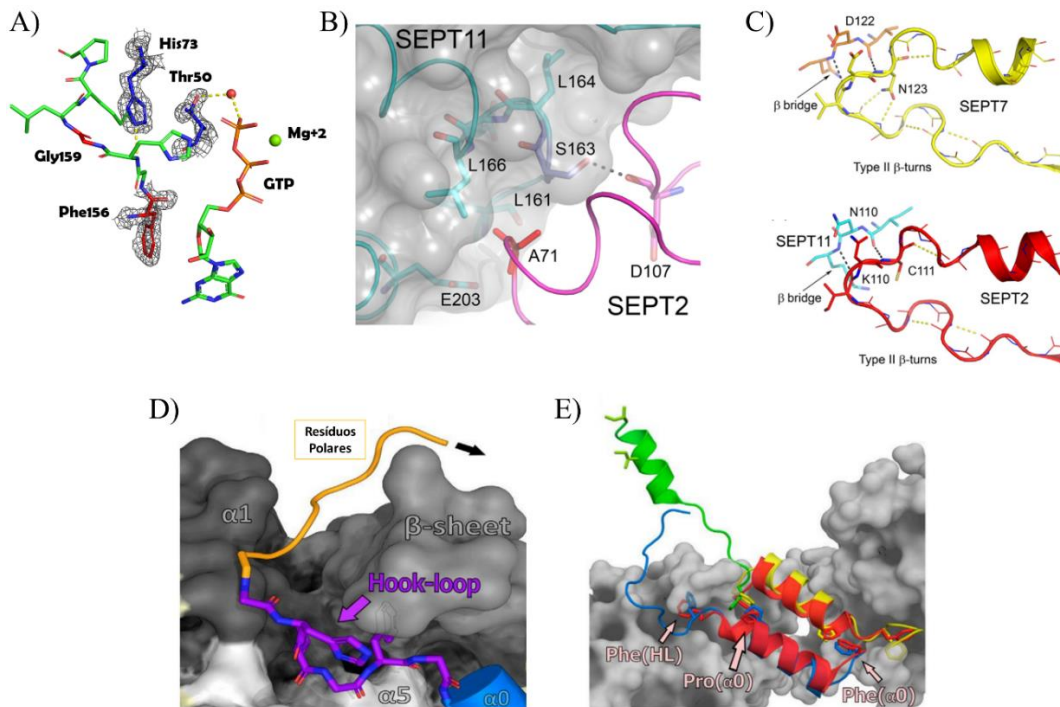


Figura 11 - Interações específicas que estabiliza a interface G e interface NC de septinas. A) Interações envolvendo resíduos característicos da SEPT6 (His73 e Thr50) e da SEPT2 (Phe156 e Gly159). A rede de interação mostra como o grupo metilo da Thr50 (que adota essa orientação pela interação com o GTP via uma molécula de água), interage com a His73 o que permite sua correta orientação na cavidade formada pela *trans-loop1* da SEPT2 (Phe156 e Gly159). B) A Ala71 é um resíduo característico do subgrupo SEPT2 e Ser163 pode ser considerado como tal para o subgrupo SEPT6. Esses resíduos estão em contato de *Van der Waals* na interface. Os resíduos característicos se agrupam na interface para formar um ponto de especificidade. C) *Switch II* de SEPT7 (PDB ID: 6N0B) na interface G homodimérica (acima). As duas subunidades são mostradas em diferentes tons de amarelo. *Switch II* de SEPT2 (vermelho) e SEPT11 (azul) (PDB ID: 6UPQ) na interface G heterodimérica (abaixo). D) Elementos do SEPT7 (em cinza) que acomodam o *hook-loop* de SEPT6 em uma fenda. Resíduos com pequenas cadeias laterais do *hook-loop* são importantes para essas interações. E) Hélice- $\alpha 0$ e suas orientações dentro das estruturas de septina disponíveis (SEPT3 em verde, PDB ID: 4Z54; SEPT6 em azul SEPT7 em amarelo, PDB ID: 7M6J; SEPT2 em vermelho, PDB ID: 2QA5).

Fonte: Adaptada de ROSA *et al.*; CAVINI *et al.* (61,65)

1.6 JUSTIFICATIVA

Drosophila melanogaster é um organismo modelo de pequeno porte cujo entendimento estrutural e biológico de suas septinas ainda não foi completamente elucidado. Até o início deste estudo, não havia nenhuma informação estrutural das septinas deste organismo, nem

mesmo de nenhum inseto. A ausência de qualquer estrutura em alta resolução de septinas de *Drosophila melanogaster* bem como a falta de conhecimento de seus mecanismos de atuação, justificaram a obtenção de estrutura e modelos tridimensionais que possam auxiliar a entender os mecanismos de interação e formação de filamentos destas septinas neste organismo.

Desta forma, devido à carência de informações relacionadas à especificidade de septinas de *Drosophila melanogaster* na formação de complexos bem como na dificuldade de se trabalhar com as proteínas isoladas e com os heterofilamentos formados pelas Sep1, Sep2 e Pnut em solução, este trabalho de doutorado buscou analisar as propriedades bioquímicas destas proteínas isoladas *in vitro*. A abordagem de estudo foi aplicada para construções de proteínas completas, contendo os 3 principais domínios (NGC) bem como para construções que possuam apenas o domínio GTPase (G). Além disto, uma vez que é reportado que complexos diméricos oferecem maior estabilidade em solução e pretensão para cristalização (46,66), trabalhou-se também com as combinações diméricas: Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G). Outro destaque deste estudo é a apresentação de dados experimentais provenientes de difração de raios-X para o dímero Sep1(G).Sep2(G), sendo a primeira estrutura resolvida para este organismo. Além disto, estudou-se também um mutante de Pnut(G) com o objetivo de investigar a interface dimérica de Pnut(G).Pnut(G). Por fim, foi estudado a energia de formação de complexos maiores (hexâmeros), bem como discutido as interfaces e condições que favorecem a complexação em polímeros de maiores ordem de organização.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural das septinas de *Drosophila melanogaster* (Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 e Pnut) comparando seus comportamentos como proteínas individuais, diméricas ou triméricas, com seus homólogos humanos.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressão e purificação dos domínios GTPase das septinas de *D. melanogaster* Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 e Pnut.

- Co-expressão e co-purificação dos complexos formados pelos domínios GTPase das septinas Sep1 e Sep2 com Sep4 e Sep5.
- Expressar e purificar um mutante de Pnut ($Pnut_{mut}$) com a finalidade de aumentar sua estabilidade em solução.
- Expressar e co-purificar o complexo formado por Sep1, Sep2 e $Pnut_{mut}$.
- Caracterizar, usando técnicas biofísicas, cada uma das proteínas purificadas (individuais e complexos): SEC-MALS para determinar o estado oligomérico, cromatografia líquida de alta eficiência para detectar nucleotídeos endógenos nas proteínas e dicroísmo circular para determinar suas estabilidades térmicas.
- Cristalizar os domínios G das septinas de *D. melanogaster* purificadas (individuais e heterocomplexos).
- Predizer as estruturas dos domínios GTPase de septinas de *D. melanogaster* usando técnicas de modelagem por modelagem comparativa e *AlphaFold2*.
- Realizar simulações de dinâmica molecular com objetivo de avaliar as interfaces de contato entre os parceiros de interação das de septinas de *D. melanogaster*.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos e

Metodologia

2.1 BIOLOGIA MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

2.1.1 ESTUDOS DE PROTEÍNAS INDIVIDUAIS E SEUS DOMÍNIOS G

Para este trabalho foram adquiridos da empresa *GenScript* os cDNAs referentes às 5 septinas presentes em *D. melanogaster*. As proteínas inteiras serão denominadas com o termo (NGC), por conter as porções N e C terminal das septinas, além da região GTPase. Além destas, foram desenhadas 5 construções destas proteínas contendo apenas o domínio responsável pela função GTPase, denominada apenas por G. Na Tabela 2 a seguir é possível observar as informações de tamanho (número de resíduos) e massa molecular teóricos das proteínas utilizadas neste trabalho.

Tabela 2 - Propriedades das proteínas estudadas neste trabalho de doutorado. *A identidade foi considerada com relação a SEPT6 para o Grupo II, SEPT2 para o Grupo III e SEPT7 para o Grupo IV.

Proteína	Massa Molecular (kDa)	Número de Aminoácidos	Identidade comparativa com SEPTs Humanas (%)*	Grupo
Sep1(NGC)	41,1	361	55	III
Sep1(G)	31,3	273	78	III
Sep2(NGC)	48,5	419	57	II
Sep2(G)	30,7	268	76	II
Sep4(NGC)	49,0	427	33	III
Sep4(G)	32,1	275	65	III
Sep5(NGC)	48,5	422	42	II
Sep5(G)	30,4	268	70	II
Pnut(NGC)	60,1	539	57	IV
Pnut(G)	30,8	274	70	IV

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente buscamos expressar e purificar as septinas individuais com seus três domínios, assim como construções com apenas seus domínios G correspondentes. O material sintético adquirido pela empresa foi inicialmente inserido em cepas de *Escherichia coli* DH5- α (Thermo Fisher Scientific) para a propagação dos vetores, aumentando assim a quantidade de DNA e garantindo a integridade dos insertos. Tanto as versões completas (NGC) como

truncadas (G) foram inseridos no vetor de expressão pET-28a(+). Esta transformação foi realizada adicionando 100 ng de DNA em 100 nL de bactérias competentes seguido de incubação por 30 min em banho de gelo. O choque térmico foi realizado ao transferir a mistura para um banho pré-aquecido a 42 °C, deixando assim a amostra incubada por 2 min, e em seguida, recolocada rapidamente de volta em banho de gelo por 3 min. Então, a mistura foi colocada em 1 mL de meio LB sob agitação de 250 rpm por 1 h. Ao fim desta etapa, as células foram plaqueadas em meio LB Agar contendo 50 ng/mL de canamicina, seguido de incubação a 37 °C por 16 h.

A confirmação da presença do inserto foi realizada após o crescimento das células da transformação em *Escherichia coli* DH5- α realizada anteriormente. O DNA plasmidial foi isolado por meio da lise celular realizada com o uso do kit comercial Miniprep, e então submetido à análise em um sequenciador automático Genetic Analyzer 38130 (Applied Biosystems) através do método de Sanger. (67)

Uma vez confirmada a correta sequência de DNA por meio do sequenciamento, prosseguiu-se para a etapa de transformação em cepas de bactérias com foco em expressão. Os plasmídeos pET-28a(+) contendo genes de interesse referentes às septinas foram transformados em cepas de expressão RosettaTM (DE3) da bactéria *E. coli*, com resistência a canamicina e cloranfenicol. O processo de transformação foi realizado de forma análoga ao descrito para a transformação em *Escherichia coli* DH5- α , e ao fim deste o DNA foi novamente sequenciado para prosseguir com os testes de obtenção de proteína.

A expressão de cada proteína foi realizada em 1 L de meio Power Broth (*Molecular Dimensions*), com crescimento por cerca de 4 horas, 37 °C, sob agitação 150 rpm, até a D.O._{600nm} de 0,6., seguido por indução com 0,3 mM de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 18 h, sob agitação e 18 °C. As células foram centrifugadas a 6.000 g, 45 min, 4 °C e após esta etapa, foram resuspendidos em 40 mL do tampão de lise: 25 mM HEPES pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM 2-Mercaptoetanol; 10% (v/v) glicerol. Foi então adicionado 1 μ g/mL de lisozima ao extrato celular. O sistema foi deixado em repouso em gelo por 30 min, para o enfraquecimento da parede celular bacteriana, facilitando a lise celular. Após esta etapa, as células foram submetidas a pulsos de ultrassom por 15 s espaçados por um intervalo de 45 s durante 30 min.

As células foram então centrifugadas por 50 min na rotação de 16.000 g, e o sobrenadante foi submetido à purificação inicialmente por cromatografia de afinidade em resina de níquel, lavagem com 20 mL de tampão de lavagem (tampão de lise + 20 mM de imidazol), e eluição com 5 mL de tampão de eluição (tampão de lise + 500 mM de imidazol). Quando se fez necessário retirar a cauda de hexahistidina, foi realizada uma diálise em concentrador com corte de 10 kDa em tampão de lise, e em seguida foi realizada uma etapa de incubação com trombina (Sigma-Aldrich), 1 u/100 µg, 18 °C, 18 h para remover a cauda de histidina.

Por fim, para realizar a separação de agregados e da proteína de interesse, bem como de seus diferentes estados oligoméricos, foi realizada uma nova purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC, do inglês *Size-Exclusion Chromatography*). Esta purificação foi conduzida em tampão de purificação B (25 mM HEPES pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM 2-Mercaptoetanol; 50 mM ácido L-glutâmico, 50 mM L-arginina, 10% (v/v) glicerol) em fluxo de 1 mL/min através do uso de uma coluna *Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)* previamente equilibrada com tampão de purificação B. Este processo de purificação tem o objetivo de realizar sua caracterização inicial (em termos de massa molecular aparente) e melhorar o grau de pureza da amostra.

A quantificação do produto de cada proteína purificada foi realizada por medidas de absorvância em 280 nm utilizando o NanoDrop 100 (Thermo Fisher Scientific). Para tal, foi necessário considerar a massa molecular e o coeficiente de extinção molar (ϵ_{280}) determinadas com o auxílio do programa ProtParam. (68) A eficiência do processo de purificação foi monitorada através gel SDS-PAGE 15%. Após a purificação, priorizou-se a realização imediata de experimentos de caracterização das amostras, podendo também ser congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

A Figura 12 a seguir contém as informações das sequências de aminoácidos de todas as septinas de *Drosophila melanogaster*, agrupadas pelos 3 domínios principais: N-terminal, GTPase e C-terminal. No Anexo 1 pode ser encontrado todas as sequências de nucleotídeos para estas proteínas.

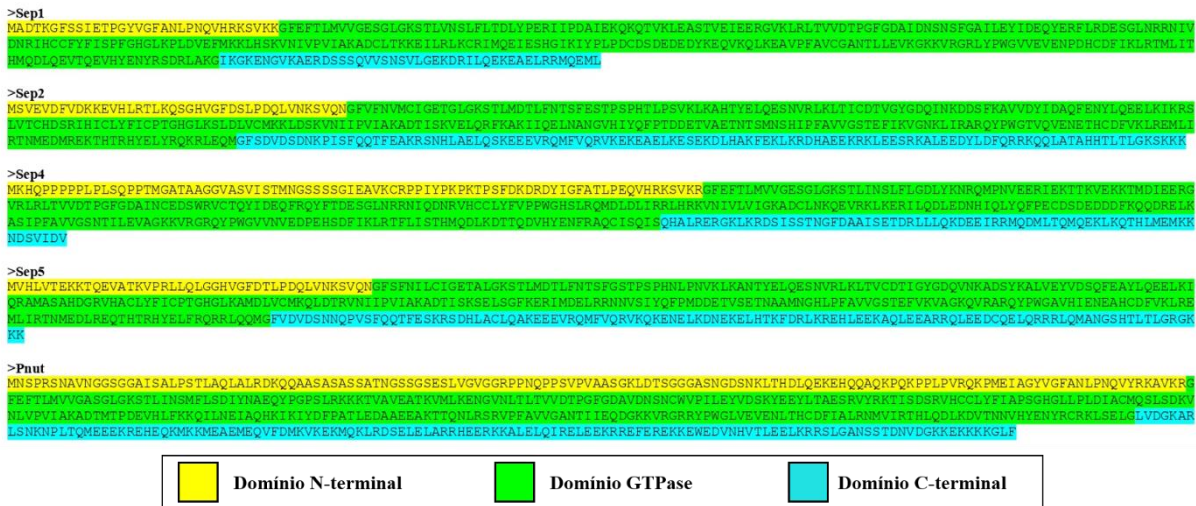


Figura 12 - Sequência de aminoácidos das proteínas de *D. melanogaster* classificadas pelos domínios N-terminal, GTPase e C-terminal. A classificação dos domínios foi realizada pelas informações presentes no *Uniprot* para cada septina, definindo inicialmente os domínios G, e consequentemente, as porções N e C terminais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.2 ESTUDOS DE COMPLEXOS PROTEÍCOS

Como no ambiente celular as septinas se encontram na forma de polímeros, foi proposto o estudo de combinações das septinas de *Drosophila* em complexos. Desta forma, decidiu-se trabalhar com possíveis heterodímeros através da co-expressão das duas septinas em um único plasmídeo. Cada dímero foi escolhido de acordo com o seu possível parceiro de interação, obedecendo a ordem esperada para as subunidades do hexâmero (Sep1-Sep2-Pnut-Pnut-Sep2-Sep1) e a “Regra de Kinoshita”. O foco foi nos dímeros formados por interfaces G (Sep1/Sep2 e Pnut/Pnut) e foi limitado às construções contendo apenas o domínio G de cada septina. A escolha deste método de trabalho foi inferida uma vez que diversas pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa foram realizadas com septinas G-diméricas, apresentando maior estabilidade e maior pretensão à obtenção de cristais – e por consequência, a elucidação de sua estrutura em alta resolução. (61,62) A partir da descrição das possíveis combinações de pares, tem-se os dímeros Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G). O dímero G formado no centro do hexâmero entre duas cópias de Pnut, por tratar de um homodímero, não necessitava de nenhum trabalho adicional, bastando expressar Pnut(G) sozinha. Estas combinações foram construídas adicionando uma cauda contendo seis-histidinas (His-Tag) na sua porção N-terminal das proteínas do Grupo II (Sep2 ou Sep5). Assim, a purificação do heterodímero é realizada por meio da afinidade com Sep2(G) ou Sep5(G) quando

estas estão ligadas com Sep1(G) ou Sep4(G). Na Tabela 3, é possível verificar alguns parâmetros teóricos destes dímeros.

Tabela 3 - Propriedades dos heterodímeros estudados.

Dímero	Massa Molecular (kDa)	Número de Aminoácidos
Sep1(G).Sep2(G)	65,85	567
Sep1(G).Sep5(G)	65,66	568
Sep4(G).Sep2(G)	66,57	568
Sep4(G).Sep5(G)	65,47	568

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os plasmídeos contendo os dímeros para a co-expressão foram adquiridos comercialmente da empresa FastBio (Ribeirão Preto, Brasil). Foram desenhados cada dupla de proteínas utilizando o plasmídeo comercial pETDuet-1, o qual é utilizado como uma opção para a expressão de duas proteínas na mesma célula, possuindo 2 sítios de ligação ao inserto a serem expressos. Para a construção, foi desenhado as proteínas cataliticamente ativas do Grupo III para primeiro sítio (MCS1), a saber: Sep1 e Sep4. Já as septinas do Grupo II que estas são preditas por serem cataliticamente inativas (Sep2 e Sep5), foram inseridas no segundo sítio (MCS2), o qual insere uma cauda de hexa-histidina na porção N-terminal. O método de expressão e purificação utilizados para os dímeros foi bem semelhante ao utilizado para outras proteínas, com a única exceção de que, nestes casos, o antibiótico usado para a seleção dos clones contendo pETDuet-1 é a ampicilina.

2.1.3 OBTENÇÃO DE Pnut.MUTANTE

Uma vez verificado que diferente de humanos, as septinas de *D. melanogaster* possuem apenas 3 grupos de septinas (impossibilitando a formação de octâmeros), foram concentrados esforços para um maior entendimento da região central do hexâmero (a região que é diferente entre octâmeros e hexâmero). Esta porção é constituída pelo dímero Pnut.Pnut, que em humanos corresponde a SEPT7.SEPT7. No caso de humanos, a SEPT7 pode interagir com outra SEPT7 (levando à formação de um hexâmero, SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2) ou

proteínas do Grupo I: SEPT3, SEPT9 ou SEPT12 (formando um octâmero do tipo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT3-SEPT3-SEPT7-SEPT6-SEPT2). Esta ausência de septinas do Grupo I em *Drosophila* estimulou a investigação desta interface de contato. Desta forma, analisou-se os principais resíduos presentes na interface de contato da estrutura cristalográfica de SEPT7-SEPT7 (6N0B) e verificou-se que dois destes resíduos não correspondiam aos mesmos resíduos em *D. melanogaster*: Glu58 e Lys173 em SEPT7, que são substituídas por Ala150 e Leu266 respectivamente em Pnut. Isto levou à elaboração das proteínas mutantes: SEPT7_{mut} e Pnut_{mut}, sendo que estas construções correspondem a SEPT7_{mut} com os resíduos presentes em Pnut, e Pnut_{mut} possuindo os resíduos presentes em SEPT7.

Os mutantes SEPT7_{mut} e Pnut_{mut} foram encomendados e sintetizados pela empresa FastBio (Ribeirão Preto, Brasil). As sequências codificantes (CDS) dos mutantes foram inseridos do vetor de expressão pET-28a(+). A expressão e purificação foram realizadas como descrito na seção 2.1.1 para as septinas de *D. melanogaster* individuais.

2.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR ACOPLADA AO ESPALHAMENTO DE LUZ A MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS)

Para a caracterização da massa molecular e determinação do estado oligomérico das diversas construções das septinas de *D. melanogaster* foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS). Este experimento fornece a massa (e, por inferência, o estado oligomérico) de diferentes populações dentro de uma mesma amostra (separadas durante a cromatografia) em tempo real, seja para sistemas heterogêneos ou interações macromoleculares.

O equipamento possui um módulo de espalhamento estático de luz a múltiplos ângulos (MALS, *Multiple-Angle Light Scattering*) miniDAWN® TREOS®, um detector WyattQELS® para medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) e um detector de índice de refração Optilab® rEX para medidas de concentração das amostras (Wyatt Technology Corporation). Após as amostras serem separadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), usando um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Waters), as análises de MALS/DLS são realizadas em tempo real, experimento conhecido como SEC-MALS. Desta maneira, são determinadas de forma direta e absoluta a massa molecular (a partir da detecção simultânea de espalhamento

estático de luz em 3 diferentes ângulos), índice de refração da solução (n) e a mudança no índice de refração devido à concentração da amostra. (69) Como o SEC-MALS não se baseia na suposição do estado globular do analito e na calibração dos padrões, a massa molar pode ser obtida para proteínas de qualquer forma, bem como para proteínas e agregados intrinsecamente desordenados. (70)

Após a cromatografia de exclusão molecular, as proteínas foram coletadas de acordo com o pico correspondente ao estado oligomérico desejado (monômeros ou dímeros, dependendo do caso) e concentradas a 2 mg/mL, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Foram injetados 50 µL de cada amostra na coluna *Superdex 200 10/300 GL(GE)* (previamente equilibrada com tampão: 20 mM Tris pH 7,8; 150 mM NaCl) acoplada num módulo de separação *Waters 600 Controler* o qual está conectado ao sistema *miniDAWN TREOS - MALS* (*Wyatt Technologies*) e fluxo de 0,5 mL/min. Os dados foram coletados a temperatura ambiente e analisados utilizando o programa *ASTRA 7.0.1* (*Wyatt Technology*).

2.3 ANÁLISE DO ENOVELAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA COM ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Para investigar o comportamento em solução de todas as combinações de septinas de drosófila analisadas em função da temperatura, utilizou-se a Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD). Esta técnica se baseia na interação diferenciada de moléculas assimétricas quando submetidas à luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. (71,72) O Dicroísmo Circular mede então a diferença angular (geralmente expressa em elipsidade - θ) entre a absorção de luz circularmente polarizada à direita e a esquerda. (73)

As análises de Dicroísmo Circular (CD) foram conduzidas com o espectropolarímetro J-815 (JASCO Corporation, Japão). Os experimentos foram realizados em função da temperatura, a fim de investigar a desnaturação térmica das proteínas. Foram analisadas medidas em 222 nm, em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm acoplado ao sistema de variação térmica *Peltier* numa taxa de 50 nm/min. Este comprimento de onda foi escolhido por ser sensível de quantificar sinais provindo de α -hélices. (74)

As concentrações de proteínas utilizadas foram de 0,2 mg/mL, sendo realizada a diálise para o tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7,8; 100 mM NaCl; 4% (v/v) glicerol. Para investigar a alteração da estrutura secundária, as amostras foram submetidas ao processo de variação térmica de 10 a 90 °C, medidos em intervalos de 2 °C a uma taxa de 10 °C/h. Posteriormente, o

sinal referente ao comprimento de onda de 222 nm (mínimo correspondente a hélices- α) foi monitorado e calculado o valor de Temperatura de *melting* (T_M) por meio do ajuste de *Boltzmann*. A fração de proteína desnaturada (f_d) é calculada a partir do seguinte $f_d = (\theta_n - \theta_{obs})/(\theta_n - \theta_d)$ aplicando a condição $f_d + f_n = 1$. Para este cálculo, θ_{obs} é a elipticidade em 222 nm obtida a uma determinada temperatura, θ_d e θ_n são as elipticidades dos estados desnaturado e nativo, respectivamente, e f_n é a fração de proteína no estado nativo.

Os espectros foram registrados com o uso do software *Spectra Manager* (JASCO) e o processamento dos espectros foi realizada utilizando o programa CDTools. (75) Os dados obtidos foram tratados por meio do ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann* e analisados utilizando o software Origin 2018 (OriginLab). (76)

2.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE NUCLEOTÍDEOS

Sabe-se da literatura que as septinas possuem um domínio de ligação ao GTP altamente conservado e algumas destas possuem atividade GTPase. (77) Assim como outras proteínas que se ligam ao GTP, pode-se esperar que o produto de purificação possa vir com a presença de nucleotídeos de guanina co-purificados. Desta forma, ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizados para a detecção de nucleotídeos endógenos, bem como para a realização da hidrólise enzimática, convertendo GTP a GDP.

Os ensaios de detecção de nucleotídeo endógeno foram realizados como previamente estabelecidos por Seckler e colaboradores. (78,79) Para isto, uma concentração de 25 μ M em 500 μ L de cada amostra em tampão: 20 mM fosfato de sódio pH 7,8; 100 mM NaCl; 4% (v/v) glicerol foi adicionado 200 μ L de 1,5 M HClO₄ gelado e incubado durante 10 min a 4 °C. As proteínas desnaturadas foram separadas por centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C. Logo após, recolheu-se 600 μ L de sobrenadante no passo anterior, e a estes foram adicionados 100 μ L de 3 M KOH, 80 μ L de 5 M ácido acético e 100 μ L de 1 M K₂HPO₄ sendo então armazenado a -20 °C por 18 h para completa precipitação do HClO₄. Após o tratamento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 x g a 4 °C para garantir a separação do HClO₄ precipitado e é então analisada a fração correspondente ao sobrenadante. Então uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante foi aplicada em uma coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW* 7,5 x 7,5 mm (Waters) acoplada a um cromatógrafo *Alliance 2695*, sob monitoramento da absorbância no comprimento de onda de 253 nm. A separação dos

nucleotídeos foi realizada por meio de cromatografia utilizando um gradiente de até 1 M de NaCl.

Além destas amostras, foram utilizados como padrões GTP e GDP com concentração inicial de 50 μM , em que foram realizadas diluições seriadas (1:2) no mesmo tampão das amostras e submetidos ao mesmo tratamento de desnaturação. Os cromatogramas coletados no comprimento de onda de 253 nm foram analisados utilizando o programa Origin 2018 (OriginLab). (76)

2.5 ENSAIOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

Com o objetivo de identificar o estado oligomérico e informações estruturais a baixa resolução para as proteínas em estudo, utilizou-se a técnica de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS). Esta técnica é frequentemente recorrida para a determinação da massa de macromoléculas e pode responder a diversas questões como, por exemplo, o tamanho e forma das moléculas em solução, ou estado oligomérico. (80) Além disso, é um método alternativo para a resolução estrutural do envelope molecular de moléculas que não cristalizam ou não difratam. (81-83)

Diferentemente do que há em cristalografia por raios-X, onde há um arranjo tridimensional das partículas em forma periódica num cristal, o espalhamento a baixo ângulo é obtido para amostras em solução, onde as partículas estão ao acaso, em movimento browniano. (82) O padrão de espalhamento é obtido em função do módulo do vetor de espalhamento que depende do ângulo de espalhamento (θ) e do comprimento de onda do feixe incidente (λ). A intensidade de espalhamento $I(q)$ para um sistema de partículas espalhadoras em soluções bem diluídas é proporcional à concentração das partículas em solução. (84)

Assim como ocorre em cristalografia de raios-X, a informação estrutural pode ser obtida a partir da Transformada de *Fourier* da curva de intensidade medida. A distribuição das distâncias interatômicas, $p(r)$, é dado por: $p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty q I(q) \text{sen}(rq) dq$. A distribuição de $p(r)$ em função de r (distância interatômica) permite a determinação da dimensão máxima da partícula. A partir desta relação também é possível, através de diversos modelos matemáticos, gerar envelopes *ab initio* a baixa resolução para as moléculas em estudo, o que pode ser de grande valia quando analisado em conjunto com estruturas homólogas de alta resolução já conhecidas. (81)

Os experimentos de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS/CNPEM - Campinas, Brasil) em colaboração com o Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto (Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu). Para estes experimentos, as condições experimentais foram definidas pela utilização de feixes de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ e com distância de 1,033 m em relação ao detector bidimensional MarCCD (MarXperts). Foram testadas as septinas Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC), além da combinação destas três proteínas, realizada por meio da mistura de extrato celular e subsequente purificação. As concentrações utilizadas foram de 10 mg/mL, 5 mg/mL e 2,5 mg/mL, (em razão equimolar para o complexo) com adição de 1 mM tanto de GTP quanto de GDP. As amostras foram previamente dialisadas em tampão 20 mM HEPES, 150 mM NaCl e 5 mM MgCl₂ a 25 °C.

Os espalhamentos resultantes das proteínas bem como do tampão foram obtidos através da média de 5 leituras, com 45 segundos cada. O espalhamento referente ao tampão foi devidamente subtraído dos espalhamentos das amostras. A obtenção e processamento inicial dos dados foram realizados pelo programa FIT2D (85) e o tratamento posterior foi realizado com o uso do pacote de programa ATSAS. (86) As curvas experimentais de espalhamento foram tratadas pelo programa PRIMUS. (87) A massas moleculares para as proteínas analisadas foram determinadas pelo servidor SAXSMoW2 (80), já para a determinação da função de distribuição de distâncias $p(r)$ foi utilizado o programa GNOM. (88)

2.7 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO, COLETA DE DADOS E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA

No início deste estudo haviam 22 estruturas de septinas depositadas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sendo 17 estruturas de *Homo sapiens*, 2 de *Schistosoma mansoni*, 1 de *Saccharomyces cerevisiae*, 1 de *Mus musculus* e 1 de *Chlamydomonas reinhardtii*. (58) Mesmo com a grande representatividade de septinas na natureza, e mesmo já se estudando estas proteínas desde a década de 1970 (2), há relativamente poucas estruturas conhecidas, o que revela o fato de não ser tão trivial a obtenção de cristais destas proteínas. Neste trabalho será descrito as etapas experimentais que levaram à obtenção da primeira estrutura para *Drosophila melanogaster*, a primeira resolvida para um representante dos insetos.

Como é sabido, diferentes espécies possuem diferentes número de grupos de septinas sendo que para insetos, há apenas 3 grupos (faltando representantes do grupo I). Aqui, procurou-se explorar diferentes abordagens para os testes de cristalização, utilizando proteínas do mesmo grupo, e combinações de proteínas de diferentes grupos.

A cristalografia por difração em raios-X é uma das principais técnicas utilizadas para a determinação de estruturas de macromoléculas em alta resolução. A formação de cristais de proteínas é um fenômeno que depende de diversas condições, como concentração, solubilidade, aditivos (tais como sais e ligantes), temperatura bem como da própria estrutura intrínseca da proteína. O arranjo cristalino de uma macromolécula em forma de cristal se dá quando uma solução supersaturada atinge lentamente um estado termodinamicamente estável por meio da deposição organizada e periódica. (89)

Para iniciar os testes de cristalização, foi realizada uma pesquisa para a predição de cristalizabilidade das proteínas através do site XtalPred Server. (90) Este programa realiza duas formas principais de análise para prever a facilidade ou dificuldade de uma proteína cristalizar: o método Expert Pool (EP) ou o método Random Forest (RF). O método EP classifica as sequências combinando probabilidades de cristalização individuais calculadas para oito características de proteína em uma única pontuação de cristalização. Já o método RF analisa características das proteínas baseadas em sua sequência, tais como: comprimento, ponto isoelétrico, índice de hidrofobicidade, desordem estrutural prevista, índice de instabilidade, dentre outros, e então compara com um banco de dados próprio composto por proteínas com estruturas já conhecidas. A classificação é então realizada por modo comparativo, sendo que para ambos os métodos o score menor representa maior probabilidade de cristalização, já para maiores scores a chance de cristalização é teoricamente mais difícil.

A predição foi realizada para todas as combinações de septinas de *D. melanogaster* estudadas neste projeto. Optou-se por priorizar as tentativas de cristalização com os domínios GTPase. A mesma estratégia foi empregue com sucesso para a cristalização dos domínios GTPase de septinas em outros organismos.

A cristalização foi conduzida por meio de diferentes testes, bem como diferentes combinações de septinas (na expectativa de se obter complexos proteicos). Também foram testados diferentes ligantes e condições tamponantes, e variações das concentrações proteicas. Os testes iniciais de cristalização foram realizados em concentrações de cerca de 7 mg/mL para

as septinas individuais tanto para as construções constituídas pelo domínio GTPase como para as proteínas inteiras. Foram testadas condições de septinas apo e complexos com GDP, GTP e simultaneamente GTP e GDP além da adição de guanosina 5'-O-[gama-tio] trifosfato, ou GTP γ -S, um análogo não hidrolisável do GTP.

A triagem inicial se deu por meio da utilização dos kits comerciais de cristalização Morpheus (Molecular Dimensions), Crystal Screen HT (Hampton Research), Index HT (Hampton Research), JCSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions), MIDAS (Molecular Dimensions). Foi utilizado o método de difusão de vapor por gota pendurada (*hanging drop*) e gota sentada (*sitting drop*), bem como a utilização do método da matriz esparsa com a variação de três parâmetros como variáveis principais: pH, aditivos e agentes precipitantes.

Posteriormente, os esforços para a cristalização foram concentrados no método de gota sentada com o uso do robô Crystal Gryphon (Art Robbins), que utiliza uma triagem de 96 condições contendo 0,2 μ L de solução de proteína e 0,2 μ L de solução de cristalização para cada kit utilizado. Cada triagem contendo as condições testadas para cristalização foram armazenadas em câmaras termoestáveis, a 4 °C ou 18 °C. Após diversos esforços, foram obtidos cerca de 13 cristais de Sep1(G) e Sep4(G) individuais, os quais foram testados na linha MX-2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM/Campinas), porém não se prosseguiu com a coleta uma vez que não houve difração suficiente para indexação e assim prosseguir para a resolução da estrutura em alta resolução.

Para tentar contornar esta situação, recorreu-se às tentativas de cristalização de heterodímeros. O nosso grupo de pesquisa possui ampla experiência na cristalização de septinas, em especial com o domínio GTPase. Para isto, foram testadas todas as combinações possíveis de interfaces G de *Drosophila melanogaster*: Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G), bem como Pnut(G) e Pnut_{mut}(G). Os ensaios de cristalização foram realizados como descrito previamente, usando o método de difusão de vapor e kits comerciais de cristalização. Em casos de sucesso (que aconteceu apenas para o heterodímero Sep1(G).Sep2(G)), após aproximadamente 72 horas de incubação, foram retirados os cristais das gotas de cristalização presentes nas diferentes condições com um *MicroLoop* (MiTeGen) de tamanho compatível com o comprimento e largura do cristal.

A coleta de dados dos cristais da Sep1(G)-Sep2(G) foi realizada no sincrotron Diamond Light Source (DLS) na Inglaterra, na linha de raios-X para macromoléculas *I04*. Os dados

coletados foram indexados, integrados e escalonados usando o programa *autoPROC* (91) no servidor do sincrotron DLS. O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado dos parâmetros de cela presentes no arquivo *mtz* processado pelo *autoPROC* usando o programa *Matthew_coeff.* (92) Para resolver o problema das fases, foi utilizada a metodologia de substituição molecular com o programa *Phaser* (93) do pacote *Phenix* (94), usando como modelo a estrutura do heterodímero de septinas humanas SEPT2-SEPT11 (6UPQ). Subsequentemente, a estrutura foi refinada com uma mistura de ciclos de refinamento automático e manual usando os programas *phenix.refine* (95) e *Coot* (96), respectivamente. Os parâmetros de qualidade da estrutura foram monitorados através dos valores de R e R_{free} , assim como pela estereoquímica da proteína usando o programa *Molprobity.* (97) A estrutura foi analisada usando o programa PyMol (98) e DIMPLOT. (99) Finalmente, a estrutura foi depositada na base de dados de proteínas do *Protein Data Bank* (PDB) com o código 8DKT. (100)

2.8 MODELAGEM COMPUTACIONAL

2.8.1 CONSTRUÇÃO DE MODELOS ESTRUTURAIIS

A maior parte dos objetivos deste trabalho de doutorado se propõe a discutir sobre as septinas de *D. melanogaster* do ponto de vista estrutural. Uma vez que no decorrer do projeto (antes do sucesso com os cristais da Sep1(G).Sep2(G)) não havia nenhuma estrutura resolvida das septinas deste inseto, recorreu-se à modelagem computacional. As abordagens baseadas em computação para simular as propriedades das moléculas são bastante utilizadas pela comunidade, principalmente a partir do início da década de 90 devido aos crescentes avanços da tecnologia. (101) Deste então, cada vez mais é possível obter maior precisão para as soluções de potenciais energéticos a partir do uso de campos de forças apropriados para macromoléculas.

As simulações realizadas por computadores podem levar a novos *insights* interessantes sobre as propriedades das proteínas, bem como a disposição espacial de seus aminoácidos e por fim, sua função biológica. (101,102) Sabe-se que, em geral, proteínas similares possuem funções similares e tendem a ter estruturas semelhantes. (103) Este princípio fundamenta a realização de modelagem computacional por homologia. Esta técnica tem como base o conceito de que, ao longo de um processo evolutivo, o arranjo estrutural de uma proteína é significativamente mais conservada do que a sequência de aminoácidos que a compõe. (104)

Baseado nisto, uma vez que seja determinada a estrutura de uma proteína, a modelagem por homologia pode auxiliar na determinação estrutural de outras proteínas homólogas. A acurácia da modelagem tende a ser dependente da identidade entre as proteínas analisadas. Para tanto, é necessário identificar as proteínas homólogas, realizar a comparação entre elas por meio de alinhamento de sequência, para então partir para a modelagem em si e por fim realizar ciclos de otimização e validação do modelo final. (105)

Para a elaboração dos modelos dos dímeros Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G), foi utilizado o *AlphaFold2*. (106) Trata-se de um programa de inteligência artificial que realiza a construção de modelos estruturais proteínas utilizando um robusto sistema de aprendizagem profunda. (106) O *AlphaFold*, um software extremamente assertivo quanto à predição de estrutura proteica sem a necessidade de alinhamento prévio realizado pelo usuário (106), Os modelos de septinas gerados com o uso do *AlphaFold* estão disponíveis em ModelArchive (modelarchive.org) (107) com os códigos de acesso: ma-mkp9v (Sep1(G).Sep2(G)), ma-91nm (Sep1(G).Sep5(G)), ma-gumzv (Sep4(G).Sep2(G)) e ma-w1qyo (Sep4(G).Sep5(G)).

Embora mais recentemente tenha sido lançado o *AlphaFold*, no início deste trabalho de doutorado, utilizou-se a ferramenta MODELLER 10.1 (108) para a obtenção de modelos para Pnut(G) e Pnut(G)_{mut}. SEPT7_{mut}(G) bem como para SEPT7(G) nativa, em que os resíduos faltantes na estrutura depositada em alta resolução (PDB ID: 6N0B) foram completados. O MODELLER 10.1 trata-se de um programa que realiza modelagem por homologia baseado em duas (ou mais) sequências respeitando as restrições espaciais e enovelamento existente na estrutura molde. A escolha pela utilização por este programa para a elaboração de Pnut(G) se deu uma vez que esta proteína possui alto valores de identidade sequencial comparado a SEPT7(G) (70%), situação favorável para a geração de modelos confiáveis usando MODELLER. Os modelos gerados com o uso do MODELLER 10.1 estão disponíveis em ModelArchive (modelarchive.org) (107) com os códigos de acesso ma-wb711 (Pnut(G)), ma-amy1j (Pnut_{mut}(G)), ma-9b8ll (SEPT7(G)) e ma-1jaye (SEPT7_{mut}(G)).

Posteriormente, a modelagem computacional por homologia realizada pelo MODELLER foi utilizada para gerar modelos do hexâmero de drosófila (Sep1(G).Sep2(G).Pnut(G).Pnut(G).Sep2(G).Sep1(G)) e de humanos (SEPT2(G).SEPT6(G).SEPT7(G).SEPT7(G).SEPT6(G).SEPT2(G)). No caso de humanos, foi gerado um novo modelo para cada septina com a finalidade de se completar os resíduos faltantes

nas estruturas cristalográficas. Para a criação destes modelos, para o caso do hexâmero humano foram utilizados como molde o dímero de septinas SEPT2(G).SEPT6(G) com resolução de 2.51 Å (PDB ID: 6UPA) e SEPT7(G) com resolução de 1.74 Å (PDB ID: 6N0B). Um exemplo de script de como pode ser realizada a modelagem por homologia pode ser encontrado no Anexo 2. Subsequentemente, dois dímeros de SETP2(G).SEPT6(G) e um dímero de SEPT7(G).SEPT7(G) precisavam ser unidos para formar o hexâmero completo, SEPT2(G).SEPT6(G).SEPT7(G).SEPT7(G).SEPT6(G).SEPT2(G). Este procedimento foi feito aproveitando uma interface NC promíscua encontrada na estrutura cristalográfica da SEPT7(G), permitindo unir o dímero central de SEPT7(G).SEPT7(G) com dímeros de SEPT2(G).SEPT6(G) em cada extremidade por sobreposição da subunidade de SEPT6(G).

A utilização desta abordagem foi sustentada pelo fato de que os domínios G de septinas é altamente conservado, apresentando no mínimo 65% de similaridade entre mesmas espécies (31), requisitos suficientes para a utilização da modelagem molecular. (103,108)

As modelagens foram otimizadas usando o VTFM (*Variable Target Function Method*) e refinados com *Simulated Annealing*. Os melhores modelos (tipicamente de um total de 100) foram selecionados com base no menor DOPE score, do inglês, *Discrete Optimized Protein Energy*. Trata-se de um potencial estatístico comumente utilizado para avaliar modelos gerados por homologia. Os valores gerados são comparativos (e não absolutos) então são válidos apenas para comparar vários modelos da mesma proteína para poder identificar o melhor resultado.

Os modelos permitiram uma comparação entre as interfaces G observadas entre duas cópias da SEPT7 humano e Pnut de *Drosophila* (a interface central do hexâmero). Foi observado que os resíduos Glu58 e Lys173 em SEPT7 humana participam de uma rede de pontes salinas na região central da interface G e parecia ser importante para a sua estabilidade. Entretanto, em *D. melanogaster*, estes resíduos são substituídos por Ala150 e Leu266 respectivamente, com perda consequente das pontes salinas. Com base nestas observações e com o intuito de estudar a importância desta rede de interação foram desenhadas novas construções para Pnut(G) (chamado Pnut(G)_{mut}) contendo a substituição dos resíduos de A150 e Leu266 por Glu e Lys respetivamente. Este mutante foi estudado experimentalmente como mencionado anteriormente. Em paralelo, as mesmas mutações foram aplicadas ao modelo de Pnut(G) para gerar um modelo estrutural de Pnut(G)_{mut}. O mesmo procedimento foi aplicado ao modelo de SEPT7(G) humano no sentido inverso introduzindo as mutações Glu58A e Lys173L para gerar um modelo para SEPT7(G)_{mut}. O objetivo era de estudar computacionalmente

impacto das mutações na estabilidade a formação de dímeros. Para tal, modelos para os homodímero de Pnut(G)_{mut} e SEPT7(G)_{mut} foram gerados, empregando uma interface G.

As interfaces G geradas pela modelagem computacional ou determinadas por cristalografia (no caso do dímero Sep1(G).Sep2(G)) ou ainda já disponível no PDB, foram analisadas usando o programa PISA que calcula de forma teórica a força de interação, área de interface, energia livre de interação, energia total, número de pontes salinas dentre outros parâmetros que podem ser utilizados para uma avaliação de estabilidade de um complexo. (109)

Posteriormente, foram realizados estudos com a finalidade de investigar por meio da Dinâmica Molecular (DM) as características gerais de complexos de septinas, como flexibilidade e comportamento de domínios ao longo do tempo. As análises foram realizadas para o hexâmero de *D. melanogaster* e de humanos com a finalidade de se estudar quais as principais características dinâmicas dos oligômeros. Esta abordagem foi realizada construindo hexâmeros com a presença de uma porção específica que conecta a hélice α_0 ao N-terminal, conhecida como “hook-loop” (HL). Esta porção conecta o motivo rico em prolina não estruturado à hélice α_0 , especialmente uma fenilalanina presente nessa região. Os complexos foram construídos por meio da modelagem por homologia com o uso do programa MODELLER 10.1. (108)

2.8.2 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR

Uma vez obtidos os modelos estruturais para o hexâmero humano (SEPT2(G).SEPT6(G).SEPT7(G).SEPT7(G).SEPT6(G).SEPT7(G)) e de *Drosophila* (Sep1(G).Sep2(G).Pnut(G).Pnut(G).Sep2(G).Sep1(G)), prosseguiu-se com a simulação computacional por Dinâmica Molecular (DM). Os estudos de dinâmica molecular foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP).

A técnica de Dinâmica Molecular tem como base o cálculo da evolução temporal da posição atômica das partículas. Esta técnica foi empregada inicialmente por Martin Karplus ao descrever pela primeira vez as interações entre moléculas com a dinâmica molecular de proteínas. (36,110,11) Sua contribuição para o campo de simulação computacional foi de tamanha importância ao ponto de ser posteriormente reconhecido conferindo-lhe o Prêmio Nobel de Química de 2013. Desde então com o avanço da computação, cada vez mais esta técnica é utilizada com maior acurácia nos resultados obtidos.

A dinâmica molecular é muitas vezes requerida como complementação de estudos experimentais, seja para reforçar hipóteses já existentes, ou para iniciar novas pesquisas. Os estudos de DM em proteínas podem auxiliar na compreensão de movimentos moleculares importantes para interações e realização de funções biológicas no contexto celular.

Campos de Força

A evolução temporal descrita pelos diferentes métodos de DM consiste na determinação espacial de um grande conjunto de pontos no espaço tridimensional cujas dimensões são da ordem de átomos. Estes átomos compõem as macromoléculas, que por sua vez possuem interações entre si e obedecem a movimentos moleculares com certas restrições compreendidas por potenciais empíricos. Estes potenciais atuam de forma conjunta compõem o chamado *campo de força*.

Entre os campos de força mais tradicionais, destacam-se os campos CHARMM (112), OPLS-UA (113), OPLS-AA (114), GROMOS96 (115), e AMBER (116). Os campos de força foram utilizados em diversos momentos deste trabalho de doutorado, seja na utilização do MODELLER, *AlphaFold* bem como nas simulações de Dinâmica Molecular. O campo de força escolhido para as simulações e dinâmica molecular foi o AMBER (116). O campo de força AMBER propõe-se a resolver a seguinte equação de potencial (117):

$$V(r)^N = \sum_{\text{ligações}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torções}} \sum_n \left(\frac{1}{2}\right) k_\phi [1 + \cos(\eta\phi - \delta)] + \sum_{\text{pares não ligados}} \left\{ \left[\left(\frac{A}{r}\right)^{12} - \left(\frac{C}{r}\right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

Verifica-se que este potencial se trata de uma contribuição de diferentes termos. O primeiro termo, termo de ligações, é um potencial que está relacionado com a energia covalente de ligação entre os átomos e possui aproximação bem representada pelo potencial clássico do tipo massa-mola. Este termo é dependente de uma constante k_b e uma distância de equilíbrio b_0 que são dependentes do tipo de campo de força. O segundo termo de ângulos infere a energia de deformações angulares inerentes destas ligações covalentes (ângulos de três átomos). Mais uma vez pode ser feita a aproximação por um oscilador harmônico onde há uma relação entre a constante de força k_θ e o ângulo de equilíbrio θ_0 . O terceiro termo das torções acrescenta a

energia das torções, ou movimentos diedrais. Os parâmetros k_ϕ e δ são determinados de forma empírica para cada campo de força utilizado. Já o último termo adiciona as energias entre átomos *não-ligados* (ou não-covalentes) entre todos os N átomos do sistema, sendo representado pelo potencial de *Van der Waals* (potencial *Lennard-Jones*) e potencial eletrostático de *Coulomb*.

A força total sobre cada partícula pode ser calculada para cada instante t como soma vetorial das contribuições desta com todas as demais partículas da forma:

$$F = -\nabla V(r_i) \text{ e } a = \frac{F}{m_i}$$

Ou seja, uma vez obtida a força aplicada em cada partícula, conhecendo sua massa m_i é possível integrar as equações de movimento de Newton para a obtenção da nova posição da partícula no instante de tempo $(t + \Delta t)$. Há uma diversidade de algoritmos propostos para a determinação da posição $x_i(t + \Delta t)$, dentre os quais podemos citar o *leap-frog*, *Verlet* e *velocity-Verlet*. (118-120)

Desta forma, o sistema é reduzido a um problema cuja complexidade de resolução é maior conforme maior é o número N de átomos, com solução dependente de condições iniciais (geralmente é utilizado $t=0$ e $v_i(0)=0$).

A análise dos resultados pode se dar de maneira qualitativa por meio da inspeção gráfica das representações atômicas das moléculas. Para isto, utilizou-se o programa VMD 1.9.3. (121)

2.8.3 ANÁLISES DE DINÂMICA MOLECULAR DIRECIONADA ADAPTATIVA (ASMD)

A Dinâmica Molecular Direcionada Adaptativa do inglês *Adaptive Steered Molecular Dynamics of biomolecules (ASMD)*, é uma variante da Dinâmica Molecular Direcionada (SMD) na qual a condução da partícula auxiliar – ou seja, direcionada – é realizada em etapas. (122)

Esta técnica foi utilizada para analisar a dificuldade de separação dos monômeros que compõe os dímeros centrais dos hexâmeros (Pnut(G).Pnut(G) e SEPT7(G).SEPT7(G)) e seus mutantes (Pnut(G)_{mut}.Pnut(G)_{mut} e SEPT7(G)_{mut}.SEPT7(G)_{mut}), auxiliando na compreensão da

relevância dos resíduos que formam a rede de pontes salinas na região central da interface G. Os experimentos foram conduzidos com a finalidade de realizar a separação de cada metade do dímero sob velocidade constante. Foi aplicada uma força externa sobre o sistema sobre o centro de massa de cada monômero $Pnut(G)$ e $Pnut(G)_{mut}$ de *Drosophila* bem como para SEPT7(G) e SEPT7(G)_{mut} em humanos. Ao garantir a condição de velocidade constante, a força necessária para a separação dos dímeros varia conforme a distância entre os centros de massas, e, portanto, é gerado um trabalho. Quanto mais interagente é o sistema, maior é a força necessária a ser aplicada para garantir a separação. Na Figura 13 é possível observar uma ilustração do princípio por trás desta simulação.

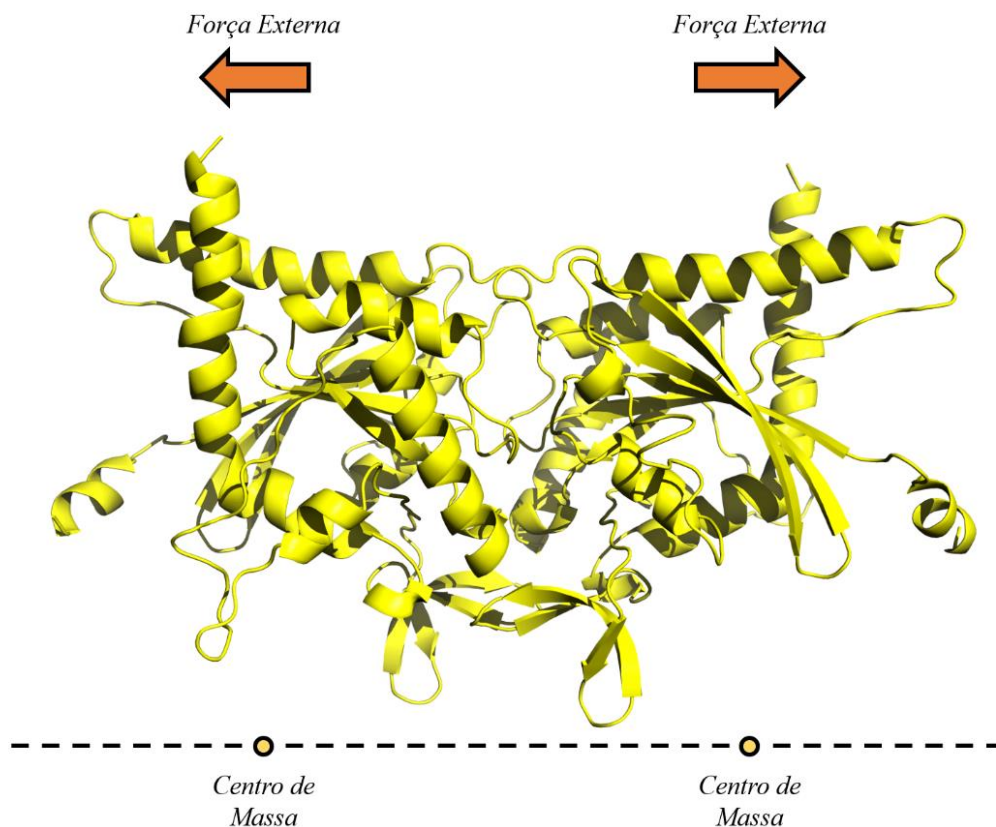


Figura 13 - Princípio de simulação por ASMD. Para este experimento, foram aplicadas forças constantes sobre o centro de massa de cada metade do complexo, com a finalidade de inferir a energia necessária para a separação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No ASMD, a coordenada de reação predeterminada é dividida em segmentos, comumente chamados de estágios, dentro dos quais a SMD é realizada e é calculada ao longo do estágio, de forma adaptativa. Entre as etapas, uma única trajetória é selecionada de acordo com aquela cujo valor de trabalho foi o mais próximo da média. Este cálculo seccional permite

a convergência para uma trajetória média evitando divergência de trajetórias em pontos extremos. (122,123) As coordenadas no final do estágio da trajetória selecionada são usadas para inicializar o próximo estágio das trajetórias SMD. O ASMD foi desenvolvido para estender a aplicabilidade das simulações SMD clássicas (122) e oferece a promessa de obter eficientemente a Potencial de Força Média (PMF) ao longo de uma coordenada escolhida diretamente sem tais acelerações, confiando em perturbações direcionadas do sistema. (124)

Inicialmente foram realizados diversos testes para a determinação de forças cujas ordem de grandeza permitissem a simulação, ou seja, nem intensas demais para separar o sistema de imediato, nem fracas demais de forma que não cause separação. A partir disto, foram calculadas as forças e o PMF necessários para a separação dos dímeros, a partir do seu centro de massa.

Posteriormente, os experimentos baseados em simulações em que 8 janelas foram empregadas, nas quais a força externa visava afastar os centros de massa dos monômeros em 2 Å em cada janela, totalizando um afastamento total de 16 Å e com uma velocidade constante de 10 Å/ns. Em cada janela, 10 simulações independentes são realizadas e o trabalho realizado para cada simulação é calculado ao final. A simulação cujo trabalho calculado era mais próximo à média dos trabalhos era utilizada como ponto inicial da próxima janela. As simulações foram feitas usando o pacote AMBER e campo de força AMBER FF19SB.

2.8.4 PREPARAÇÃO PARA A DINÂMICA MOLECULAR

Para todos os modelos empregados neste trabalho, a preparação dos sistemas para a simulação da dinâmica molecular adotou os mesmos procedimentos. As coordenadas atômicas foram inicialmente submetidas ao servidor PDB2PQR (125) para uma estimativa mais precisa dos estados de protonação das cadeias laterais. O arquivo final foi salvo em formato PDB e combinado às coordenadas atômicas contendo os nucleotídeos e átomos de magnésio. O sistema foi parametrizado com o campo de força AMBER FF19SB. (126) O mesmo campo de força foi empregado para os parâmetros de *Lennard-Jones* para os átomos de magnésio. Já os nucleotídeos GDP e GTP foram parametrizados com os parâmetros obtidos por Richard Bryce, da Universidade de Manchester. (127)

O sistema composto por proteínas, nucleotídeos e íons foi imerso em uma caixa de solvente explícito OPC, mantendo 20 Å de espaço entre o sistema e o limite da caixa de

solvatação para as simulações de ASMD ou 12 Å para as simulações de equilíbrio. Finalmente, íons de sódio e cloreto (Na^+ e Cl^-) foram adicionados de forma aleatória ao sistema solvatado de forma a atingir uma concentração final de 150 mM de NaCl e, ao mesmo tempo, neutralizar as cargas formais do sistema. (128) Os sistemas solvatados consistem em aproximadamente 160.000 átomos para os sistemas diméricos em caixas de solvatação de aproximadamente 135 x 110 x 86 Å. Já os sistemas hexaméricos consistiam em aproximadamente 500.000 átomos em caixas de solvatação de aproximadamente 280 x 170 x 90 Å. Toda a preparação do sistema foi realizada com o programa LEAP.

Finalmente, a abordagem de reparticionamento da massa do hidrogênio (*Hydrogen Mass Repartitioning*, HMR) (129) foi empregada para que passos de 4 fs pudessem ser utilizados de forma eficiente nas simulações de dinâmica molecular dos sistemas hexaméricos. Para esta finalidade, os arquivos de topologia e parâmetros (prmtop) foram modificados com o programa ParmEd (130) para alterar as massas atômicas, de acordo com a abordagem HMR.

2.8.5 SIMULAÇÕES DE EQUILÍBRIO

As simulações foram iniciadas com a minimização energética do sistema em 4.000 passos de minimização por *steepest descent* seguidos de 4.000 passos de minimização por gradientes conjugados. Nesta etapa, as proteínas e nucleotídeos foram restritas com um potencial harmônico com peso de 2.0 kcal/(mol.Å²). Em seguida, o sistema foi aquecido até 300 K em 50 ps de simulação utilizando um ensemble de temperatura e volume constantes (NVT) e mantendo o potencial harmônico sobre proteínas e nucleotídeos. Na sequência, a densidade do sistema foi equilibrada em 50 ps de simulação utilizando um ensemble de temperatura e pressão constantes (NPT) e mantendo a restrição harmônica sobre proteínas e nucleotídeos, porém com peso de 1.0 kcal/(mol.Å²). Ao final, o sistema é equilibrado por 2 ns de simulação NPT em qualquer restrição, seguido pela simulação produtiva de 500 ns.

O passo da simulação foi definido em 4 fs, de acordo com a estratégia HMR. A pressão foi mantida constante em 1 bar com o barostato de Monte Carlo. Já a temperatura foi mantida a 300 K com um acoplamento a um banho térmico com um tempo de relaxação de 10 ps⁻¹. Um cutoff de 8.0 Å foi empregado para o cálculo das energias de *Van der Waals* (*Lennard-Jones*) e para o cálculo direto das energias eletrostáticas. Fora da distância de 8.0 Å, as energias eletrostáticas foram calculadas pelo método de PME (*Particle-Mesh Ewald*). (131)

Todas as simulações foram realizadas com os programas do pacote AMBER 20, incluindo os programas SANDER e PMEMD em suas versões voltadas à execução em GPU. (132-133)

2.8.6 ANÁLISES DAS SIMULAÇÕES

As trajetórias obtidas foram analisadas com os programas CPPTRAJ (134) para análises geométricas (distâncias, ângulos, etc...), bem como para o espelhamento das trajetórias na caixa de simulação e ajuste (*fit*) para a remoção da translação e rotação do sistema. Para o estudo da tendência de movimento do hexâmero humano ao longo da trajetória, recorreu-se ao método de Análise de Componentes Principais ou PCA (do inglês *Principal Component Analysis*) também implementada no programa CPPTRAJ. (134-136) A PCA é uma técnica que pode ser usada para transformar uma série de observações potencialmente coordenadas em um conjunto de vetores ortogonais chamados de componentes principais (PCs). O PCA é feito de forma que o primeiro PC mostre a maior variância nos dados, o segundo PC mostre a segunda maior e assim por diante. A entrada para o PCA neste estudo foi a matriz de covariância de coordenadas calculada a partir da série temporal de coordenadas posicionais 3D do hexâmero de septinas humanas, de modo que os PCs representarão certos modos de movimento sofridos pelo sistema, com o primeiro PC representando o movimento dominante. (135-136)

As energias potenciais de interação foram calculadas com os programas AmberEnergy++ (137) e MMPBSA.py (138) empregando os parâmetros do arquivo de topologia/parâmetros (prmtop) de cada sistema. As imagens foram geradas nos programas VMD (121) e UCSF Chimera. (139)

Capítulo 3
Caracterização Biofísica

3.1 OBTENÇÃO DAS SEPTINAS DE *D. melanogaster*

Os plasmídeos comerciais contendo os genes referentes às proteínas inteiras Sep1(NGC), Sep2(NGC), Sep4(NGC), Sep5(NGC) e Pnut(NGC) bem como seus truncamentos contendo apenas a porção GTPase foram incorporados ao vetor pET-28a(+). Estes plasmídeos foram inicialmente transformados em cepa de bactéria *E. coli* Rosetta (DE3) para a realização das etapas de testes de expressão e purificação. Após realizada a purificação por afinidade, as amostras foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular. Os resultados após SEC para os dois grupos de proteínas podem ser verificados na Figura 14.

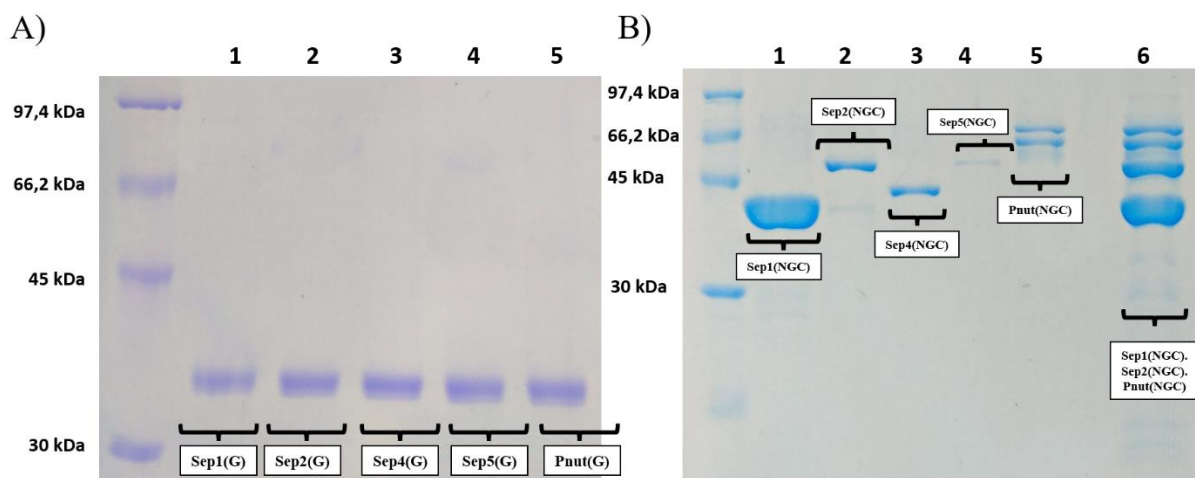


Figura 14 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% resultante da purificação das septinas de *D. melanogaster*. Domínios G após SEC: A) 1- Sep1(G); 2- Sep2(G); 3- Sep4(G); 4- Sep5(G); 5- Pnut(G). B) Proteínas inteiras após SEC: 1- Sep1(NGC); 2- Sep2(NGC); 3- Sep4(NGC); 4- Sep5(NGC); 5- Pnut(NGC); 6- Complexo Sep1(NGC).Sep2(NGC).Pnut(NGC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, a Pnut(NGC) possui duas bandas no gel. Este comportamento também é observado para a proteína equivalente SEPT7 em humanos, devido a uma degradação que esta proteína sofre em sua porção C-terminal. (64,140-142) Embora pouco se saiba sobre o mecanismo e a motivação desta degradação, sabe-se que, mesmo na presença de moléculas degradadas da SEPT7, há a formação de complexos humanos do tipo SEPT2.SEPT6.SEPT7. Observou-se aqui a formação do equivalente complexo Sep1.Sep2.Pnut para *D. melanogaster*. (142) As septinas aqui analisadas foram obtidas com taxas de expressão suficiente para prosseguir com os experimentos de caracterização biofísica.

Os resultados da cromatografia de exclusão molecular podem ser verificados na Figura 15A. No caso das septinas correspondentes ao domínio G, há a presença de dois picos para Sep1(G), Sep4(G), e Pnut(G), sendo um deles com volume de eluição em torno de 75 mL e o segundo em torno de 85 mL (Figura 15A). A presença destes dois picos sugere a co-existência de duas populações em solução para estas proteínas – monômeros e dímeros. Já para Sep2(G) e Sep5(G), observa-se apenas um pico. Este comportamento também é verificado em septinas humanas (30,61,62,65), e é um resultado consistente que aparentemente distingue entre proteínas cataliticamente ativas (Sep1(G), Sep4(G) e Pnut(G)) e inativas (Sep2(G) e Sep5(G)). A Figura 15B apresenta um comportamento semelhante. As Sep1(NGC) e Sep4(NGC) possuem seu primeiro pico em torno de 18 mL e Pnut(NGC) tem seu primeiro pico de eluição em torno de 16 mL. Já o segundo pico destas três proteínas mencionadas se encontra em torno de 22 mL. No caso de Sep2(NGC) e Sep5(NGC), verifica-se apenas um pico em torno de 22 mL. Este único reproduz os aspectos verificados para septinas não-catalíticas Sep2(G) e Sep5(G).

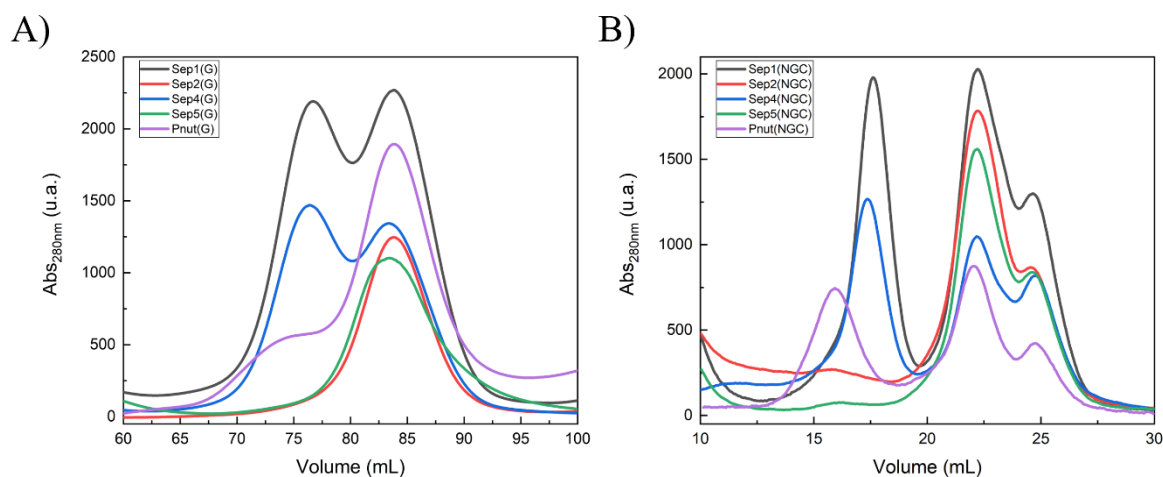


Figura 15 - Análise da purificação das proteínas por meio de cromatografia de exclusão molecular em 280 nm. A) Perfil de purificação para proteínas compostas apenas pelo domínio GTPase. B) Perfil de purificação para proteínas inteiras (NGC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez obtidos todas as proteínas de forma individual, passou-se a analisar a formação de complexos. Em um primeiro momento, foi realizada a mistura de células contendo Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC) após as etapas de expressão. Após realizada a lise celular, o complexo foi purificado por cromatografias de afinidade e exclusão molecular. O acompanhamento da purificação pode ser verificado pela Figura 16.

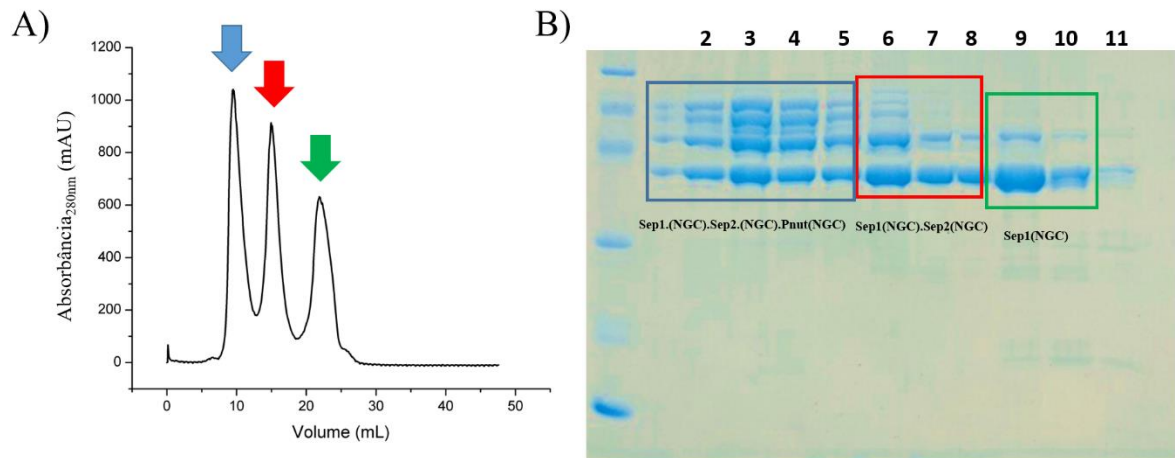


Figura 16 - Purificação do complexo hexamérico de *Drosophila melanogaster* Sep1(NGC).Sep2(NGC).Pnut(NGC).Pnut(NGC).Sep2(NGC).Sep1(NGC). A) Perfil cromatográfico de exclusão molecular realizada em coluna *Superdex* 200 10/30 GL em que são verificados três picos, indicados pelas setas em azul, vermelho e verde. B) Análise em gel de SDS/PAGE 15% de cada um dos picos sendo mantido o mesmo padrão de cores. No quadro em azul, verificamos a presença de Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC). No quadro em vermelho a presença de Sep1(NGC) e Sep2(NGC), já no quadro verde, encontra-se somente Sep1(NGC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser verificado, o cromatograma em que a absorbância em 280 nm foi registrada apresenta três picos. Estes picos foram analisados um a um por um gel de poliacrilamida, sendo possível constatar que no primeiro pico, por volta de 10 mL, se encontram as proteínas Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC), incluindo a forma degradada, o que justifica a banda adicional observada. Já no segundo pico (~13 mL), se encontram as proteínas Sep1(NGC) e Sep2(NGC). Por fim, no último pico, por volta de 22 mL, foi encontrado majoritariamente a Sep1(NGC). Estes resultados sugerem a formação do heterocomplexo, sendo que a proteína Sep1(NGC) se apresenta em excesso. A fração correspondente à presença das três proteínas foi coletada e tratada de acordo com Fernandes *et al.* (143), e então testada por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo nas dependências do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) - DEMa/UFSCar. Entretanto, não foi possível obter dados com qualidade suficiente para a caracterização do complexo, e esta via de estudo foi pausada temporariamente.

Posteriormente, foi realizada a produção de heterodímeros do Grupo II e Grupo III bem como para Pnut_{mut}, agora usando apenas os domínios G. As amostras provenientes da purificação por SEC foram monitoradas por gel de SDS/Page 15% contendo alíquotas de amostras coradas com coomassie. Os resultados para a purificação destes dímeros podem ser verificados na Figura 17. Foi explorado o fato de que Sep2(G) e Sep5(G) foram construídas de

maneira a possuir uma cauda de hexahistidinas, a qual interage com o níquel da coluna, e a copurificação é realizada caso esta esteja ligada com seu parceiro de interação. Já Pnut_{mut}, foi inserida em vetor pET28, sendo que cada cópia do dímero possui a His-Tag. Para isto, os dímeros foram submetidos a uma nova etapa de cromatografia por exclusão molecular, com a finalidade de separar por tamanho e massa molecular. Estes cromatogramas podem ser observados na Figura 17.

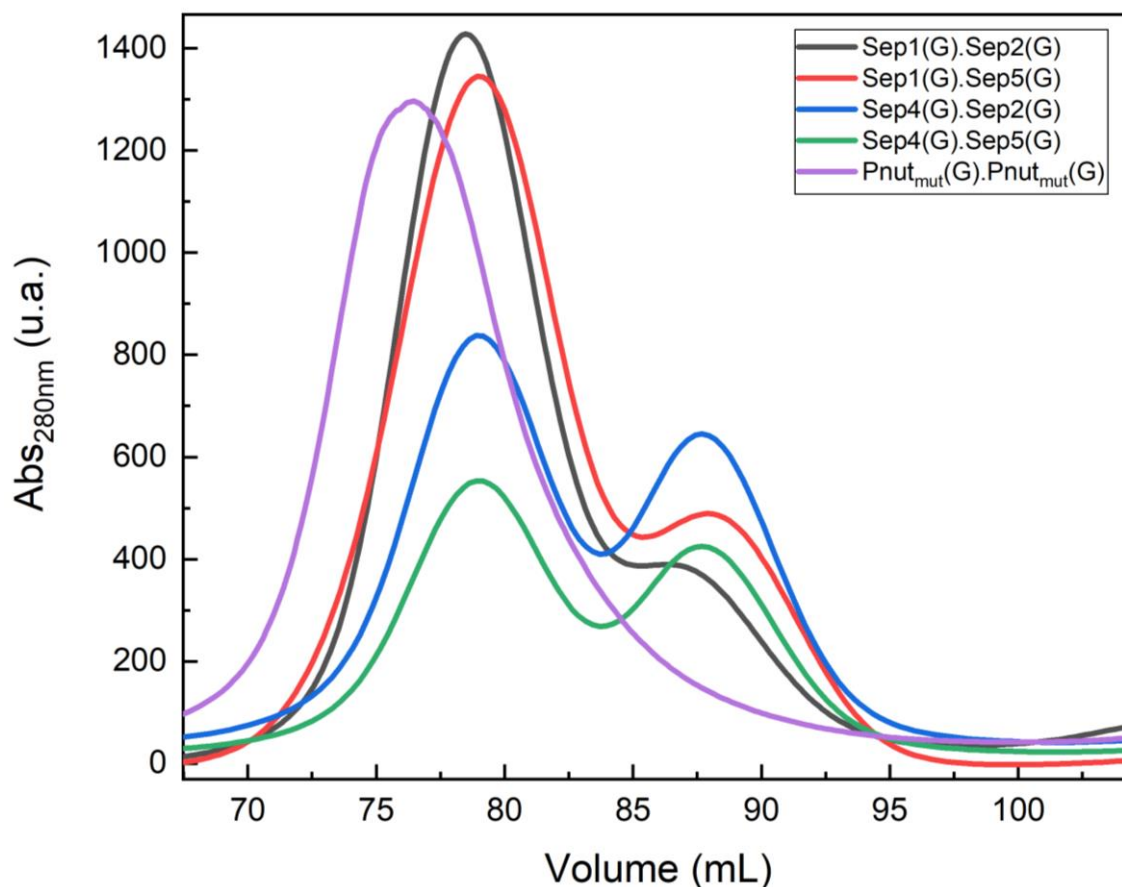


Figura 17 - Análise da purificação das combinações heterodímeros do Grupo II, Grupo III e Pnut_{mut}.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a etapa de purificação, constatou-se a presença de dois picos principais no cromatograma em 280 nm. Os dois picos foram coletados, sendo o primeiro identificado no volume de eluição de aproximadamente 80 mL e o segundo por volta de 88 mL. Estas amostras sugerem a presença de dímeros e monômeros, respectivamente, as quais foram empregadas em experimentos subsequentes. O sucesso da copurificação se deu pelo fato de que, devido a cauda de His-Tag estar ligada em Sep2(G) ou Sep5(G), ainda foi possível obter heterodímeros destas proteínas ligadas a Sep1(G) e Sep4(G). Este resultado se sustenta pelo fato de que Sep2(G) e

Sep5(G) quando purificados são encontrados apenas na forma de monômeros (Figura 15), desta forma, a purificação desta comontagem trouxe consigo os respectivos parceiros de interação (Figura 17).

Vale ressaltar que para o caso de Pnut_{mut}, foi apresentado apenas um pico por volta de 80 mL correspondendo a uma população composta por homodímeros. Este comportamento é interessante, uma vez que Pnut nativa possui duas populações referente a dois picos (monômeros e dímeros, Figura 15A), já quando realizada a mutação, esta proteína se apresenta mais estável unicamente na forma de dímeros. Este resultado sugere que a introdução em Pnut dos resíduos que formam a rede de pontes salinas em SEPT7 humana, induz a estabilização da interface G e, portanto, a forma dimérica.

3.2 INVESTIGAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO EM SOLUÇÃO POR MEIO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR ACOPLADA AO ESPALHAMENTO DE LUZ A MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS)

Como o objetivo de investigar a massa das diversas amostras obtidas até o momento bem como o estado oligomérico, recorreu-se à técnica de SEC-MALS. Para este experimento, foram testadas todas as combinações referentes às construções compostas por domínio G, a saber, heterodímeros e proteínas separadas (dímeros e monômeros) de *Drosophila* bem como Pnut_{mut}(G). No caso de amostras que renderam dois picos na cromatografia anterior (Sep1(G) e Sep4(G), Figura 15A) os dois picos foram aplicados separadamente e são indicados “dímero” e “monômero”. Os resultados de SEC-MALS para os picos referentes à cada população podem ser verificados na Figura 18.

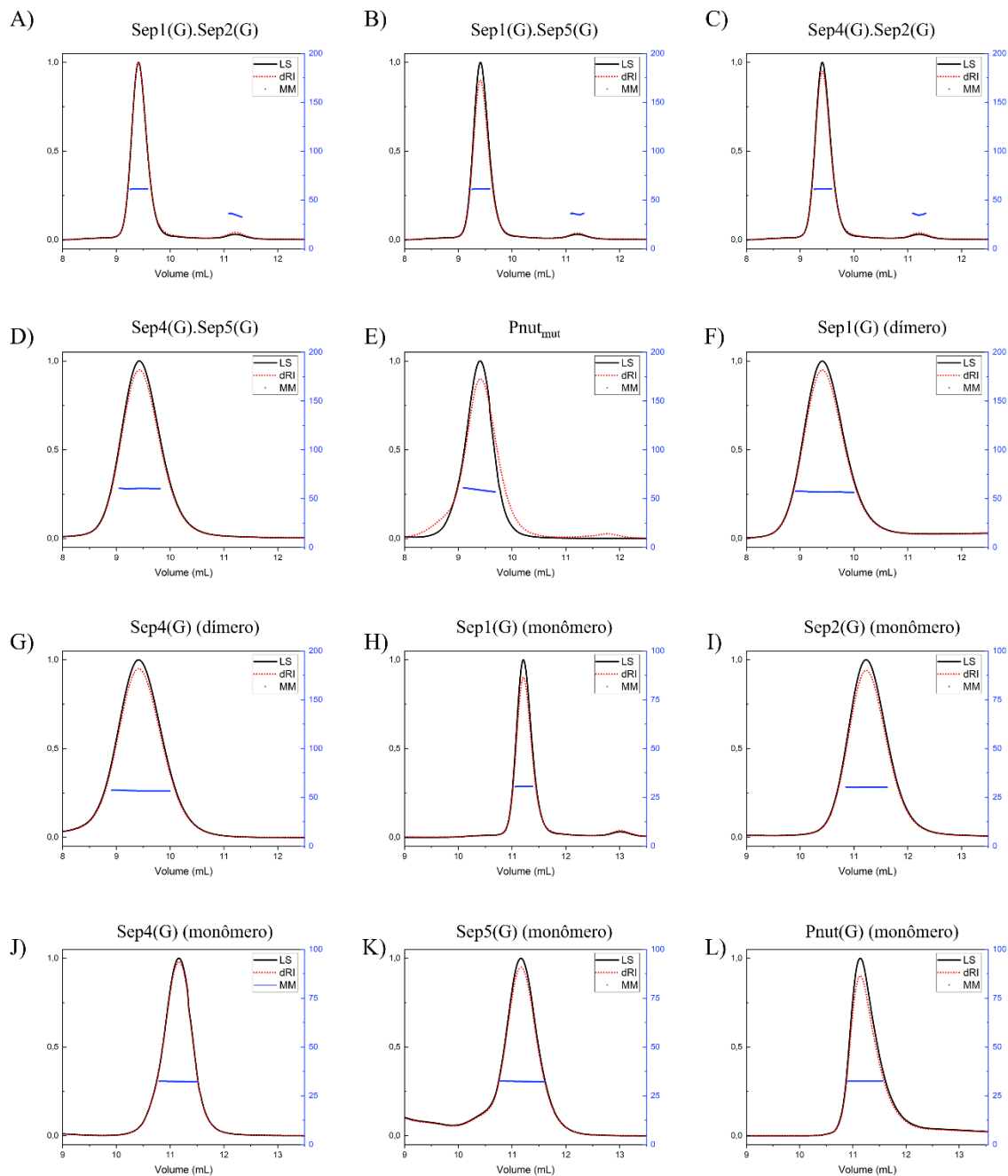


Figura 18 - Cromatogramas obtidos por SEC-MALS para as construções contendo o domínio GTPase de *Drosophila melanogaster*. Verifica-se o espalhamento de luz a 90° normalizado (LS), índice de refração diferencial normalizado (dRI) e as massas moleculares (em azul). A) Sep1(G).Sep2(G); B) Sep1(G).Sep5(G); C) Sep4(G).Sep2(G); D) Sep4(G).Sep5(G); E) Pnut_{mut}; F) Sep1(G).Sep1(G); G) Sep4(G).Sep4(G); H) Sep1(G) (monômero); I) Sep2(G) (monômero); J) Sep4(G) (monômero); K) Sep5(G) (monômero); L) Pnut(G) (monômero).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa ASTRA (Wyatt Technology Corporation) (144), sendo possível então calcular a massa corresponde ao pico majoritário de cada uma das amostras, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Massa molecular teórica e calculada pelo SEC-MALS para as diversas amostras de septinas.

Amostra	Massa Molecular Teórica (kDa)*	Massa Molecular Calculada por SEC-MALS (kDa)	Estado Oligomérico
Sep1(G).Sep2(G)	63,3	65,3 ± 0,9	Dímero
Sep1(G).Sep5(G)	63,7	66,8 ± 0,8	Dímero
Sep4(G).Sep2(G)	64,5	64,9 ± 0,7	Dímero
Sep4(G).Sep5(G)	64,6	66,8 ± 0,5	Dímero
Pnut _{mut} (G).Pnut _{mut} (G)	69,4	72,3 ± 0,5	Dímero
Sep1(G).Sep1(G)	65,8	70,1 ± 0,4	Dímero
Sep4(G).Sep4(G)	67,2	69,9 ± 0,3	Dímero
Sep1(G)	32,9	35,9 ± 0,4	Monômero
Sep2(G)	33,7	36,9 ± 0,5	Monômero
Sep4(G)	33,6	35,9 ± 0,3	Monômero
Sep5(G)	31,8	33,9 ± 0,3	Monômero
Pnut(G)	32,2	33,4 ± 0,4	Monômero

* Já considerando a massa de hexa-histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na Figura 18 e Tabela 4, todas as combinações analisadas foram observadas com massas moleculares próximas aos valores teóricos esperados e em suas formas diméricas ou monoméricas em solução, fato este comprovado devido a presença de um pico majoritário para cada uma das amostras. Nos casos de Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G) e Sep4(G).Sep2(G) (Figura 18), verifica-se a presença de um pico adicional indicando uma pequena quantidade de monômeros além do heterodímero. O segundo pico pode estar relacionado a dissociação dos heterodímeros durante o experimento, e o mesmo comportamento também é encontrado para experimentos realizados com heterodímeros de septinas humanas. (61,62)

De forma geral, os resultados de SEC-MALS confirmaram o que era proposto por cromatografia de exclusão molecular (SEC), tornando possível a caracterização de dímeros e

monômeros das proteínas analisados por meio da quantificação das massas moleculares. Este experimento serviu para garantir o conhecimento do estado oligomérico de cada amostra a ser analisada nos demais experimentos.

3.3 ANÁLISE DO ENOVELAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA POR ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

A fim de investigar o enovelamento em solução, recorreu-se à técnica de dicroísmo circular. Os espectros obtidos por CD possuem mínimos em 222 e 208 nm está de acordo com os espectros provenientes de proteínas com estruturas do tipo $\alpha\beta$ em que há predominância do sinal referente às contribuições de hélices- α . Este perfil é condizente com a literatura, uma vez que septinas pertencem ao grupo das *P-loop GTPases*. O espectro entre todas as proteínas é similar, o que reflete o fato de que o conteúdo de elementos de estrutura secundária possui elevado grau de conservação no domínio G de septinas. Os mínimos de CD em 222 nm foram monitorados, e realizada uma curva de desnaturação para cada amostra analisada, o qual pode ser verificada na Figura 19. No caso de Sep1(G), Sep4(G) e Pnut, tanto a forma monomérica quanto dimérica (Figura 15A) foram analisadas. As formas diméricas são indicadas como Sep1(G).Sep1(G) etc.

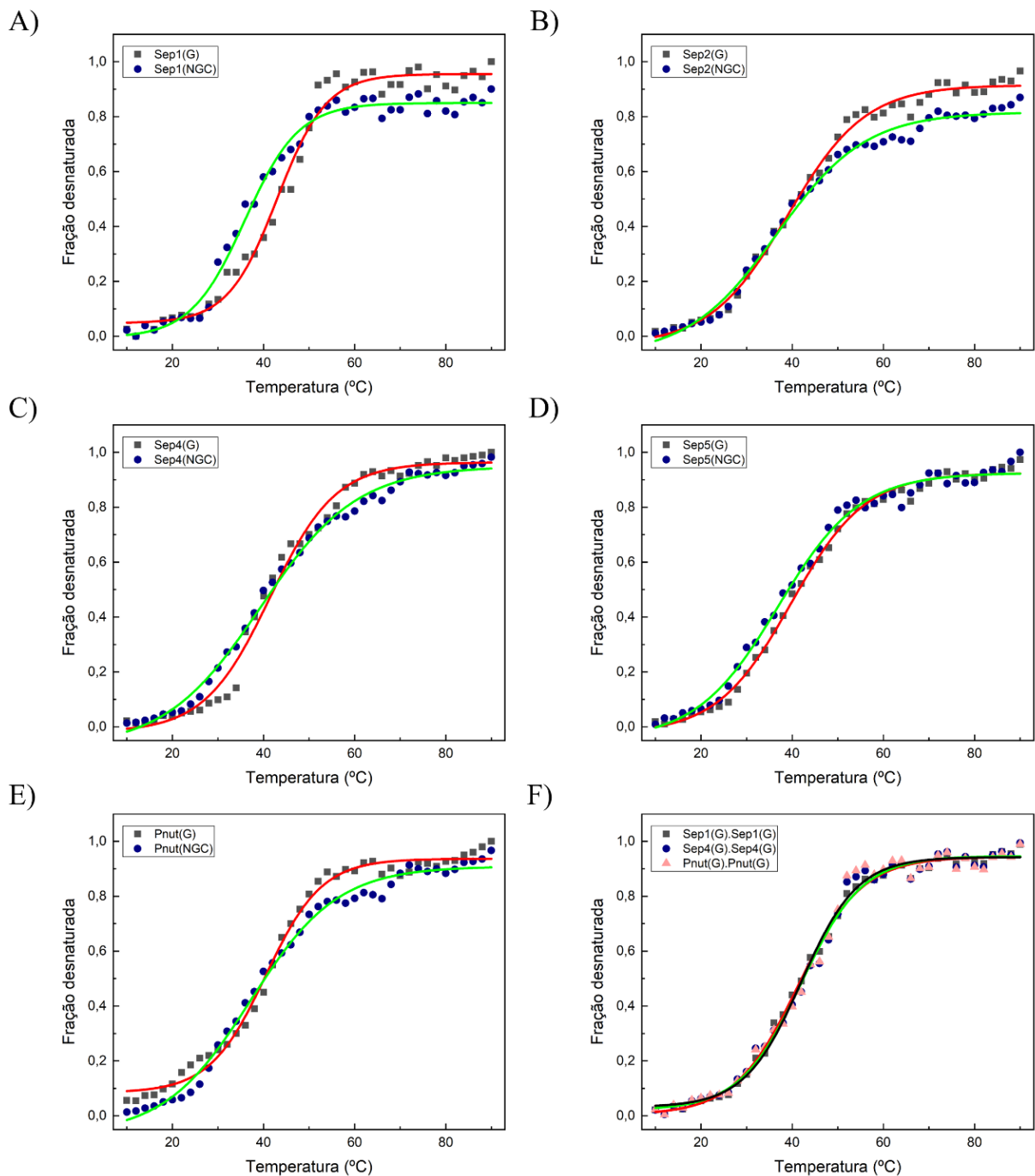


Figura 19 - Curva de desnaturação obtida por CD através de variação térmica para as formas monoméricas NGC e G para A) Sep1; B) Sep2; C) Sep4; D) Sep5; E) Pnut; F) Homodímeros Sep1(G).Sep1(G), Sep4(G).Sep4(G) e Pnut(G).Pnut(G). O ajuste sobre a curva foi realizado pela função de *Boltzmann* para os mínimos em 222 nm para proteínas inteiras (em verde) e para os domínios G (em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir do monitoramento do sinal de CD em 222 nm foi possível calcular o valor de T_M através do ajuste de *Boltzmann* para cada proteína analisada. Estes valores podem ser verificados na Tabela 5.

Tabela 5 - Temperatura de *melting* comparativa entre as proteínas individuais de drosófila.

Proteína	T_M (°C)	Erro (°C)
Sep1(G)	42,9	0,5
Sep1(NGC)	35,9	0,5
Sep2(G)	39,0	0,5
Sep2(NGC)	36,6	0,8
Sep4(G)	41,4	0,5
Sep4(NGC)	39,4	0,6
Sep5(G)	39,7	0,4
Sep5(NGC)	36,9	0,7
Pnut(G)	40,5	0,4
Pnut(NGC)	37,2	0,7
Sep1(G).Sep1(G)	41,3	0,3
Sep4(G).Sep4(G)	42,0	0,4
Pnut(G).Pnut(G)	42,0	0,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Verifica-se os valores de T_M são muito próximos entre si (a maior parte por volta de 40 °C) e em geral a construção incluindo os domínios N e C (NGC) são um pouco menos termoestáveis. Não há diferença significativa entre as formas monoméricas e diméricas para Sep1, Sep4 e Pnut.

Da mesma maneira, foram realizados ensaios de variação térmica por meio do dicroísmo circular para os heterodímeros. Para critério de maior comparação, os dados foram confrontados com os resultados obtidos para os heterodímeros humanos SEPT2(G). SEPT11(G), SEPT2(G). SEPT8(G), SEPT4(G).SEPT11(G), e SEPT2(G).SEPT6(G), descritos por Leonardo *et al.* (62) As curvas representando as frações desnaturadas em função da temperatura pode ser verificada na Figura 20.

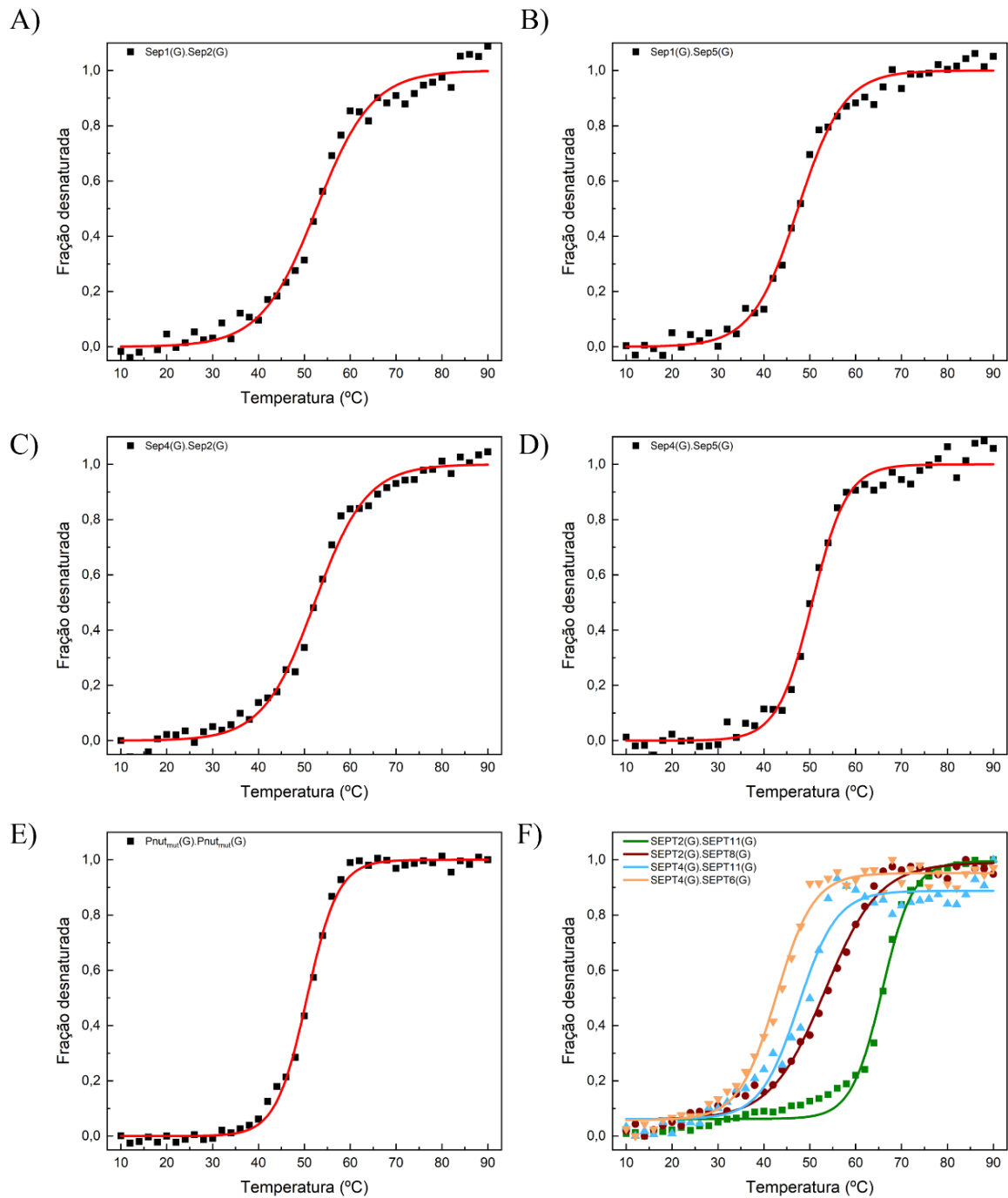


Figura 20 - Curva de desnaturação obtida por CD através de variação térmica para: A) Sep1(G).Sep2(G); B) Sep2(G).Sep5(G); C) Sep4(G).Sep2(G); D) Sep4(G).Sep5(G); E) Pnut_{mut}(G).Pnut_{mut}(G); F) Dímeros humanos utilizados com T_M conhecido como referência: SEPT2(G)SEPT11(G), SEPT2(G).SEPT8(G), SEPT4(G).SEPT11(G)) e SEPT4(G).SEPT6(G). O ajuste sobre a curva foi realizado pela função de *Boltzmann* para os mínimos em 222 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao processar os dados de CD por meio do ajuste de *Boltzmann*, obteve-se a temperatura de *melting* calculada para estas amostras, como observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Temperatura de *melting* comparativa entre os heterodímeros de drosófilas e alguns dímeros de humanos.

Proteína	T_M (°C)	Erro (°C)
Sep1(G).Sep2(G)	52,7	0,5
Sep1(G).Sep5(G)	47,4	0,4
Sep4(G).Sep2(G)	52,3	0,4
Sep4(G).Sep5(G)	50,5	0,3
Pnut _{mut} (G).Pnut _{mut} (G)	50,6	0,2
SEPT2(G).SEPT11(G)	65,8	0,6
SEPT2(G).SEPT8(G)	53,3	0,4
SEPT4(G).SEPT11(G)	47,6	0,3
SEPT4(G).SEPT6(G)	42,7	0,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o aquecimento até 90 °C, a temperatura do porta-amostra em que estavam as proteínas foi diminuída até 10 °C, e esperou-se por mais 5 min para o equilíbrio de temperatura e foi realizada uma nova medida de CD, variando o espectro de 195 nm a 200 nm. Esta nova medida revelou um sinal de estrutura secundária, ainda que menos intenso se comparado à mesma temperatura durante o aquecimento, indicando possível renaturação das proteínas, embora parcial. Os dados de T_M provindo de experimentos de CD para as septinas de *Drosophila melanogaster* e suas variações estão sintetizados na Figura 21 a seguir.

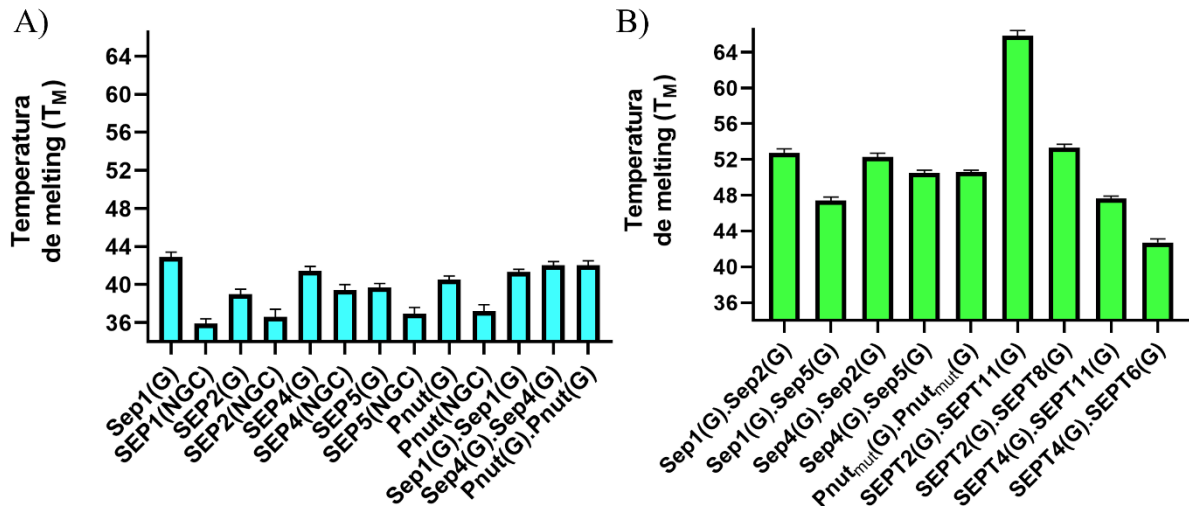


Figura 21 - Comparação dos diferentes T_M 's para: A) proteínas expressas de forma individual (T_M 's na faixa de 35,9 °C a 42,9 °C) e B) proteínas obtidas por co-expressão (T_M 's na faixa de 47,4 °C a 52,7 °C). O comparativo visual deixa claro que as proteínas obtidas por co-expressão são significativamente mais estáveis se comparado com as septinas obtidas de forma individual. No gráfico a esquerda, encontram-se os dados dos heterodímeros SEPT2(G).SEPT8(G), SEPT4(G).SEPT11(G) e SEPT4(G).SEPT6(G) de septinas humanas tomados como comparativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na figura anterior, os valores de T_M para as septinas individuais se apresentaram inferiores a 42,9 °C, enquanto que para os dímeros obtidos por meio da co-expressão apresentam T_M de pelo menos 47,4 °C no menor dos casos (Sep1(G).Sep5(G)). Estes resultados também estão condizentes com o que é observado para os dímeros humanos analisados, seguindo a ideia de que, na presença de seu parceiro de interação, o dímero tende a ficar mais termoestável do que se comparado com cada uma das proteínas de forma individual. Além disso, Pnut_{mut}(G) mostra uma variação no estado oligomérico em comparação com o tipo selvagem, purificando como dímero em solução (Figura 17), o que resultou em um ganho de ~8°C em sua T_M (Figura 21).

Estes resultados comprovam que as proteínas na forma de complexos se apresentam de forma mais estáveis do que quando analisadas de forma separada. Este resultado talvez não seja surpreendente dado que a forma fisiológica de atuação de septinas necessita da formação de interfaces específicas entre subunidades. Os estudos com os dímeros apresentados aqui mostram que, ao formar apenas uma das interfaces nativas, já há um ganho em estabilidade.

3.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE NUCLEOTÍDEOS

As septinas possuem funções celulares quando associadas na forma de filamentos, e, para isto é essencial a ligação e/ou hidrólise de nucleotídeos de guanina. (26,145,146) Desta maneira, a determinação da presença de nucleotídeos de origem bacteriana que já vem ligados durante a purificação bem como a taxa de hidrólise dos mesmos é essencial para a compreensão da dinâmica de formação destes complexos. (6,146)

Após desnaturadas as proteínas, o sobrenadante foi aplicado às análises de HPLC por meio de uma coluna de troca iônica e então foi monitorado o sinal em 253 nm. Inicialmente, foram determinadas curvas controles com concentrações conhecidas de GTP e GDP. A partir de então, foram analisados o conteúdo de nucleotídeo endógeno para as amostras contendo as septinas obtidas de forma individuais, e os complexos heterodiméricos (Figura 22).

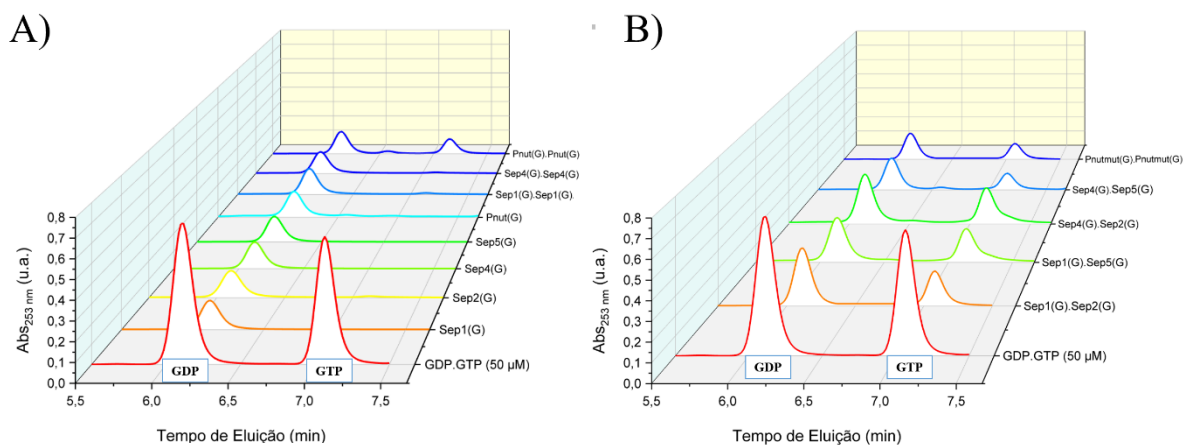


Figura 22 - Verificação do conteúdo de nucleotídeo co-purificado. A) Proteínas individuais; B) Heterodímeros de septinas e Pnut_{mut}.Pnut_{mut}.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, foi identificada a presença de GDP para todas as construções de septinas referentes ao domínio G. No caso do dímero Pnut(G).Pnut(G), além de GDP, também foi verificada a presença de GTP. Já para os heterodímeros, foi possível identificar a presença de GDP e GTP. Isso se deve ao fato de que as septinas do Grupo II (Sep2 e Sep5) devem estar ligadas ao GTP, enquanto que as septinas do Grupo III (Sep1 e Sep4) e Grupo IV (Pnut) devem estar ligadas ao GDP. Este comportamento assegura o fato de que na presença do parceiro de interação, o heterocomplexo traz consigo os dois tipos de nucleotídeo. Para as proteínas inteiras, foi verificado o mesmo tipo de comportamento.

Com exceção de Pnut(G).Pnut(G), a formação de heterodímeros estáveis era esperada com base no postulado de Kinoshita, como demonstrado para os homólogos de septinas humanas. (61) O estado oligomérico em septinas, principalmente complexos oligoméricos, estão relacionados à ligação de nucleotídeos GTP/GDP como foi visto em outras pesquisas. (10,50,57,146,147) Em diferentes espécies, observa-se que as septinas monoméricas são purificadas sem nucleotídeos endógenos (forma apo), independentemente de terem ou não atividade catalítica. As septinas cataliticamente ativas, quando incubadas com GTP/GDP, formam dímeros em solução com GDP ligado. No entanto, as septinas inativas não se ligam ao GTP ou GDP e permanecem como monômeros em solução. Além disso, os complexos diméricos, triméricos e tetraméricos mostram que todas as subunidades têm nucleotídeos ligados, demonstrando a importância da ligação de nucleotídeos para a formação e estabilidade de complexos de septina. (10,30,50,57,61,146,147)

Sirajuddin *et al.* 2009 identificaram, usando mutações pontuais, aminoácidos importantes tanto para a ligação de nucleotídeos quanto para a hidrólise em septinas. Para identificar aminoácidos homólogos envolvidos na ligação e estabilidade de GDP em monômeros de septina de *Drosophila*, e a presença de GTP ligado no homodímero Pnut(G) (resultados não esperados com base no comportamento de septinas humanas) realizou-se um alinhamento de sequência com SEPT2, SEPT6 e SEPT7 humanos (Figura 23).

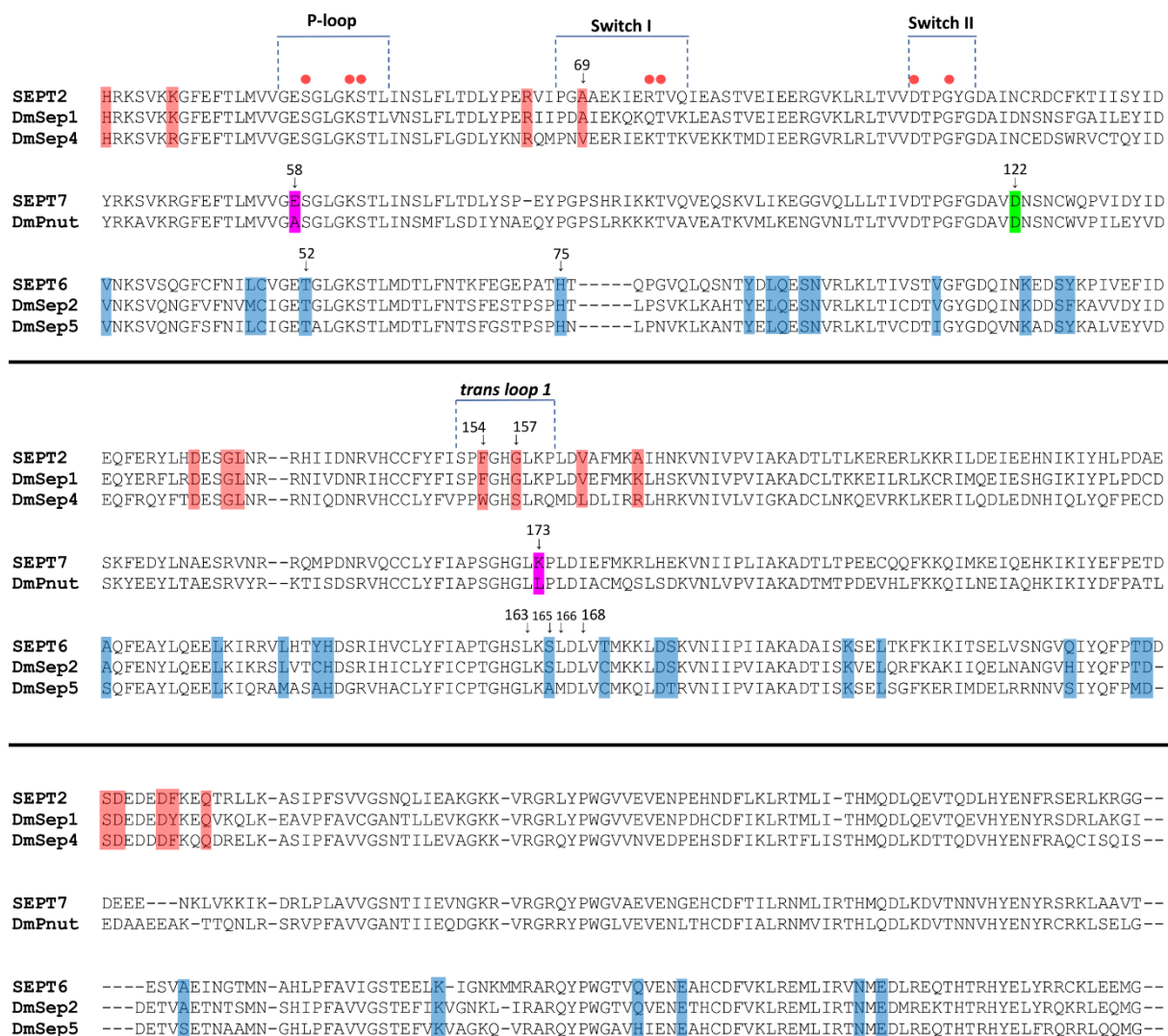


Figura 23 - Alinhamento entre representantes dos subgrupos SEPT2, SEPT6 e SEPT7 das septinas humanas com as septinas de *Drosophila*, separadas por grupos. Em vermelho e azul os resíduos característicos dos subgrupos SEPT2 e SEPT6, respectivamente. A numeração nas septinas do subgrupo SEPT2 está baseada na sequência da Sep1, enquanto a numeração do subgrupo SEPT6 na Sep2. Os resíduos destacados em roxo são os que formam a ponte salina bifurcada em SEPT7 (descrita mais a frente) e a numeração é baseada na mesma proteína. O resíduo destacado em verde está relacionado com a ponte- β observada na interação entre os Switches II de ambas as subunidades na interface G, a numeração é baseada em SEPT7. As bolinhas vermelhas indicam os resíduos importantes para a ligação e hidrólise do nucleotídeo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com uma média de 72% de identidade entre as septinas de *D. melanogaster* e seus homólogos humanos, aminoácidos importantes para ligação de nucleotídeos e hidrólise não são totalmente conservados, (círculos vermelhos na Figura 23). Não foi possível facilmente identificar um aminoácido específico que possa estar relacionado com a ligação diferencial de nucleotídeos em *D. Melanogaster*. Mesmo assim, nossos resultados indicam que a ligação de

GDP em septinas monoméricas e GTP no homodímero Pnut(G) possui uma característica única das septinas de *D. Melanogaster* (pelo menos entre as espécies mais estudadas até o momento).

3.5 ENSAIOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

Com o objetivo de elucidar informações estruturais para as septinas de *D. melanogaster*, bem como para a obtenção de dados que corroborassem com o que esperado para o estado oligomérico destas proteínas em solução, foram realizadas análises de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS). As curvas experimentais para o espalhamento de SAXS foram tratadas pelo programa PRIMUS (87) e posteriormente as informações de massa e tamanho em solução foram obtidas pelo programa SAXSMoW2 (Tabela 7). (148,149)

Tabela 7 - Parâmetros estruturais obtidos para as análises de SAXS. *Porcentagem de variação em relação às massas teóricas para Sep1(NGC) = 41,1 kDa, Sep2(NGC) = 48,5 kDa, Pnut(NGC) = 60,1 kDa e trímero(NGC) = 149,7 kDa.

	Massa Molecular (kDa) (*)	D_{max} (nm)	Estado Oligomérico
Sep1(NGC)	69,96 (17,4%)	113 ± 9	Dímero
Sep2(NGC)	55,13 (13,6%)	69 ± 7	Monômero
Pnut(NGC)	72,01 (19,8%)	111 ± 10	Predominantemente Monômero
Sep1(NGC).Sep2(NGC).Pnut(NGC)	183,30 (22,4%)	164 ± 10	Trímero

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser verificado, as massas das proteínas testadas se aproximam dos valores teóricos (levando em conta o estado oligomérico previsto na última coluna da tabela), bem como a dimensão destas proteínas são condizentes com o tamanho de outras septinas cujas estruturas em alta resolução já são conhecidas. (38,42,63,64) Enquanto Sep1(NGC) e Sep2(NGC) aparentemente se apresentam predominantemente na forma dimérica e monomérica respectivamente, no caso de Pnut(NGC) pode existir uma mistura das duas formas, como visto usando SEC (Figura 15B).

Enquanto nestas condições, o complexo humano composto por SEPT2(G), SEPT6(G) e SEPT7(G) é encontrado na forma de hexâmero (59,60), aqui o complexo de *Drosophila* composto por Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC) tem massa molecular correspondente a

um trímero. As curvas de espalhamentos e as respectivas curvas de $p(r)$ podem ser verificadas na Figura 24 a seguir:

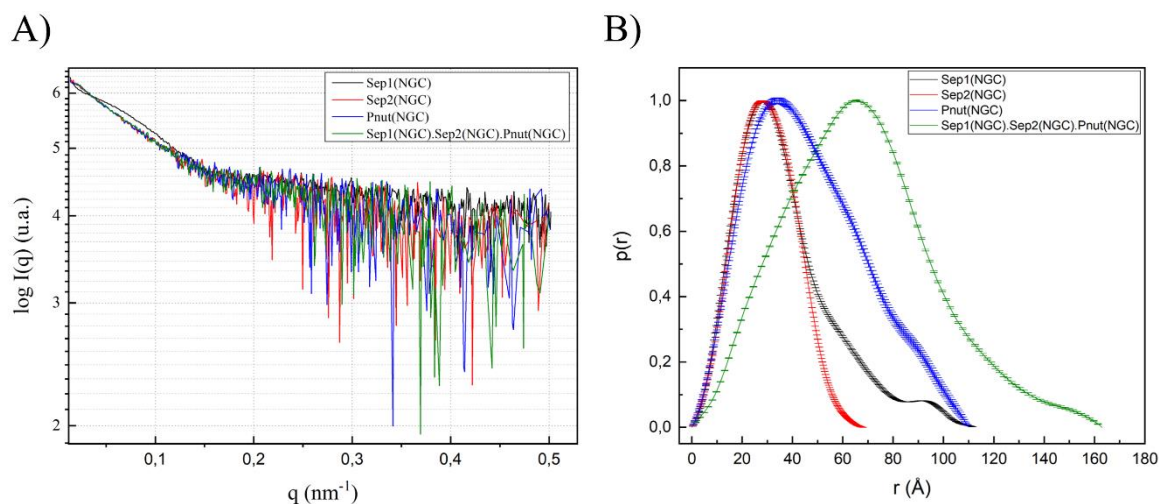


Figura 24 - Medidas de SAXS. A) Curvas de espalhamento experimental para Sep1(NGC); Sep2(NGC) e Pnut(NGC) e complexo Sep1(NGC).Sep2(NGC).Pnut(NGC). B) Comparação das curvas de $p(r)$ para cada proteína analisada. Foram geradas curvas para Sep1(NGC), Sep2(NGC) e Pnut(NGC) além do complexo. Nota-se um aumento de D_{\max} no gráfico de $p(r)$ quando há a formação de complexo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A proteína Pnut(NGC) tem maior massa molecular comparado com Sep1(NGC) e Sep2(NGC) além de apresentar domínios N-terminal e C-terminal mais extensos, com o que justifica um maior valor de D_{\max} ($111 \pm 10 \text{\AA}$) se comparado à Sep2(NGC), mesmo sendo o monômero a espécie predominantemente em ambos os casos. O mesmo se aplica para a curva resultante do complexo, uma vez que é esperado que este tenha maior dimensão do que as proteínas observadas, e o tamanho obtido é compatível com o que é esperado para um trímero. (57) Já se compararmos as curvas de $p(r)$ de Pnut(NGC) e Sep1(NGC), verifica-se que o formato da curva nos dois casos é bem diferente, mesmo apresentando valores de D_{\max} muito próximos. Enquanto que para Sep1(NGC) o final da curva decai mais rapidamente indicando uma população predominantemente homogênea (em preto na Figura 24B), o final da curva de Pnut(NGC) apresenta uma queda mais abrupta e mais alongada, indicando a possibilidade de coexistência de uma população de monômeros e dímeros.

No caso de *Drosophila*, o fato de ser encontrados trímeros no lugar de hexâmeros, sugere que o hexâmero de *Drosophila* é menos estável e se desfaz em trímeros nas condições usadas, indicando uma instabilidade da interface central entre duas cópias de Pnut. Este dado é coerente com a observação da construção Pnut(G) se comportar predominantemente como

monômero e a construção Pnut(NGC) também apresentar uma proporção significativa de monômeros (Figura 15). Esta hipótese será abordada ao longo deste estudo, onde serão avaliadas as interfaces de contato entre Pnut.Pnut via interface G.

Capítulo 4

Caracterização Estrutural

Interface G:

Grupo II e Grupo III

4.1 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE Sep1(G).Sep2(G)

Parte dos objetivos deste estudo é a obtenção de informações estruturais para as septinas de *Drosophila melanogaster*. Inicialmente, foi realizado uma predição de cristalização para todas as combinações através do XtalPred Server. (90) Os resultados podem ser verificados na Figura 25 a seguir. Para esta análise, quanto menor o valor de EP-class e RF-class, maior a probabilidade teórica de sucesso na cristalização.

Target id (link to target details)	EP-class	RF-class	Length	Gravy index	Instability Index (II)	Isoelectric Point (pI)	Coiled coils	Longest Disorder region	Percentage of coil structure	Transmembrane Helices (TM)	Signal Peptides (SP)	Insertions score	Homologs in NR (clustered to 60% seq. ident.)	Homologs in PDB
Sep1 G	1	5	273	-0.33	38.77	5.50	0	2	41	No	No	0.04	820	20
Sep2 G	1	3	268	-0.33	32.36	6.86	0	2	36	No	No	0.01	800	20
Sep4 G	3	4	275	-0.58	46.07	5.60	0	2	35	No	No	0.03	819	20
Sep5 G	1	4	268	-0.35	41.16	6.54	0	2	37	No	No	0.01	803	20
Pnut G	1	3	274	-0.19	35.56	6.43	0	2	34	No	No	0.02	801	20
Sep1 NGC	5	11	361	-0.46	36.90	6.14	28	56	42	No	No	0.03	801	20
Sep2 NGC	5	11	419	-0.63	41.01	7.28	85	34	36	No	No	0.02	809	21
Sep4 NGC	5	11	427	-0.64	48.10	6.84	28	71	48	No	No	0.04	809	20
Sep5 NGC	5	11	422	-0.61	48.55	7.25	72	63	39	No	No	0.01	804	20
Pnut NGC	5	11	539	-0.63	43.93	8.88	84	117	47	No	No	0.01	800	26

EP crystallization classes RF crystallization classes

↓ Mais promissor ↓ Mais promissor

1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

↑ Menos promissor Menos promissor ↑

Figura 25 - Predição de cristalização para as septinas individuais de *D. melanogaster* realizada pelo XtalPred Server.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, as proteínas cuja construção é composta apenas pelo domínio GTPase são as que possuem maiores chances de obtenção de cristais, com destaques para Sep2(G) e Pnut(G). Por outro lado, para as proteínas inteiras (NGC) verifica-se que a probabilidade de cristalização cai drasticamente. Isso se deve ao fato de que os domínios N-terminal e C-terminal possuem regiões com alto grau de desordem.

Durante este trabalho de doutorado, diversas condições de cristalização foram testadas para as proteínas individuais, tanto para os domínios NGC como para GTPase, porém sem nenhum sucesso. Posteriormente foram realizados testes com os dímeros. Finalmente, foram obtidos cristais para os heterodímeros Sep1(G).Sep2(G), Sep1(G).Sep5(G) e o homodímero do mutante Pnut_{mut}(G). As condições de cristalização estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições de cristalização para dímeros de septinas de *D. melanogaster*.

Proteína	Condição de cristalização
Sep1(G).Sep2(G) (7 mg/mL)	(A) 0,1 M MES/imidazol pH 6,5; 10% PEG 8000; 20% 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
	(B) 0,1 M MES/imidazol pH 6,5; 10% PEG 8000; 20% PEG MME 550 e 30 mM de cada um dos seguintes reagentes: nitrato de sódio, hidrogenofosfato dissódico e fosfato de amônio
	(C) 0,1 M MOPS/HEPES-Na pH 7,5; 10% PEG 8000; 20% etilenoglicol e 20 mM de cada um dos seguintes reagentes: formato de sódio, acetato de amônio, citrato trissódico, potássio sódico L-tartarato e oxalato de sódio
Sep1(G).Sep5(G) (6,5 mg/mL)	(A) 0,1 M CHES pH 6,0; 10% PEG 8000; 20% 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
	(B) 0,1 M de acetato de sódio tri-hidratado pH 4,6; 3,2 M NaCl e 30 mM de cada um dos seguintes reagentes: nitrato de sódio, hidrogenofosfato dissódico e fosfato de amônio
Pnut _{mur} (G) (6,8 mg/mL)	(A) 0,1 M MES/imidazol pH 6,5; 10% PEG 8000; 20% 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
	(B) 0,1 M MES/imidazol pH 7,5; 10% PEG 8000; 20% 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

Fonte: Elaborada pelo autor.

As condições em que foram obtidos cristais em maior abundância foram as para o dímero Sep1(G).Sep2(G). Algumas fotografias destes cristais podem ser observadas na Figura 26. As coletas de padrões de difração de alta qualidade foram obtidas apenas com a condição (A) para este heterocomplexo. A estrutura do heterodímero Sep1(G).Sep2(G) foi resolvida a uma resolução de 2.38 Å. Desta forma, pela primeira vez foi obtido de forma experimental um conjunto de dados capaz de resolver a estrutura de um representante de septinas da classe dos insetos. Este trabalho de doutorado contribuiu para o preenchimento desta lacuna de mais de 50 anos sem conhecimento estrutural de septinas desta classe, ampliando o quadro de septinas conhecidas para mais um organismo.

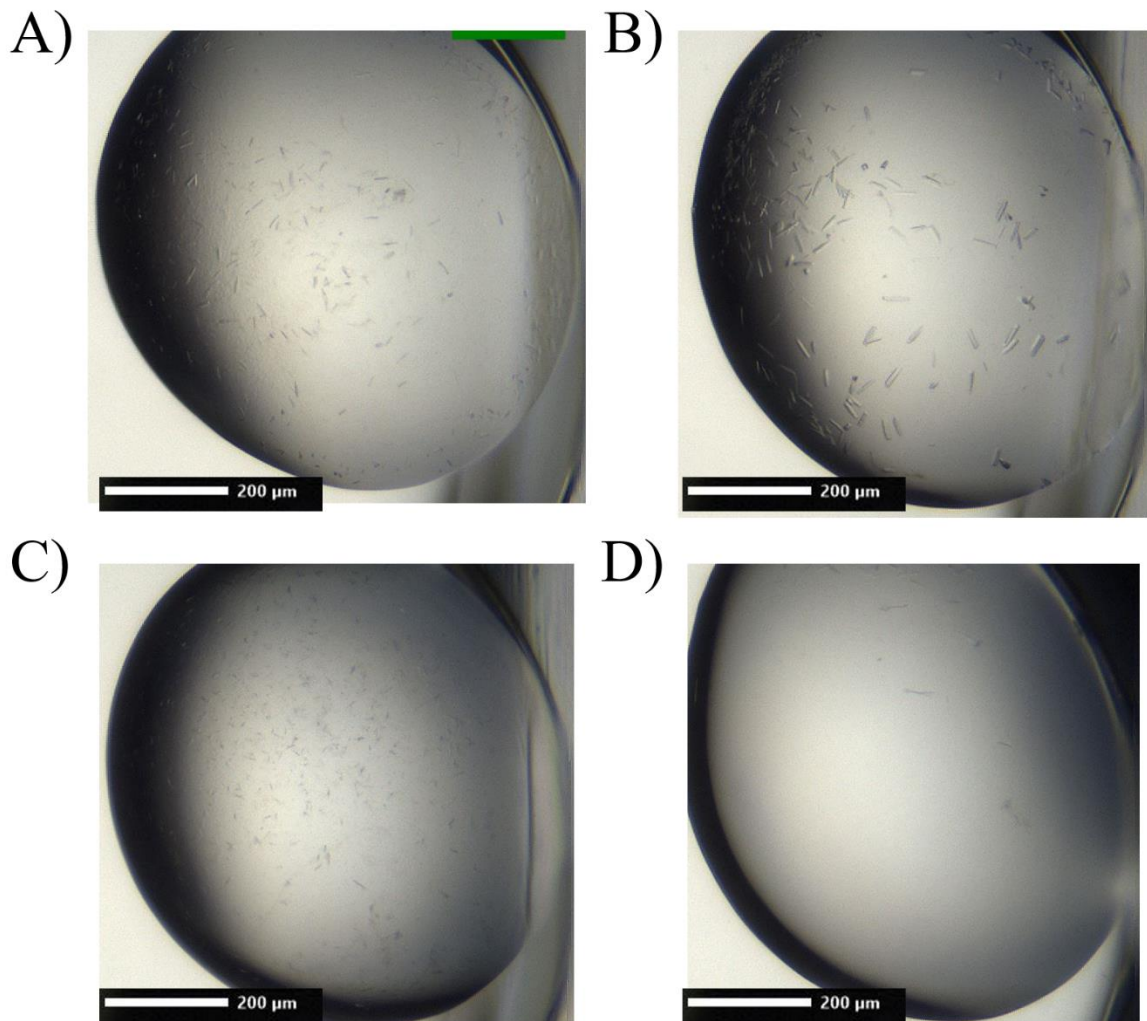


Figura 26 - Cristais de septinas de *Drosophila melanogaster*. A) Sep1(G).Sep2(G), condição: 10% PEG 8000, 20% etilenoglicol, 0,1 M MES/imidazol pH 6,5 e aditivos; B) Sep1(G).Sep2(G), condição: 10% PEG 8000, 20% PEG MME 550, 0,1 M MES/imidazol pH 6,5 e aditivos; C) Sep1(G).Sep5(G), condição: 10% PEG 8000, 20% etilenoglicol, 0,1 M CHES pH 6,0 e aditivos; D) Pnut_{mut}(G).Pnut_{mut}(G), condição: 10% PEG 8000, 20% etilenoglicol, 0,1 M MES/imidazol pH 6,5 e aditivos. A barra branca no canto inferior esquerdo possui escala de 200 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura foi depositada no banco de dados PDB (150) sob o código 8DKT, sendo a única estrutura até hoje de septinas de insetos. Os parâmetros cristalográficos obtidos com a coleta de dados e refinamento estão sintetizados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros cristalográficos referentes à obtenção da estrutura de Sep1(G).Sep2(G).

Se1(G).Sep2(G)	
Código PDB	8DKT
Fonte de raios-X	Diamond I04
Detector	Eiger2 X 16M
Parâmetros da cela (Å):	
a; b; c	73,577; 149,423; 155,340
α ; β ; γ	90,0; 90,0; 90,0
Grupo espacial	C222 ₁
Resolução (Å)	77,67 – 2,37 (2,74 – 2,37)
λ (Å)	0,97950
Multiplicidade	13,4 (12,3)
R _{pim} (%)	4,1 (45,9)
CC (1/2)	1,00 (0,63)
Completeza (%)	91,1 (70,0)
Reflexões	201386 (9267)
Reflexões únicas	15075 (754)
I/ σ	11,1 (1,7)
Reflexões utilizadas no refinamento	15066
R (%)	21,7
R _{free} (%)	25,2
Número de átomos na proteína	4094
Número de átomos do ligante	100
B (Å ²)	69,49
Phase error (°)	32,19
Ramachandran Plot	
Permitidos (%)	95,14
Favorecidos (%)	4,67
Não permitidos (%)	0,19
Clashcore dos átomos	6,75
r.m.s.d. da geometria ideal	
r.m.s. comprimento de ligações (Å)	0,002
r.m.s. ângulo de ligações (°)	0,48

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros de qualidade da estrutura estão dentro do esperado para estruturas com a mesma faixa de resolução como pode ser visto na Figura 27.

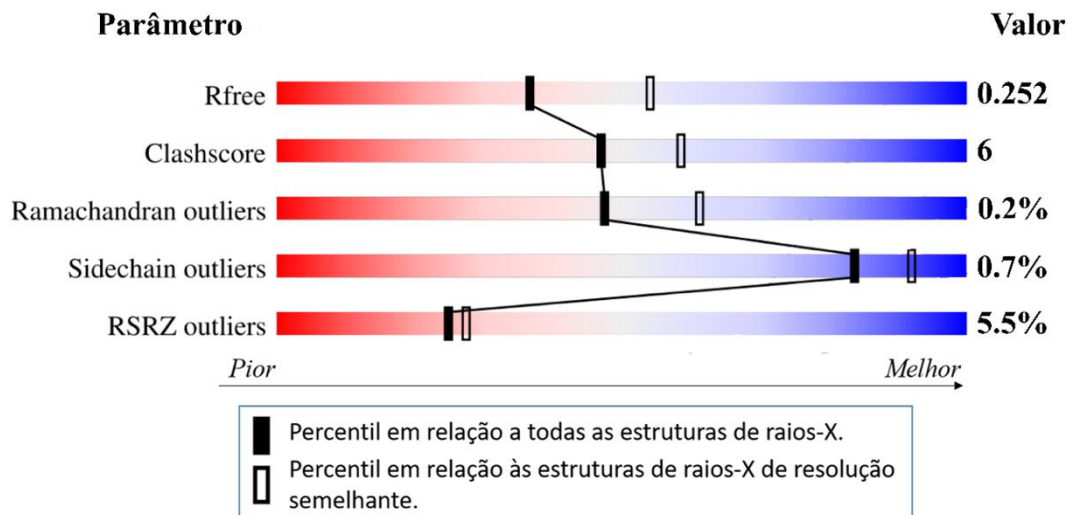


Figura 27 - Gráfico de parâmetros gerais referente a qualidade da estrutura cristalográfica de Sep1(G).Sep2(G) (PDB ID: 8DKT). Quando comparado com os percentis de todas as estruturas resolvidas por raios-X do PDB e todas as estruturas resolvidas por raios-X com resolução semelhante, o dímero Sep1(G).Sep2(G) apresenta valores razoáveis para a resolução obtida em termos de *Rfree*, *clashscore*, *Ramachandran outliers*, *sidechain outliers* e *RSRZ outliers*.

Fonte: Adaptada de *PROTEIN...* (150)

O dímero Sep1(G). Sep2(G) de *Drosophila melanogaster* possui duas moléculas na unidade assimétrica, sendo uma de cada septina, algo comum também em estruturas diméricas de septinas humanas dos mesmos grupos (Figura 28A). (30,60-62) Cada subunidade apresenta o clássico enovelamento de septinas. O núcleo de seis fitas β é coberto por hélices α além do Septin Unique Element (SUE), gerando o sanduíche $\alpha\beta\alpha$ que caracteriza o enovelamento de septinas. A subunidade Sep1(G) está ligada a GDP (como esperado para uma septina com atividade catalítica) e a subunidade Sep2(G) está ligada a GTP e Mg^{+2} (esperado para uma septina sem atividade catalítica) (Figura 28B). Além disso, o heterodímero é formado via interface G fisiológica e mostra a capacidade de formar heterofilamentos via interface NC não fisiológica, quando a rede cristalina se expande (como nos heterodímeros dos mesmos grupos de septinas humanas), como verificado na Figura 28C. (61,62,65) É interessante notar que esta interface não fisiológica se forma entre Sep1 e Sep2. Portanto a interface NC fisiológica Sep1-Sep1 (que se formaria durante a polimerização de hexâmeros) não está presente na estrutura cristalográfica. Como mencionado, o mesmo fenômeno é observado no caso dos complexos humanos SEPT2-SEPT6, SEPT2-SEPT8 e SEPT2-SEPT11. Até hoje não há uma clara

explicação para isso, mas a sua observação sistemática em quatro estruturas diferentes (inclusive a da Sep1(G).Sep2(G) descrito aqui) sugere que provavelmente o domínio G sozinho não é suficiente para favorecer a interface fisiológica e indicando que os domínios N e C-terminais fazem contribuições importantes para garantir a sua formação *in vivo*.

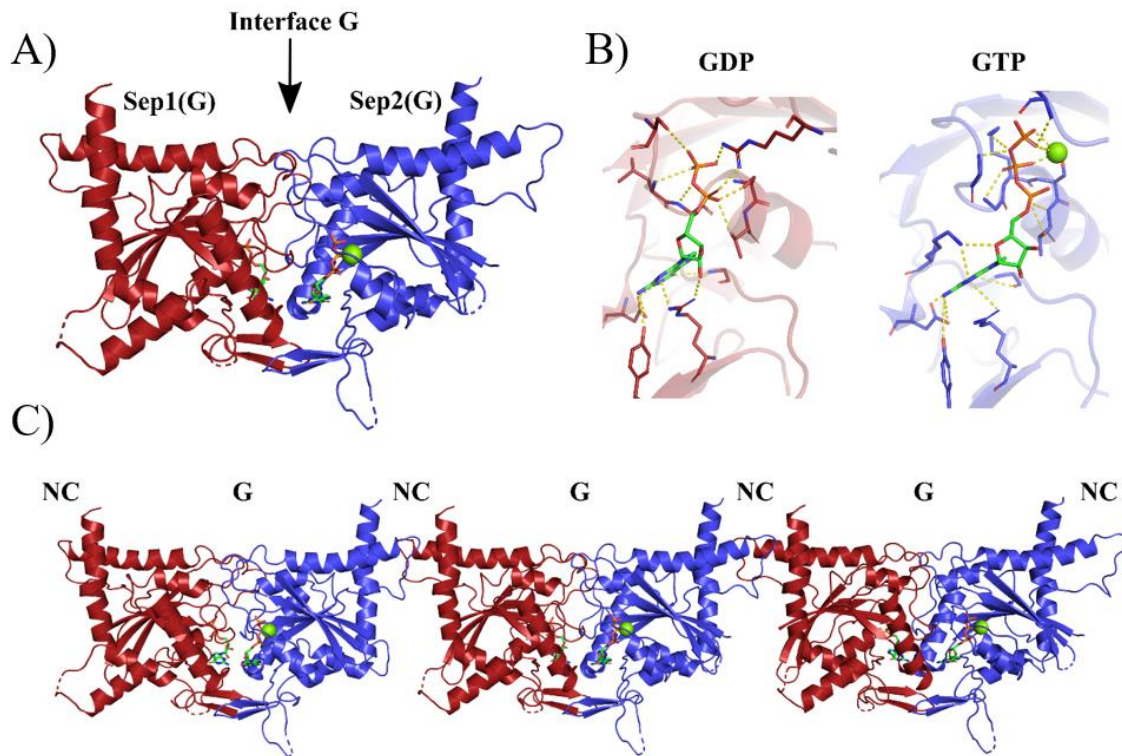


Figura 28 - Estrutura cristalográfica de Sep1(G).Sep2(G). A) Destaque para a interface de interação do tipo G; B) Detalhe para a interação com nucleotídeos, sendo possível verificar a presença de GDP ligado à Sep1(G) e GTP e Mg^{2+} ligado à Sep2(G); C) Rede não fisiológica composta por repetições de heterodímeros. Na expansão cristalina, Sep1(G) interage com Sep2(G) pelo domínio GTPase, mas também há possibilidade de interação não fisiológica por meio da interação pelos domínios N-terminal e C-terminal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE Sep1(G).Sep2(G) COM SEPT2-SEPT11 HUMANA

A resolução das estruturas cristalográficas dos heterodímeros SEPT2-SEPT6/8/11 demonstrou que numa interface G fisiológica, as regiões dos *switches I* e *II* estão completas e ordenadas. (61,62) Esta condição parece restrita a uma interface G fisiológica entre integrantes dos grupos II e III (Figura 10) uma vez que nas estruturas cristalográficas de homodímeros fisiológicos ou não fisiológicos e heterodímeros entre integrantes dos grupos I e IV, o *switch I* é incompleto e desordenado ou quando ordenado, não participa da interface. A estrutura da Sep1(G).Sep2(G) não é apenas a primeira estrutura de septinas de insetos, também representa

a primeira estrutura de um heterodímero via interface G fisiológica de uma septina não humana. Isso permite explorar se as características observadas na interface G entre septinas humanas dos grupos II e III, são equivalentes na interface G fisiológica de septinas de insetos.

Como mencionado, a estrutura Sep1(G).Sep2(G) apresenta o clássico enovelamento $\alpha\beta$ de septinas com as regiões dos *switches* ordenadas (Figura 29). Comparando os *switches* e o *P-loop* com SEPT2-SEPT11 (humanas) podemos observar que as orientações destas regiões são conservadas na interface G de Sep1(G).Sep2(G), sugerindo que independente da espécie é necessária a presença do parceiro correto para manter a estabilidade e orientação dos *switches I* e *II* numa interface G fisiológica.

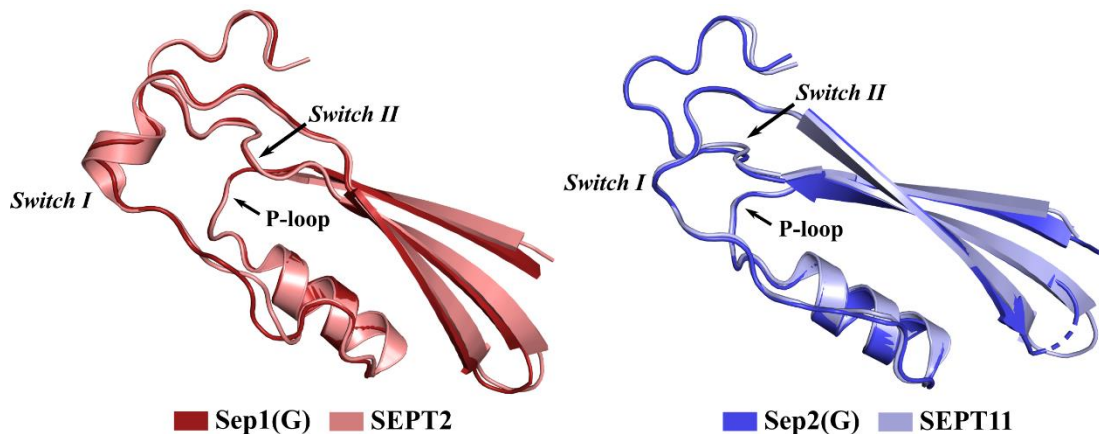


Figura 29 - Comparativo das regiões de *switch I*, *P-loop* e *switch II* das septinas humanas (SEPT2 e SEPT11) e de drosófila (Sep1(G) e Sep2(G)). Verifica-se a manutenção da estrutura destas regiões entre as duas espécies.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A especificidade de interação pela interface G entre septinas do Grupo II (sem atividade catalítica) e Grupo III (cataliticamente ativo), identificando resíduos característicos dos grupos envolvidos nesta seletividade, foi também estudada nos heterodímeros SEPT2-SEPT6/8/11. (61) Neste estudo um resíduo “caraterístico” foi definido como sendo um resíduo conservado em todos os integrantes de um grupo, mas sempre ausente nos demais (como sugerido por Rosa *et al.* 2020). Estes resíduos caraterísticos são destacados em cores diferentes para os diferentes grupos na Figura 7. Uma vez que Sep2(G) e Sep1(G) podem ser agrupadas dentro dos grupos II e III (respectivamente), redes de interações na área de contato entre as subunidades, envolvendo resíduos característicos homólogos em *D. melanogaster*, foram mapeados na estrutura Sep1(G). Sep2(G) com o objetivo de avaliar a conservação das caraterísticas da interface.

Leonardo *et al.* (62) descreve uma metodologia de análise das regiões de contato da interface G nos heterodímeros SEPT2-SEPT6/8/11, metodologia que foi utilizada em Sep1(G). Sep2(G) com o mesmo objetivo. Usando o programa DIMPLOT (LigPlot⁺) (99) identificamos as regiões de contato entre as duas subunidades do heterodímero Sep1(G). Sep2(G), mapeando os resíduos que fazem parte desta interação. Após o mapeamento dos resíduos na estrutura, as subunidades foram separadas por 40 Å ao longo do eixo X e rotacionados 90° ao redor do eixo Y (como descrito por Leonardo, 2019) (Figura 30A). (62) A visualização do heterodímero na forma de um livro aberto permite comparar eficientemente a distribuição das regiões de contato entre Sep1(G). Sep2(G) e SEPT2-SEPT11. Podemos observar que ambos os heterodímeros apresentam uma distribuição de regiões de contato similares, o que mostra uma conservação dos aminoácidos envolvidos na interface G entre septinas dos grupos II e III de humanos e de insetos. Dentro dessas regiões de contato destacam as que apresentam resíduos característicos que realizam interações complementares entre ambas as subunidades. Um resíduo característico é aquele aminoácido conservado em um grupo específico de septinas, mas ausente nos outros grupos na mesma posição. (61) Estes aminoácidos se mostraram importantes na especificidade de interação via interface G entre septinas humanas dos grupos II e III, considerados como uma “impressão digital” de seletividade entre estes grupos de septinas. (61) A Sep1(G).Sep2(G) apresenta os mesmos contatos via resíduos característicos que SEPT2-SEPT11: a Phe154 e Gly157 da Sep1(G) com Thr52 e His 75 da Sep2(G) pintados de amarelo na Figura 30A, e Al69 da Sep1(G) com Leu163, Ser165, Leu166 e Leu168 da Sep2(G) em cor rosa (os aminoácidos homólogos em SEPT2-SEPT11 estão pintados no mesmo código de cores).

A rede de interações envolvendo Thr52-His75 e Phe154-Gly157 na Sep1(G).Sep2(G) apresenta a mesma distribuição e orientação que em SEPT2-SEPT11 (Figura 30B). (61) A hidroxila da Thr52 da Sep2(G) interage com o fosfato γ do GTP, o que orienta o grupo metil da Thr52 para interagir com His75 da própria Sep2(G). O resultado dessa interação, permite que o anel imidazol da His75 se oriente corretamente na cavidade formada pelo *trans-loop1* da Sep1(G), que apresenta a Phe154 e Gly157. O *trans-loop1* em SEPT2 se caracteriza por mostrar uma orientação diferente aos *trans-loop1* de outras septinas na presença do seu parceiro correto (61), relacionando esta orientação específica à presença da Phe e Gly como resíduos característicos do grupo. Como em SEPT2, o *trans-loop1* da Sep1(G) adota uma orientação que permite o encaixe da His75 (orientação influenciada pela presença da Phe154 e Gly157). Outra característica conservada nesta rede de interações é o nucleotídeo GTP, sendo o fosfato γ considerado como um “resíduo característico” em septinas do Grupo II (SEPT11). (61) A

presença do fosfato γ na rede de interações em Sep1(G).Sep2(G) reforça a ideia da necessidade de uma septina cataliticamente inativa (Sep2) para manter a especificidade na interface G entre septinas dos grupos II e III ao longo da evolução das septinas.

A segunda rede de interação conservada em Sep1(G). Sep2(G) envolve Ala69 na Sep1(G) e Leu163-Ser165-Leu166-Leu168 da Sep2(G) (Figura 30C). A Ala69, um aminoácido conservado em Sep1(G) quando comparado com septinas humanas do mesmo grupo é um resíduo característico que se encaixa numa cavidade hidrofóbica formada por Leu163-Ser165-Leu166-Leu168 da Sep2(G). Como em SEP2-SEPT11, a presença de um aminoácido com cadeia lateral pequena e hidrofóbica na posição 69 do *switch I* na septina do Grupo III (Sep1) é fundamental para manter estável a interação com a septina do Grupo II (Sep2) na interface G e (por ser característico) ajuda em garantir seletividade na montagem da interface G entre Sep1 e Sep2.

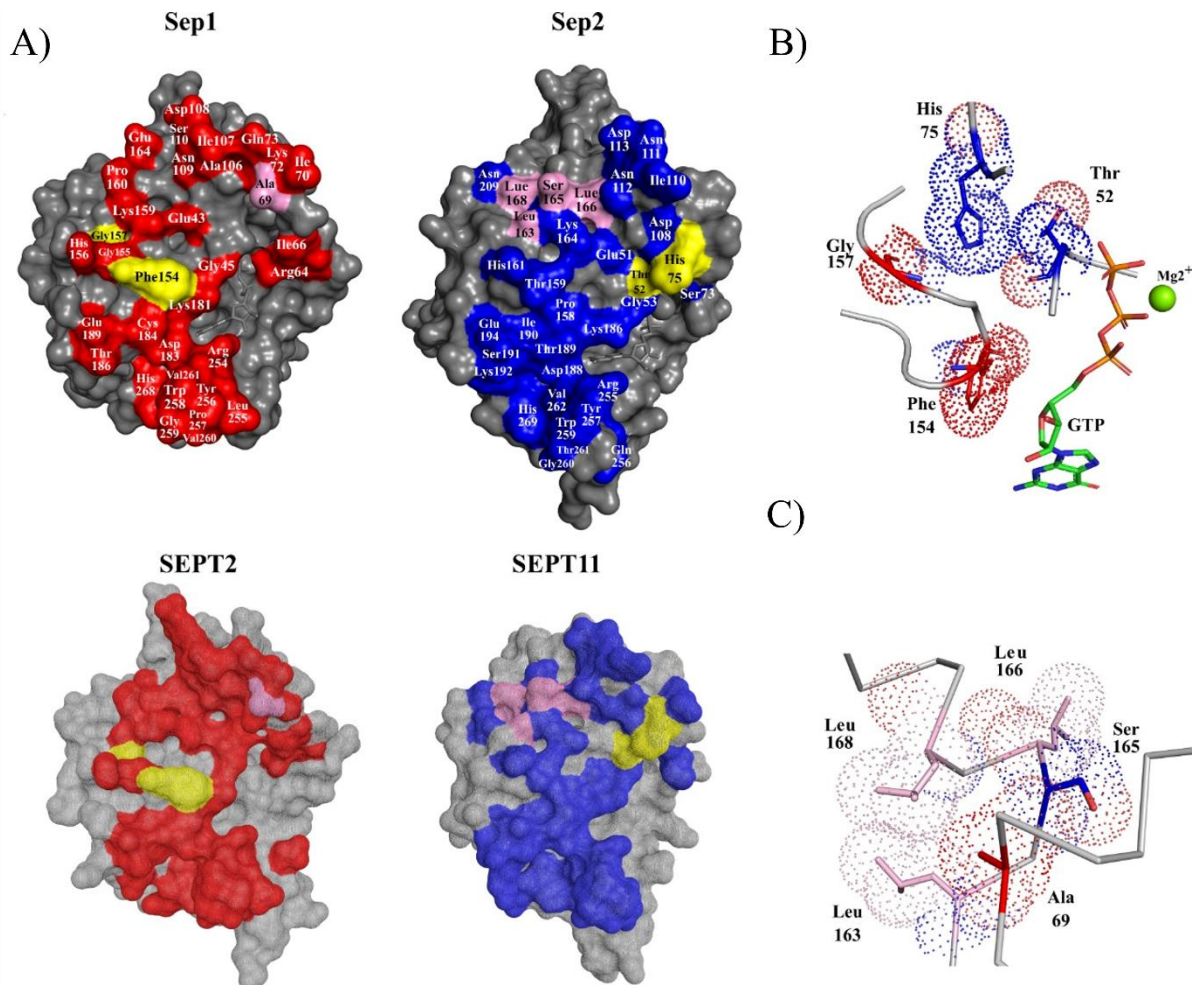


Figura 30 - Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G entre Sep1.Sep2 e SEPT2.SEPT11. A) Comparação entre Sep1.Sep2 e SEPT2.SEPT11. As subunidades foram separadas e giradas em 90° em torno do eixo Y para expor os resíduos participantes da interação via interface G-G. Destaque em amarelo para os resíduos característicos dos grupos que fazem parte da interface de contato. B) Rede de interações que permite com que His75 se oriente corretamente na cavidade formada pelo *trans-loop1* da Sep1(G). C) Preenchimento da cavidade hidrofóbica formada por Leu163-Ser165-Leu166-Leu168 em Sep2(G) por Ala69 de Sep1(G), mantendo estável a interação via interface G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O fato de que em septinas de *D. melanogaster* e *H. sapiens* mantém características muito semelhantes quando se trata da interação entre septinas do Grupo II e do Grupo III reforça a ideia de que evolutivamente as interações das septinas se mantém conservadas. Apesar de diferenças na sequência, estas proteínas possuem características muito semelhantes na interface de contato para estes dois grupos de septinas demonstrando que realmente é necessária esta combinação entre uma septina que possui atividade catalítica do Grupo III em conjunto com outra que não possua atividade catalítica do Grupo II. Esta especificidade garante a correta

interação entre estes dois tipos de septinas, e, portanto, auxilia na correta ordem de formação de complexos, seja hexâmeros ou octâmeros (encontrados somente em *H. sapiens*).

4.3 COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE Sep1(G).Sep2(G) COM SUA ESTRUTURA PREDITA POR *ALPHAFOLD*

AlphaFold é uma ferramenta de predição de estrutura de proteínas baseada no *Deep Learning*. (106) Este software, tem se mostrado eficiente na predição de estruturas de proteínas a nível atômico, demonstrando uma alta acurácia não só na predição do enovelamento das proteínas (relacionado com as posições dos C_{α}) se não também na predição da orientação de cadeias laterais. (106,151) Embora a precisão de *AlphaFold* tem sido demonstrada para vários sistemas, estávamos interessado no caso das septinas especificamente. Realizamos uma comparação entre a estrutura cristalográfica de Sep1(G). Sep2(G) com a estrutura predita por *AlphaFold* para saber se as interações envolvendo resíduos característicos dos grupos descritos anteriormente são reproduzidas na estrutura predita.

O alinhamento entre a estrutura cristalográfica e predita de Sep1(G). Sep2(G) mostra um alto grau de conservação no enovelamento e elementos de estrutura secundárias para ambas as estruturas; com a diferença da presença da hélice α_0 na estrutura predita (Figura 31). Esta hélice está ausente das construções Sep1(G) e Sep2(G) usado para os estudos cristalográficos. Com um r.m.s.d. dos carbonos α da cadeia principal de 0,6 Å entre Sep1(G). Sep2(G) experimental (cinza) e predita (colorida), confirmamos a precisão de predição a nível atômico do software *AlphaFold*.

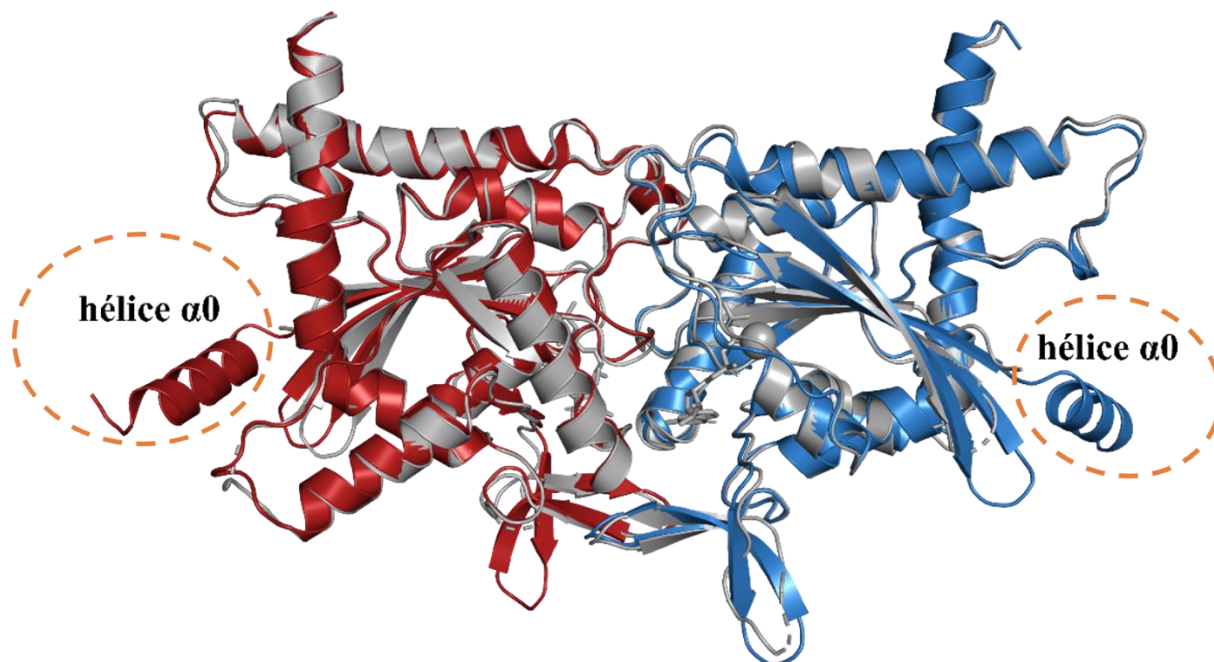


Figura 31 – Alinhamento realizado para Sep1(G).Sep2(G) entre a estrutura cristalográfica (em cinza) e estrutura predita por *AlphaFold* (em vermelho para Sep1(G) e azul para Sep2(G)) verifica-se um alto grau de conservação de enovelamento, com um r.m.s.d dos carbonos α de 0,6 Å. Destaque para a hélice α_0 adicionada nas estruturas simuladas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As redes de interação envolvendo resíduos característicos dos grupos na interface G da estrutura predita de Sep1(G). Sep2(G) foram mapeadas e identificadas (Figura 32). Como na estrutura cristalográfica, as duas redes de interações envolvendo resíduos característicos dos grupos nas regiões dos *switches I* de ambas as subunidades do heterodímero foram observadas (Figura 32) mostrando o poder de *AlphaFold* em reproduzir não apenas os enovelamentos das subunidades, mas também os detalhes finos das interações específicas na interface G. Portanto, estes resultados validam o uso de *AlphaFold* para gerar estruturas para outros heterodímeros para os quais não foram bem-sucedidos na obtenção de cristais. Especificamente, buscamos observar interações presentes nos heterodímeros Sep1(G). Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G), que se esperam serem conservadas segundo a regra de substituição ou de Kinoshita (como nos heterodímeros formados por septinas humanas dos grupos II e III). (61)

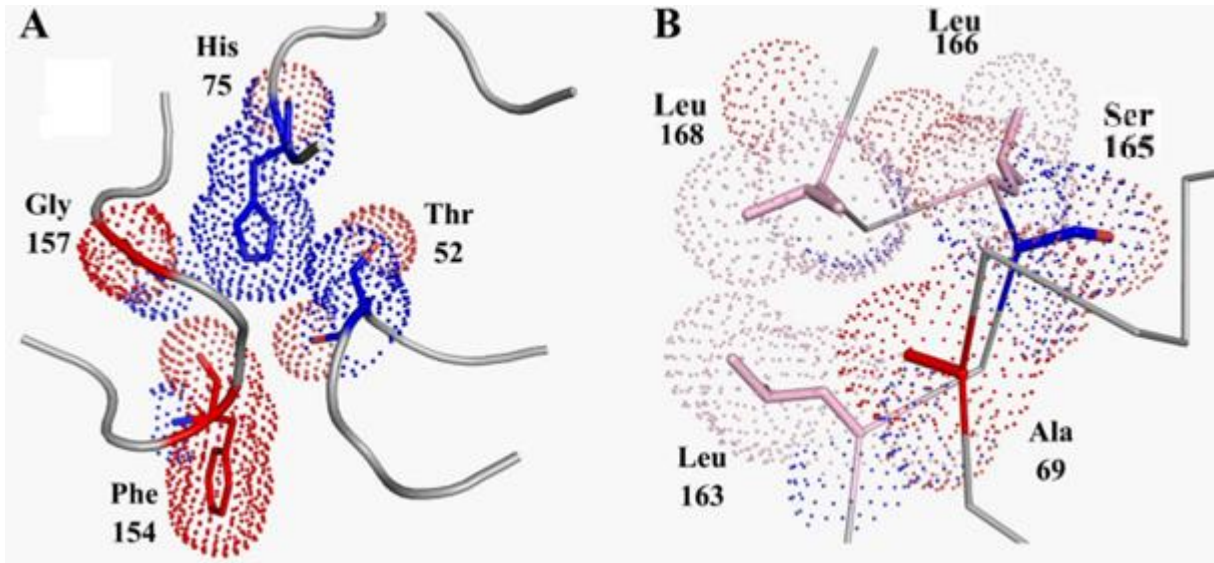


Figura 32 - Redes de interação envolvendo resíduos característicos dos grupos na interface G da estrutura predita de Sep1(G).Sep2(G). A) Interação entre Thr52-His75 e Phe154-Gly157. B) Encaixe de Ala69 cavidade hidrofóbica formada por Leu163-Ser165-Leu166-Leu168. Ambas as interações são encontradas, tanto na estrutura cristalográfica quanto na estrutura predita.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 ANÁLISE DOS DEMAIS HETERODÍMEROS DO GRUPO II E GRUPO III DE *D. melanogaster*

Drosophila melanogaster apresenta 5 genes que codificam septinas, dos quais, duas pertencem ao Grupo II (Sep2 e Sep5) e outras duas ao Grupo III (Sep1 e Sep4); Pnut é a única representante do Grupo IV. Com dois representantes de cada grupo, e seguindo a “Regra de Kinoshita”, teríamos quatro heterodímeros via interface G fisiológica formados pelos grupos II e III. A “Regra de Kinoshita” mencionam que uma septina pode ser substituída por outra do mesmo grupo em um heterocomplexo, sem alterar a integridade dele. (13) Isto foi demonstrado por Rosa *et al.* (2020) para heterodímeros G de septinas humanas formados pelos grupos II e III, sentando as bases estruturais da “Regra de substituição de septinas ou Regra de Kinoshita” (via interações por resíduos característicos dos grupos). (61) Com a estrutura cristalográfica de Sep1(G). Sep2(G), mostramos que as interações que determinam a especificidade da interface G entre septinas dos grupos II e III se mantem ao longo da evolução destas proteínas (de insetos até humanos).

Uma vez que não foi possível resolver a estrutura dos outros heterodímeros de septinas de *D. melanogaster*, usamos Colabfold (152) (uma versão online de AlphaFold) para modelar os heterodímeros Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G). Com os modelos

podemos observar que as bases estruturais da “Regra de Kinoshita” são conservadas entre septinas de insetos e septinas humanas (Figura 33). As regiões de contato entre os dímeros Sep1(G).Sep5(G), Sep4(G).Sep2(G) e Sep4(G).Sep5(G) são, em boa parte, conservadas quando comparadas com Sep1(G).Sep2(G) (Figura 30 e Figura 33), e as interações envolvendo resíduos característicos estão presentes em todos os heterodímeros (com pequenas modificações). Análises de PISA para os quatro modelos mostram que a área da superfície de contato e a energia total de ligação da interface é muito próxima entre todos, reforçando que a “Regra de Kinoshita” também é aplicável para septinas de insetos (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de PISA para os modelos de dímeros de septinas do Grupo II e Grupo III de *D. melanogaster* obtidos por *AlphaFold*.

	Área de Interface (Å ²)	Energia total de ligação da interface (kcal/mol)	Número de ligações de H	Número de pontes salinas
Sep1(G).Sep2(G)	1.950,4	-25,5	9	9
Sep1(G).Sep5(G)	1.945,6	-25,1	7	7
Sep4(G).Sep2(G)	1.999,1	-24,9	14	9
Sep4(G).Sep5(G)	1.979,3	-24,9	14	8

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando analisamos estes dados, verificamos que as áreas de interface, energias totais de ligação das interfaces e o número de pontes salinas são próximos para todas as quatro combinações de heterodímeros. Já quando analisamos a ΔG ganho na formação da interface, temos que os dímeros formados por Sep1(G) são mais estáveis dos que os formados por Sep4(G). Por outro lado, o número de ligações de hidrogênio, é maior para heterodímeros com a presença de Sep4(G).

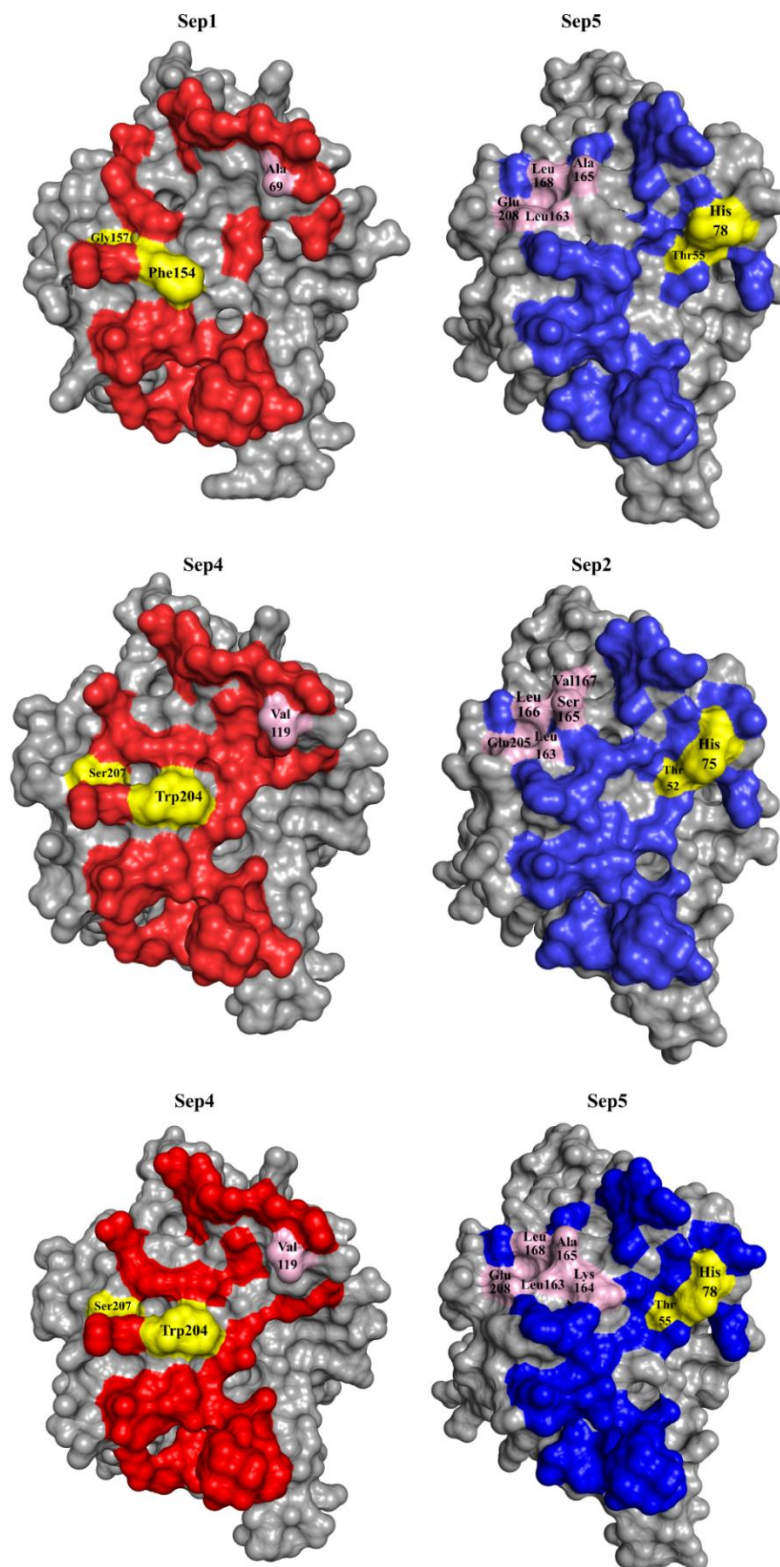


Figura 33 - Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G entre os grupos II e III. Comparação entre Sep1.Sep5, Sep4.Sep2 e Sep4.Sep5. As subunidades foram separadas e giradas em 90° em torno do eixo Y para expor os resíduos participantes da interação via interface G-G. Destaque em amarelo para os resíduos característicos dos grupos que fazem parte da interface de contato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No ponto 4.2 e 4.3 foi mostrado que Sep1(G).Sep2(G) mantém as mesmas interações envolvendo resíduos característicos dos grupos que SEPT2-SEPT11 (um heterocomplexo de septinas humanas). Porém, os outros heterodímeros G das septinas de *D. melanogaster* apresentam algumas substituições nestes resíduos característicos. Na região do *trans-loop1*, Sep4 tem duas substituições com triptofano (204) no lugar da fenilalanina (154) e serina (207) no lugar da glicina (157) (Figura 34A). Por outro lado, no seu *switch I* tem uma valina (119) no lugar da alanina (69) conservada para septinas do Grupo III. A Sep5 apresenta apenas uma substituição dos resíduos característicos, uma alanina no lugar da serina na posição 165 da região do *trans-loop1* (Figura 34A).

Observamos em detalhe o impacto das substituições no heterodímero Sep4(G).Sep5(G), o qual apresenta duas subunidades com substituições nos resíduos característicos. Na primeira rede de interações, o grupo metil da Thr55 interage com a His78 da Sep5, orientando o anel imidazol da His78 para o *trans-loop1* da Sep4(G) (Figura 34A). Embora as substituições Phe/Trp e Gly/Ser em Sep4, a rede de interações conserva as mesmas características que em Sep1(G).Sep2(G). A orientação do *trans-loop1* em septinas do Grupo III é importante para permitir o encaixe da His característica de septinas do Grupo II, orientação que é garantida pela presença da Phe e Gly características (Rosa *et al.*, 2020). (61) Quando comparamos a orientação do *trans-loop1* da Sep1 (em complexo com Sep2 e Sep5) com Sep4 (também em complexo com Sep2 e Sep5), observamos que apesar das substituições Phe/Trp e Gly/Ser a sua conformação é conservada nas septinas do Grupo III de *D. melanogaster* (Figura 34B). Além disso, podemos observar que o *trans-loop1* em septinas do Grupo III de *D. melanogaster* apresenta uma orientação diferente quando comparada com o Pnut (Figura 34B), mostrando que essa orientação do *trans-loop1* é específica para a interface G entre septinas dos grupos II e III (como reportado por Rosa *et al.*, 2020 em septinas humanas).

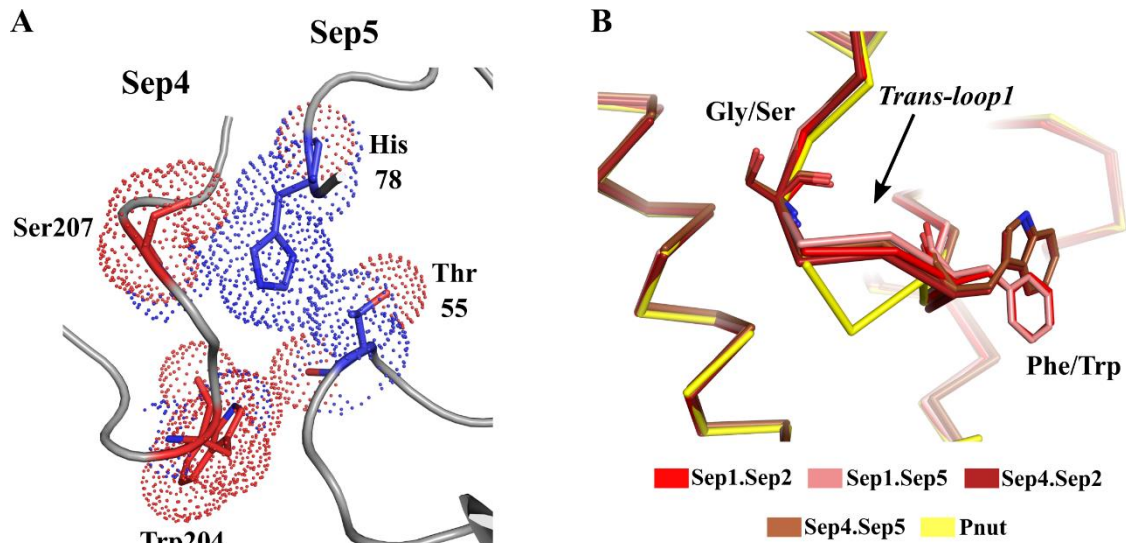


Figura 34 - Redes de interação envolvendo resíduos característicos dos grupos na interface G de heterodímeros do Grupo II e Grupo III de *Drosophila melanogaster*. A) Interação entre grupo metil da Thr55 com a His78 da Sep5, orientando o anel imidazol da His78 para o *trans-loop1* da Sep4(G). B) A orientação do *trans-loop1* é conservada mesmo com as substituições Phe/Trp e Gly/Ser. O *trans-loop1* em septinas do Grupo III de *D. melanogaster* apresenta uma orientação diferente quando comparada com o Pnut, mostrando sua especificidade para os grupos II e III.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A segunda rede de interações envolve um aminoácido hidrofóbico pequeno presente no *switch I* de Sep1 e Sep4 que interage num bolsão hidrofóbico formado no *trans-loop1* de Sep2 e Sep5. A serina característica do Grupo II é substituída por uma alanina em Sep5, porém, esta substituição não muda o formato da cavidade hidrofóbica formada no *trans-loop1* como observado na Figura 35 (cavidade dos quatro heterodímeros de septinas de *D. melanogaster*). Em Sep1(G).Sep2(G) como nos heterodímeros formados por septinas humanas dos grupos II e III, a presença da alanina (um aminoácido hidrofóbico pequeno) no *switch I* em septinas do Grupo III é fundamental para manter a interação hidrofóbica devido ao tamanho do bolsão formado no *trans-loop1* de septinas do Grupo II. (61) Esta condição é conservada nos heterodímeros de *D. melanogaster*, observando como a Ala69 se acomoda no bolsão da Sep5 (que tem alanina no lugar de serina na posição 165). Com uma substituição da alanina por valina (119) na Sep4, o mesmo encaixe no bolsão hidrofóbico da Sep5 é observado (Figura 35).

Estes resultados mostram que, embora pequenas substituições nos resíduos característicos nas septinas dos grupos II e III, as regiões de contato são conservadas entre septinas de insetos e humanos. Além disso, estes resultados mostram que pequenas alterações em resíduos envolvidos em contatos na interface G podem ser toleradas sem prejudicar a

capacidade de forma heterodímeros conforme a Regra de Kinoshita. Futuramente, seria interessante investigar se estas pequenas diferenças entre integrantes do mesmo grupo levam a preferências de pareamento entre as quatro possibilidades (Sep1-Sep2, Sep1-Sep5, Sep4-Sep2, Sep4-Sep5).

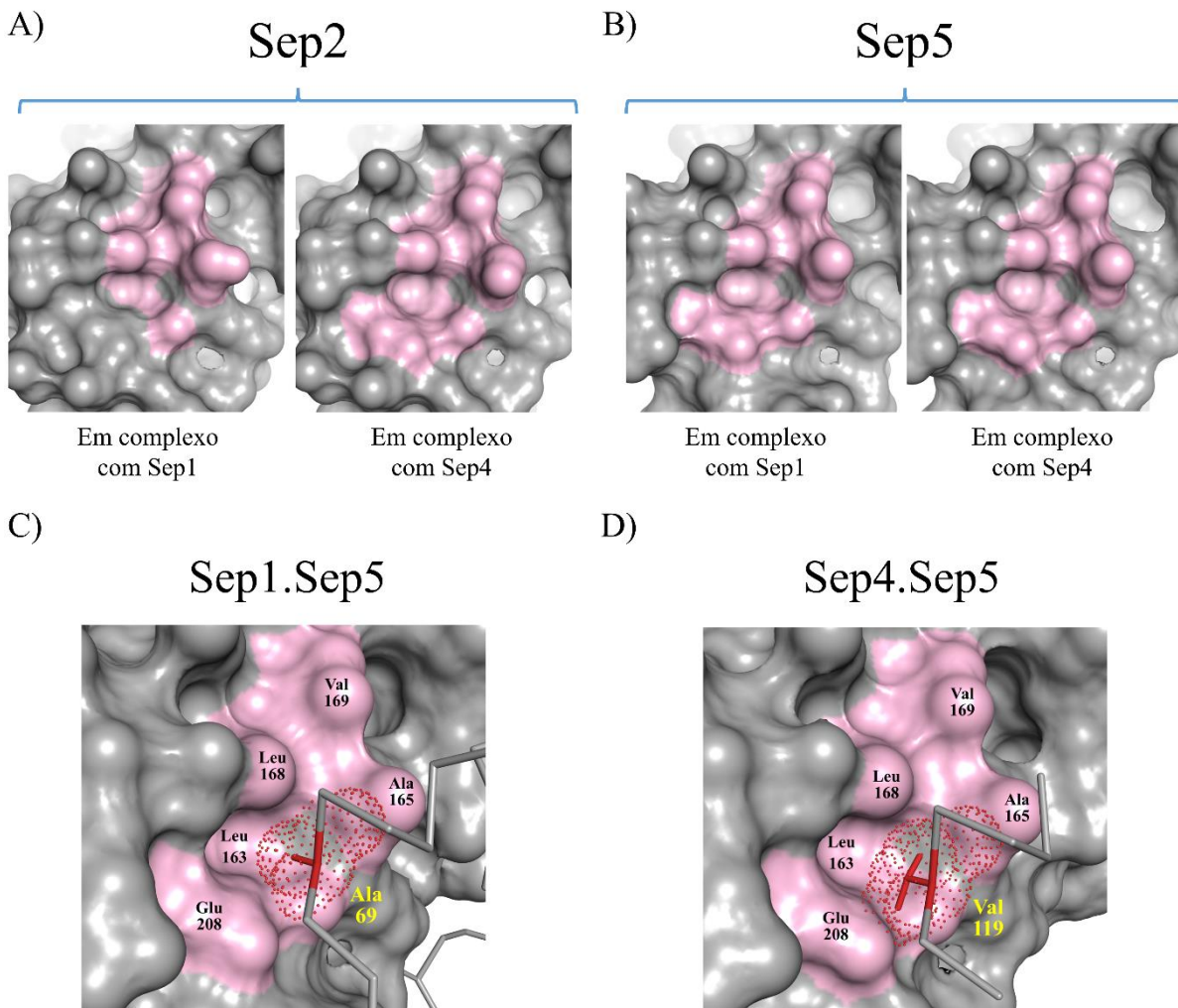


Figura 35 - Comparação entre os bolsões hidrofóbicos formados no *trans-loop1* de Sep2 e Sep5. A mutação de uma serina característica do Grupo II presente em (A) Sep2 por uma alanina em Sep5 (B) não altera o formato da cavidade hidrofóbica formada no *trans-loop1*. C) Presença de Ala69 em Sep1 encerrada no bolsão hidrofóbico de Sep5. D) Presença de por Val119 em Sep4 mantém o mesmo encaixe no bolsão hidrofóbico de Sep5.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Capítulo 5

Caracterização Estrutural

Interface G:

Grupo IV

5.1 ESTABILIDADE DA INTERFACE G DE Pnut.Pnut E SEPT7.SEPT7

Como não foi possível obter sucesso com as tentativas de cristalização de Pnut(G), foram realizados experimentos de modelagem computacional por homologia utilizando o programa MODELLER 10.1 baseado no conceito de que proteínas que possuem alta identidade possuem estrutura bem semelhante. Para isto, foram utilizados como molde o dímero de septinas humanas SEPT7(G) com resolução de 1,739 Å (PDB ID: 6N0B). Nesta etapa de produção de modelos, foi gerado um modelo do dímero completo de SEPT7.SEPT7 humano (incluindo regiões faltantes na estrutura cristalográfica) e o dímero equivalente em drosófila de Pnut.Pnut.

A organização do hexâmero humano (SEPT2.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2) e de *Drosophila* (Sep1.Sep2.Pnut.Pnut.Sep1.Sep2) resulta em um dímero no seu centro formado por um integrante do Grupo IV (SEPT7.SEPT7 e Pnut.Pnut respectivamente) estabilizado por uma interface G. Os resíduos participantes desta interface G foram mapeados para Pnut e SEPT7 como pode ser observado na Figura 36. As interfaces de contato se apresentaram bem conservadas nos dois casos. Entretanto, há uma significativa diferença entre SEPT7(G).SEPT7(G) e Pnut(G).Pnut(G), em que os resíduos Glu58 e Lys173 presentes em humanos (vermelho, Figura 36C), são substituídos por Ala150 e Leu266 em *D. melanogaster* (círculo vermelho pontilhado, Figura 36A).

Glu58 e Lys173 formam uma rede de interação eletrostática intra e inter cadeias, como pode ser verificado na Figura 36D. A lisina possui uma carga positiva em pH neutro, o que interage com a carga negativa do ácido carboxílico do glutamato. Esta rede de interação sugere que a interface G em SEPT7.SEPT7 poderia ser mais estável comparado com Pnut.Pnut, uma vez que esta rede de interação é perdida pela substituição dos aminoácidos carregados por aminoácidos hidrofóbicos (Figura 36B). Além disso, a rede de ligações eletrostáticas está escondida no centro da interface onde se espera encontrar uma constante dielétrica baixa, fortalecendo a contribuição das pontes salinas à estabilidade da interface. Na verdade, cada carga é posicionada entre duas cargas de sinal oposto, como pode ser visto na Figura 36D, gerando um arranjo conhecido como uma ponte salina complexa ou bifurcada. (153) Tais interações tendem a estabilizar interfaces de uma forma cooperativa. O ângulo formado pelos C^α dos resíduos que formam as pontes bifurcadas (Glu-Lys-Glu) é sempre menor que 90° como visto em estudos anteriores (153-155) sugerindo um arranjo clássico e estabilizante.

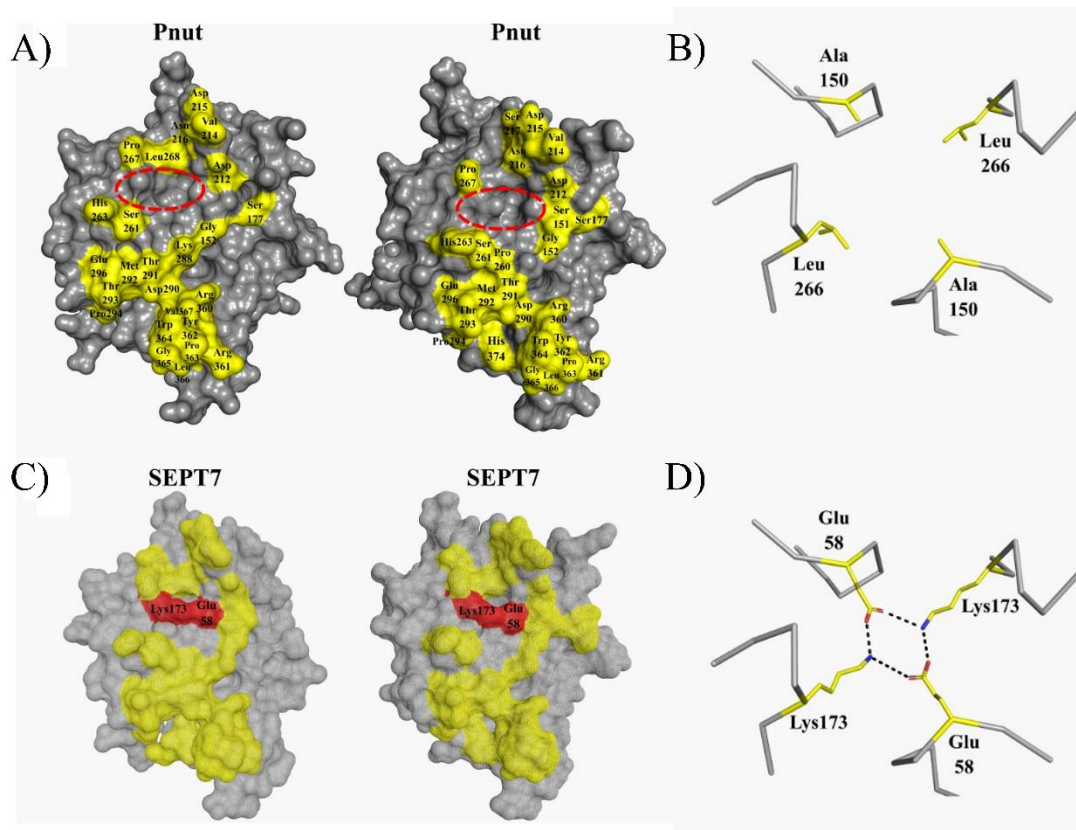


Figura 36 - Identificação dos resíduos envolvidos na interface de interação do tipo G para o Grupo IV. A) Pnut.Pnut. As subunidades foram separadas e giradas em 90° em torno do eixo Y para expor os resíduos participantes da interação via interface G-G. Destaque em vermelho para a ausência de uma região de interação presente em SEPT7. Esta região é apresentada em (B) mostrando um núcleo formado por Ala150 e Leu166 em cada uma das cadeias. C) SEPT7.SEPT7, também separadas e giradas em 90° em torno do eixo Y para expor os resíduos participantes da interação via interface G-G. Destaque em vermelho para os resíduos de interação presentes apenas em SEPT7. D) Observação dos resíduos presentes somente em SEPT7, sendo possível verificar interações eletrostáticas entre Glu58 e Lys, do tipo inter e intra cadeia, adicionando assim mais uma região de interação à SEPT7 se comparado a Pnut.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como verificado anteriormente, Pnut(G) quando purificada em tampão com 150 mM de NaCl apresenta a coexistência de dois picos (dímeros e monômeros) (Figura 15A). A dependência da concentração salina foi testada em diferentes concentrações de NaCl como pode ser visto na Figura 37A. Neste experimento, constatou-se que Pnut se apresenta monomérica para tampão com 350 mM de NaCl, e a população do dímero aumenta com a diminuição de sal. Brognara *et al.* (2019) demonstrou que, quando utilizado o mesmo tampão de purificação, com faixas de concentração de 150 mM a 300 mM, SEPT7 é encontrada na forma dimérica. (64,156) Desta forma, conclui-se que a concentração salina é crítica para a formação de homodímeros, e que SEPT7 possui complexação mais estável se comparado com Pnut, uma vez que em um

mesmo ambiente tamponante de 300 mM de NaCl por exemplo, SEPT7 é encontrada na forma dimérica, já Pnut na forma monomérica.

Estes resultados podem ser relacionados com a perda da ponte salina bifurcada em Pnut Figura 37B. Analisando e comparando os resultados experimentais com os modelos computacionais de Pnut e SEPT7, verifica-se que há um afastamento da distância entre as cadeias laterais de aminoácidos homólogos, que em SEPT7 a distância entre Glu58 e Lys173 é de 3,7 Å, já em *D. melanogaster* a distância entre Ala150 e Leu266 é de 6,5 Å, por exemplo.

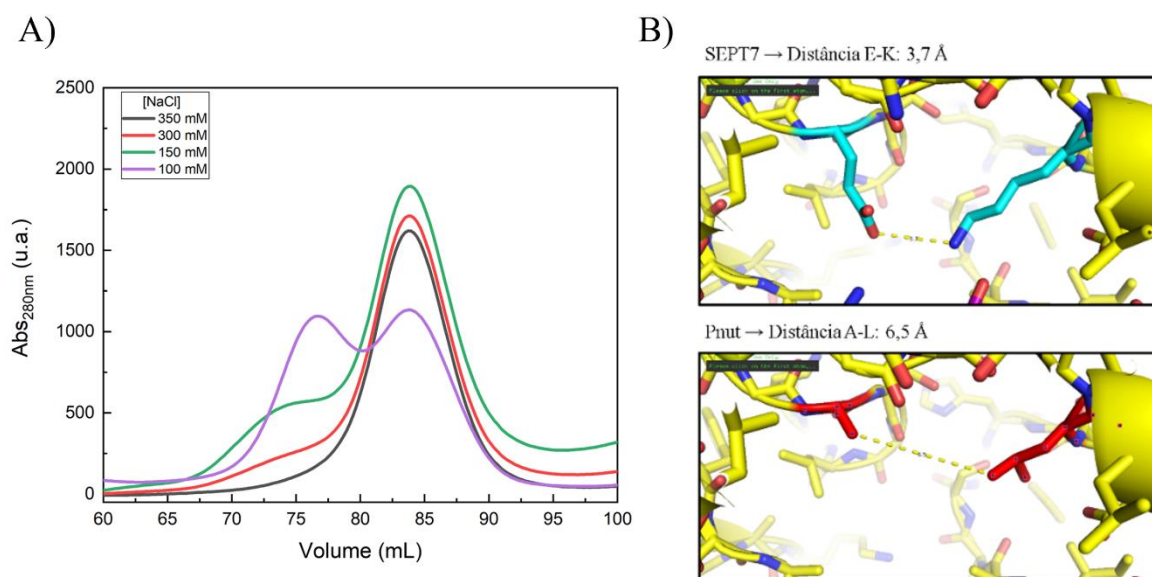


Figura 37 - Fatores que influenciam na estabilidade de Pnut e SEPT7. A) Variação da concentração de sal em tampão de purificação de Pnut(G). Verifica-se que numa concentração de 100 mM NaCl, há a presença de dois picos: dímeros e monômeros. A concentrações mais altas de NaCl, observa-se apenas monômeros. B) Comparativo entre as interfaces de contato SEPT7(G).SEPT7(G) e Pnut(G).Pnut(G) em que é possível verificar as substituições dos aminoácidos Glu58 e Lys173 por Ala58 e Leu173 em *D. melanogaster*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir destes resultados, foram gerados novos modelos mutantes, sendo que os resíduos Glu58 e Lys173 de SEPT7(G) foram substituídos por uma Ala58 e Leu173, respectivamente gerando SEPT7(G)_{mut}. Em Pnut(G), Ala150 e Leu266 foram substituídos por Glu150 e Lys266 respectivamente, gerando Pnut(G)_{mut}. O mutante Pnut(G)_{mut} foi estudado experimentalmente, mostrando uma alteração no seu estado oligomérico para a forma dimérica, se comparado com o estado oligomérico do tipo selvagem (monômero) (Figura 17), sugerindo um rol estabilizador da ponte bifurcada em Pnut(G)_{mut}.

Inicialmente, com os modelos destes dímeros nativos e mutantes construídos, foram verificados os parâmetros energéticos para a formação da interface dimérica utilizando o programa PISA. Estes resultados podem ser verificados na Tabela 11 a seguir:

Tabela 11 - Análise de PISA para os modelos de dímeros de septinas canônicas e mutantes do Grupo IV de *D. melanogaster* e *H. sapiens* obtidos por MODELLER.

	SEPT7(G)	Pnut(G)	SEPT7(G)_{mut}	Pnut(G)_{mut}
Área de Interface (Å ²)	1.347,3	1.322,4	1.330,8	1.359,0
Energia total de ligação da interface (kcal/mol)	-23,2	-19,5	-22,5	-22,2
Número de pontes salinas	10	6	8	8

Fonte: Elaborada pelo autor.

Verifica-se que a interface SEPT7(G).SEPT7(G) é a mais estável entre as proteínas analisadas, sendo a que tem maior número de pontes salinas (10) além de ser energeticamente mais estável se comparado com Pnut(G).Pnut(G).

Verifica-se também que SEPT7_{mut}(G) perdeu 2 pontes salinas se comparado ao estado nativo e Pnut_{mut}(G) possui 2 pontes salinas a mais do que Pnut(G) (o que era esperado). A área da interface em SEPT7_{mut}(G) diminuiu, enquanto que para Pnut_{mut}(G) aumentou. De acordo com a energia da interface, a mutação desestabilizou SEPT7_{mut}(G) (embora pouco), mas conferiu estabilidade à Pnut_{mut}(G). Ou seja, a análise de PISA está coerente com a lógica de realizar as mutações, o que é confirmado pelo ganho de estabilidade para Pnut_{mut}(G) de cerca de 8°C em sua T_M verificado por dicroísmo circular (Figura 21). Isso prova que a ponte salina bifurcada estabiliza a interface G em Pnut, modificando tanto o estado oligomérico quanto aumentando sua termoestabilidade (Figura 22). Com base nesses achados, as mutações em Pnut (Ala150Glu e Leu266Lys) demonstram a importância da ponte salina bifurcada na estabilidade da interface G do subgrupo SEPT7.

5.2 ANÁLISES DE DINÂMICA MOLECULAR DIRECIONADA ADAPTATIVA (ASMD)

Para analisar a dificuldade de separação das subunidades dos homodímeros Pnut(G).Pnut(G), SEPT7(G).SEPT7(G) e seus mutantes, auxiliando na compreensão de resíduos importantes para a estabilidade da interface (particularmente as pontes salinas), recorreu-se a técnica de Dinâmica Molecular Direcionada Adaptativa, do inglês *Adaptive Steered Molecular Dynamics* (ASMD) aplicando forças em direções opostas aos dois monômeros com o intuito de separá-los. (122-123) ASMD é uma variante da Dinâmica Molecular Direcionada (SMD) onde a força externa é aplicada em diversos estágios curtos visando uma maior convergência.

Assim, forças em direções opostas foram aplicadas a cada subunidade dos homodímeros para separá-los transversalmente. As energias de interação (potencial, eletrostática e *Van der Waals*) foram monitoradas ao longo da simulação de acordo com o campo de força utilizado nas análises. As análises de ASDM foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP).

Ao analisar SEPT7(G), observa-se que as interações eletrostáticas na interface G são bastante expressivas em relação à energia total de interação entre as subunidades (Figura 38A).

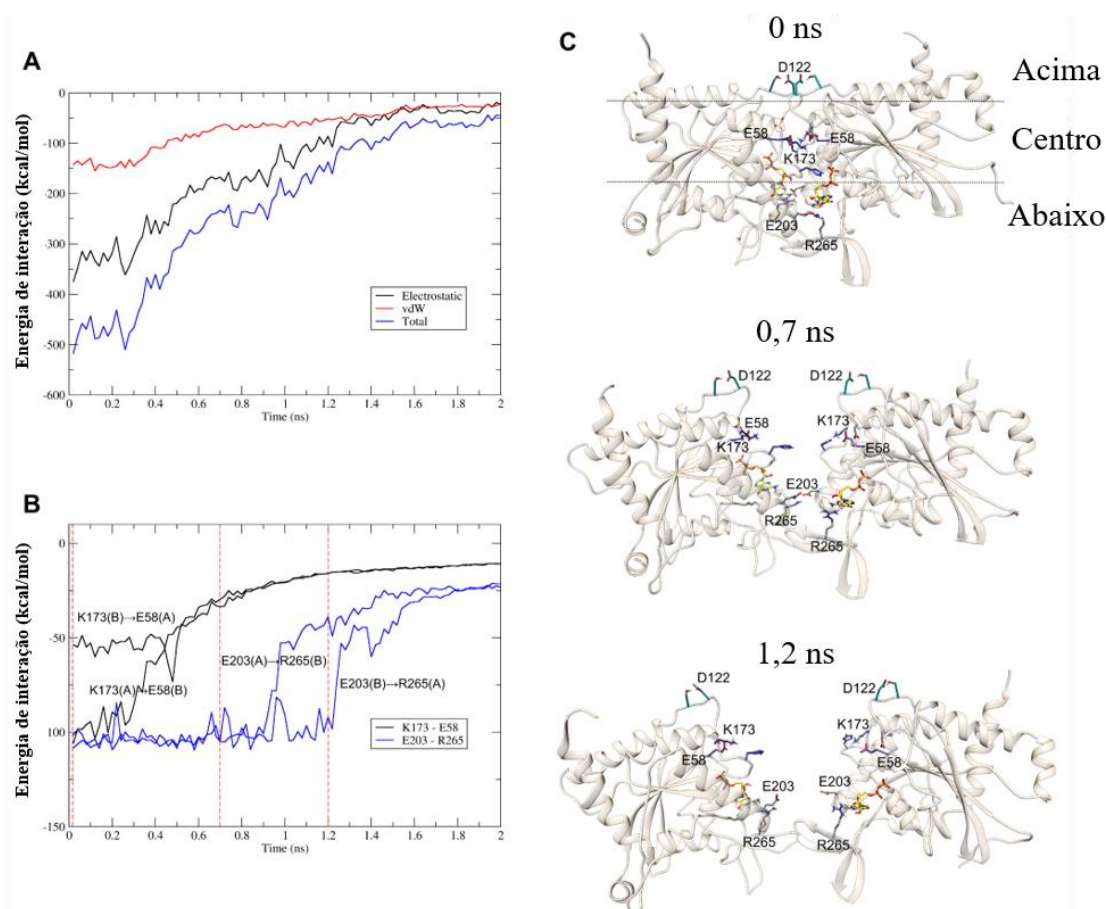


Figura 38 - Análise ASMD em SEPT7. A) Cálculo da energia de interação entre as subunidades do homodímero ao longo do tempo de simulação. Observamos que a contribuição da energia eletrostática (linha preta) é maior comparada à de *Van der Waals* (linha vermelha). B) Análise do comportamento da energia eletrostática em função do tempo de simulação. A interação entre os resíduos da ponte salina bifurcada (Glu58 e Lys173) é perdida de ~0,3 ns. Um segundo componente eletrostático importante (Glu203 e Arg265) se dissocia em ~0,9 ns. Ambas as interações eletrostáticas experimentam separação assimétrica. C) Trajetórias SEPT7.SEPT7 nos tempos 0; 0,7 e 1,2 ns de simulação. Em 0,7 ns, observamos a dissociação da região superior e intermediária, que constituem a ponte β formada pela interação do *switch II* de ambas as subunidades e a ponte salina bifurcada, respectivamente. Em 1,2 ns, o homodímero está quase completamente dissociado, com a separação do segundo componente eletrostático (Glu203 e Arg265) na região inferior.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com uma energia de interação total inicial de cerca de -500 kcal/mol, os componentes eletrostáticos contribuem com aproximadamente -350 kcal/mol, demonstrando seu papel crítico na estabilidade da interface G no homodímero SEPT7. A análise das trajetórias ao longo do processo de separação de monômeros permitiu identificar uma segunda contribuição eletrostática entre as subunidades de homodímero, Glu203 e Arg265 (ambas conservadas na maioria das septinas), que estão localizadas na região inferior (próximo ao motivo meandro) (Figura 38C). As subunidades sofrem uma separação tipo “zíper”, começando com uma

abertura na região de contato do *switch II* de ambas as subunidades (região superior) (Figura 38C). Então, começando em $\sim 0,3$ ns, o homodímero experimenta uma queda progressiva na energia de interação (perda relacionada a contribuições eletrostáticas) (Figura 38A). A primeira interação eletrostática a ser separada é a ponte salina bifurcada, a $\sim 0,3$ ns (Figura 38B e Figura 38C).

A contribuição energética das pontes salinas inter-cadeias não é igual, com Lys173(A) \rightarrow Glu58(B) em ~ -100 kcal/mol e Lys173(B) \rightarrow Glu58(A) em cerca de -50 kcal/mol. No entanto, ambos convergem para a mesma perda de energia desde os $\sim 0,3$ ns. A Figura 38C mostra que em $0,7$ ns a ponte salina bifurcada está totalmente separada. Uma segunda queda de energia ocorre em $\sim 0,9$ ns, onde a interação entre Glu203(A) \rightarrow Arg265(B) é interrompida. No entanto, a interação entre Glu203(B) \rightarrow Arg265(A) no outro lado da interface G quebra em $1,2$ ns (Figura 38B). Isso produz uma separação assimétrica entre ambas as subunidades no final da simulação (Figura 38C).

Já SEPT7_{mut}(G) tem perda de ~ 250 kcal/mol na energia de interação total inicial em comparação com SEPT7 (Figura 39A). Neste caso, observamos que as contribuições iniciais dos componentes eletrostáticos e de *Van der Waals* são próximas (~ -100 a -150 kcal/mol).

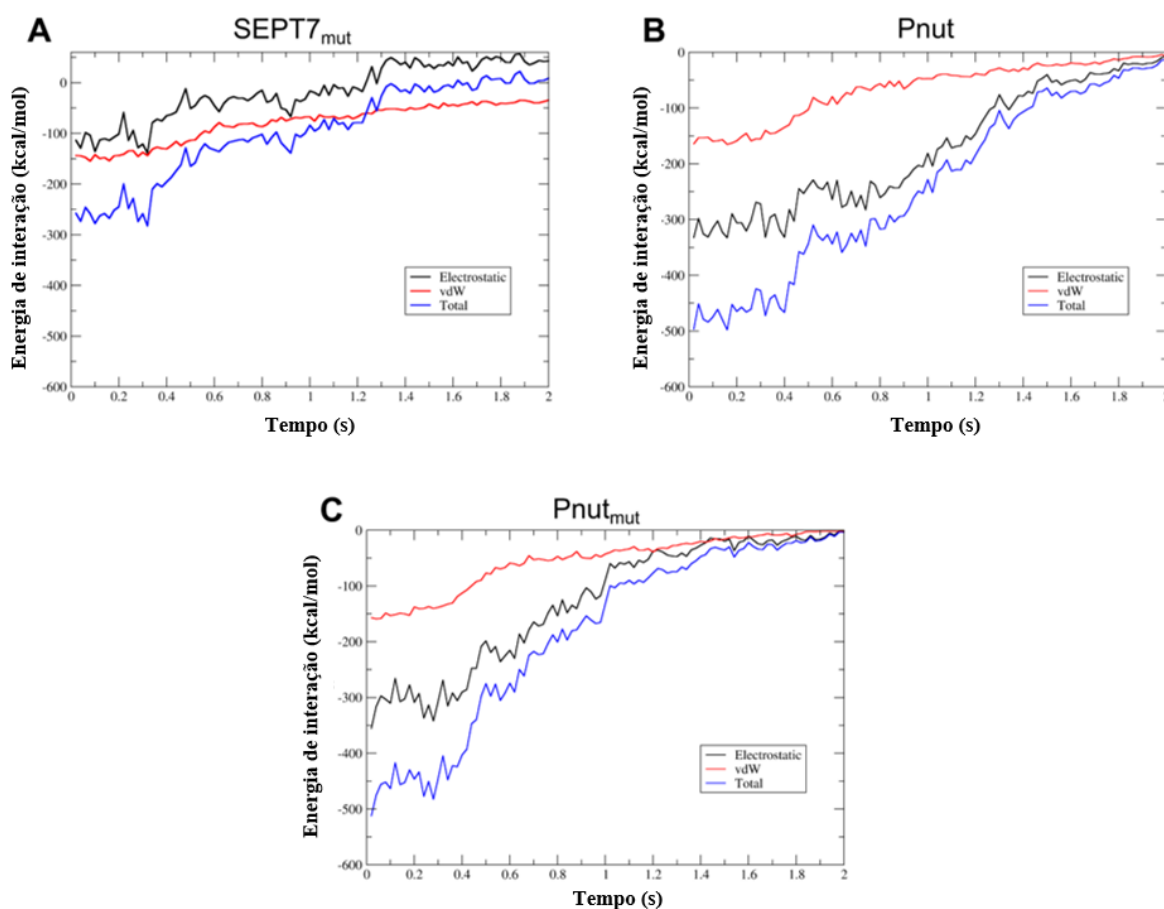


Figura 39 - Cálculo da energia de interação em homodímeros ao longo do tempo de simulação. A) SEPT7_{mut} mostra uma queda de ~250 kcal/mol na energia de interação em relação ao tipo selvagem SEPT7. Da mesma forma, as contribuições eletrostática e de *Van der Waals* são equivalentes. B) Pnut e C) Pnut_{mut} apresentam energia de interação semelhante, com maior contribuição do componente eletrostático.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a ausência da ponte salina bifurcada, o decaimento na energia de interação eletrostática é observado em ~0,9 ns, ponto em que a interação Glu203(B) → Arg265(A) começa a se dissociar (Figura 40B). Então, como no SEPT7 de tipo selvagem, a segunda interação Glu203(A) → Arg265(B) quebra em ~ 1,2 ns passando por separação assimétrica (Figura 40B).

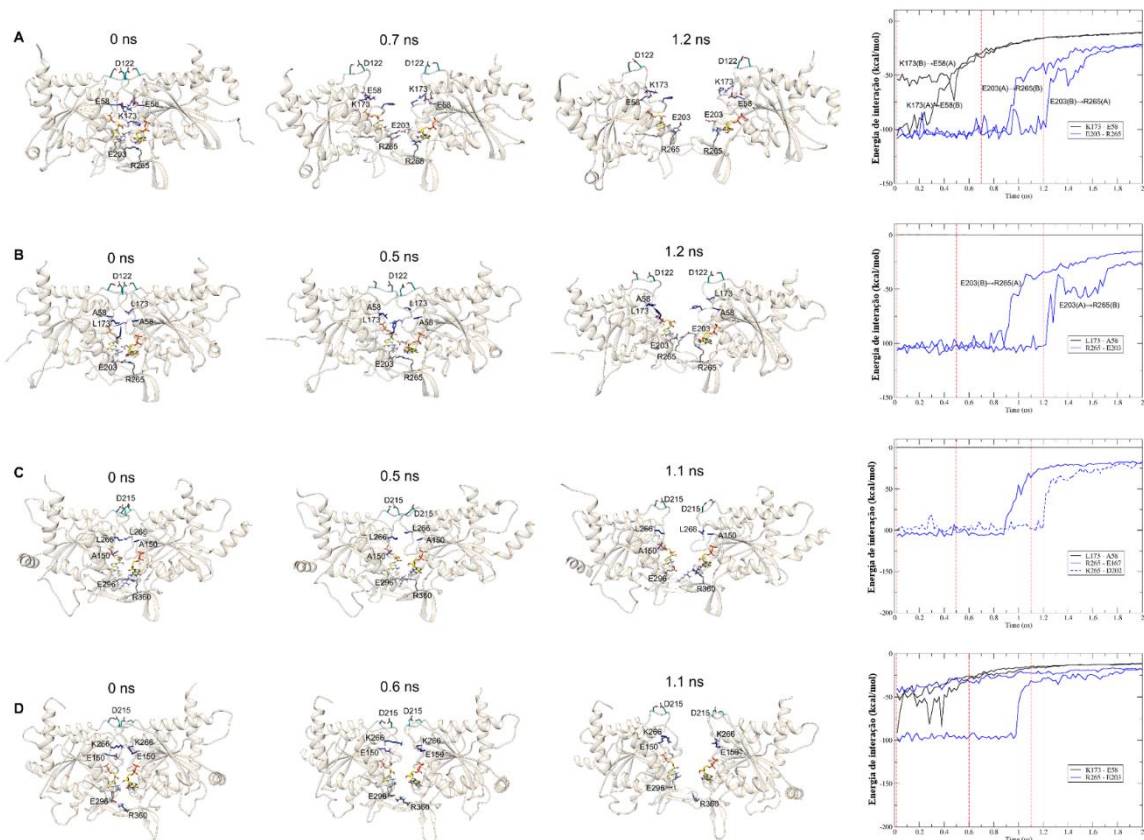


Figura 40 - Análise ASMD em SEPT7, SEPT7mut, Pnut e Pnut_{mut}. A figura mostra as trajetórias e a análise do comportamento da energia eletrostática em função do tempo de simulação. Em (A) é possível observar o comportamento de dissociação para SEPT7. Verificamos o comportamento de dissociação para SEPT7_{mut} (B) e Pnut (C), com a ausência da ponte salina bifurcada, os componentes eletrostáticos se dissociam assimetricamente de ~0,9 ns. No entanto, em Pnut_{mut} (D), a dissociação começa em ~0,4 ns.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A diferença entre a energia de interação total de SEPT7(G) e SEPT7_{mut}(G) sugere uma desestabilização da interface G devido à ausência da ponte salina bifurcada, refletida na redução do trabalho total acumulado ao longo do deslocamento das subunidades em SEPT7_{mut}(G) (Figura 41A).

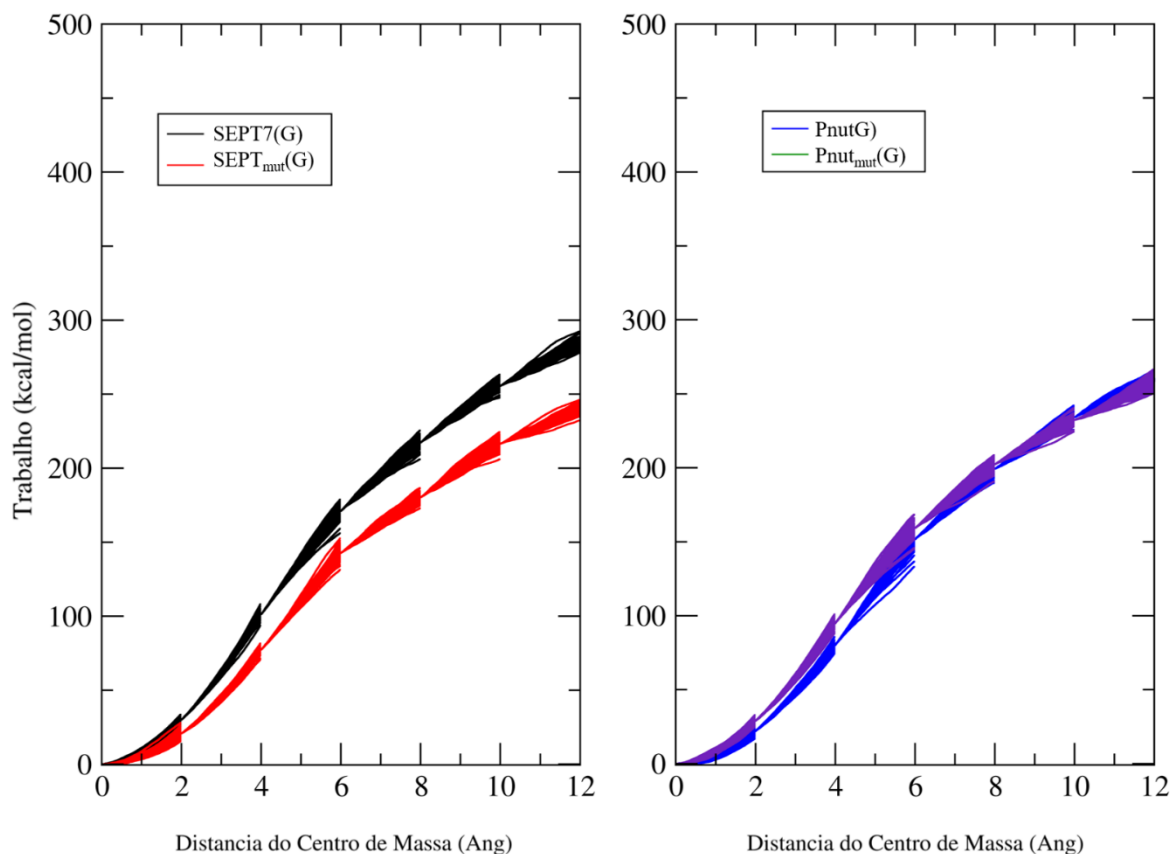


Figura 41 - Evolução temporal das análises de ASMD para SEPT7(G), Pnut(G) e mutantes. Trabalho necessário teórico em kcal/mol para o restabelecimento do sistema em função da distância do centro de massa para SEPT7(G) (em preto), SEPT7(G)_{mut} (em vermelho), Pnut(G) (em azul) e Pnut(G)_{mut} (em roxo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível perceber é que a diferença observada entre SEPT7(G) e SEPT7_{mut}(G) é mais acentuada do que a diferença entre Pnut(G) e Pnut_{mut}(G). Pnut(G) e Pnut_{mut}(G) apresentam energia de interação similares (Figura 39B e Figura 39C), curiosamente com os componentes eletrostáticos contribuindo equivalentemente para a energia de interação. Além disso, ambos homodímeros experimentam uma separação assimétrica como observada em SEPT7(G) e SEPT7_{mut}(G) (Figura 40C e Figura 40D). A diferença observada para Pnut nativa e mutante está contida na região do gráfico para deslocamento abaixo de 10 Å (Figura 41). Estes resultados demonstram a importância da ponte salina bifurcada na estabilização da interface G entre septinas do subgrupo SEPT7, o que sugere uma maior facilidade de separação de um hexâmero formado por septinas de *D. melanogaster* que o hexâmero formado por septinas humanas. Porém, a maior estabilidade da interface G de SEPT7 quando comparado com Pnut provavelmente envolve outros fatores, uma vez que não foi possível recuperar a estabilidade

total da interface com a introdução dos resíduos que compõem a ponte bifurcada, pelo menos quando estimado pelas simulações aqui apresentadas. Por outro lado, como relatado anteriormente, a introdução experimental dos resíduos carregados resultou em maior estabilidade térmica e o favorecimento da forma dimérica.

Capítulo 6

*Estudo da flexibilidade e energias
de formação de oligômeros de
septinas*

6.1 ESTUDOS DA FLEXIBILIDADE DOS OLIGÔMEROS DE SEPTINAS

Aqui passamos a investigar por meio da Dinâmica Molecular (DM) as características gerais de complexos de septinas, como flexibilidade para hexâmeros de septinas de *D. melanogaster* e humanos. Estes estudos foram motivados por duas observações da literatura.

A primeira motivação vem de diversos estudos mostrando a capacidade de filamentos de septinas em reconhecer membranas que apresentam curvatura. (37,157) Há relatos de interação tanto com superfícies côncavas quanto convexas e até a possibilidade de o filamento induzir a própria curvatura. Estas observações sugerem que o filamento deve apresentar um grau de flexibilidade que pode ser ou intrínseca ou induzido pela interação com a membrana. Estudos da dinâmica molecular dos oligômeros poderiam revelar sua flexibilidade intrínseca e, portanto, ajudar em entender como o filamento se deita na membrana durante importantes processos biológicos.

A segunda motivação dos estudos de DM foca no papel da hélice- $\alpha 0$ e a sua região polibásica. Esta hélice está localizada no início do domínio G e serve como conexão com o domínio N-terminal. Parte da hélice- $\alpha 0$ corresponde à primeira região descrita na literatura como tendo um papel na interação entre septinas e membranas e foi batizada de PB1 (região polibásica 1). Apesar do seu suposto papel na interação com membranas, a maioria das estruturas no PDB que contém esta região mostram claramente que a região PB1 está escondida na interface NC. Nesta conformação a interação com lipídeos ácidos da membrana (tipo PIPs) seria impossível. (158) Em apenas uma estrutura cristalográfica a hélice $\alpha 0$ foi observada fora da interface, expondo os resíduos básicos e, portanto, em condições de interagir com a membrana. (30) Nesta estrutura a interface NC está numa conformação “fechada” devido a aproximação das subunidades e a hélice- $\alpha 0$ é obrigada a sair da interface por conta de impedimentos estéricos.

Até o momento, o “fechamento” da interface NC (e a exposição da hélice- $\alpha 0$) só foi visto para um único grupo de septinas humanas (Grupo I, composto por SEPT3, SEPT9 e SEPT12). É justamente este grupo de septinas que está presente em octâmeros humanos, mas ausente de hexâmeros e, além disso, drosófila não apresenta septinas representantes deste grupo. Esta observação levanta uma série de perguntas. Será que apenas os integrantes do Grupo I são capazes de expor a região PB1? Qual seria o papel desta região no caso de hexâmeros que não contêm septinas deste grupo (especificamente no caso de Drosófila)? Por este motivo

iniciamos estudos de dinâmica molecular para tentar iluminar a questão da flexibilidade do complexo na presença da hélice- $\alpha 0$.

Inicialmente, foi elaborado um hexâmero humano utilizando como molde as estruturas já conhecidas das septinas humanas SEPT2(G).SEPT6(G) com resolução de 2,51 Å (PDB ID: 6UPA) e SEPT7(G) com resolução de 1,74 Å (PDB ID: 6N0B). (59,60) A partir deste, um novo modelo para o hexâmero humano foi gerado em que os resíduos faltantes nas estruturas foram completados pelos métodos de restrição utilizados pelo MODELLER 10.1. (108) Estas construções foram modeladas com a presença de alguns resíduos correspondentes a região do “hook-loop” (HL). Esta região conecta o motivo rico em prolina não estruturado do domínio N-terminal à hélice $\alpha 0$ (Figura 42) (65) e faz uma contribuição importante à interface NC mas está normalmente ausente das estruturas cristalográficas. Porém, a sua presença na estrutura resolvida por crio-microscopia eletrônica permitiu a montagem do modelo contendo esta região. (65) Em especial, uma fenilalanina presente nesta região poderia atuar como âncora que dificultaria a mobilidade da hélice- $\alpha 0$ (esta fenilalanina é conservada nos grupos de SEPT2, SEPT6 e SEPT7). (65) O mesmo princípio foi utilizado para a modelagem do hexâmero de *D. melanogaster*, constituído por Sep1(G).Sep2(G).Pnut(G).Pnut(G).Sep2(G).Sep1(G), com a presença de HL. Ao se realizar um alinhamento entre as sequências destas septinas, verifica-se que esta fenilalanina também está presente no HL de drosófila (Figura 42).

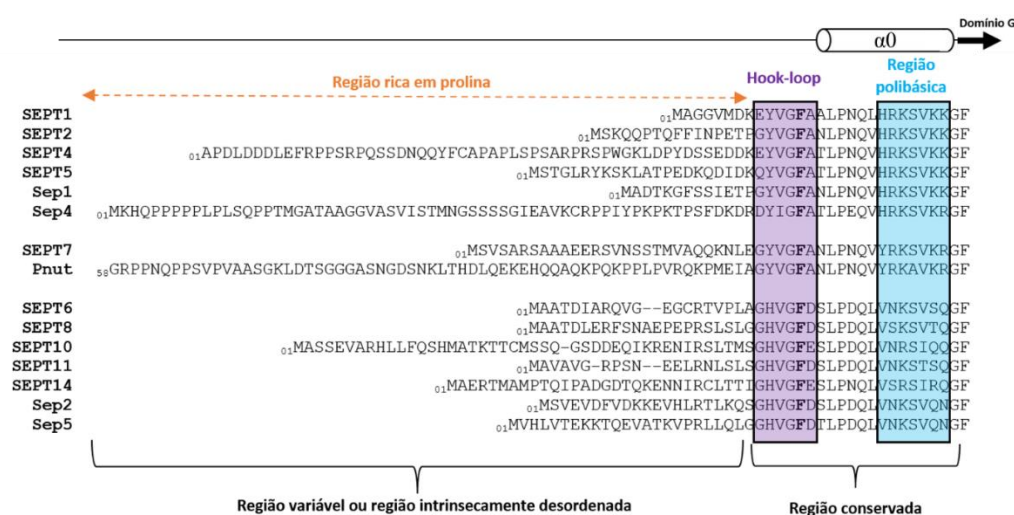


Figura 42 - Alinhamento das sequências N-terminais para os grupos II, III e IV de septinas humanas e de drosófila. É demonstrado a região não estruturada rica em prolina (região variável ou região intrinsecamente desordenada) e a região estruturada (região conservada). Esse alinhamento também destaca as porções que correspondem ao hook-loop de cada proteína, bem como a região polibásica e a fenilalanina da $\alpha 0$ conservada dentro de cada grupo de septinas (em negrito).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Modelos iniciais de hexâmeros humanos e de *Drosophila* contendo HL foram analisados em simulações de equilíbrio longas (até 1 μ s) na presença de solvente explícito. Novamente o pacote AMBER foi utilizado, com campo de força AMBER FF19SB [116]. Cada sistema consiste em aproximadamente 500.000 átomos contendo o hexâmero humano ou de drosófila com seus respectivos nucleotídeos e uma concentração de sal de 150 mM.

A partir de então, foi realizada uma análise geral da conformação do complexo durante a dinâmica molecular com a finalidade de observar sua movimentação ao longo do tempo. Esta abordagem foi realizada para os hexâmeros de drosófila e humano. Para isto, um ângulo de curvatura foi definido a partir dos centros de massas da septinas SEPT2(G), nas extremidades do hexâmero e o centro de massa do dímero de SEPT7(G) na porção central do hexâmero. Os três pontos empregados para a definição do ângulo de curvatura estão representados em esferas semitransparentes na Figura 43A. Em princípio, para um filamento hexâmero completamente linear, o ângulo de curvatura definido desta forma deve apresentar um valor de 180° , enquanto ângulos menores do que este indica a curvatura (ou dobramento) da estrutura hexamérica.

Este ângulo de curvatura foi calculado para a trajetória obtida em simulações de equilíbrio com 500 ns de duração (Figura 43B). Esta movimentação pode também ser mensurada visualmente por meio da superposição de diferentes frames da trajetória e que foram alinhados ao dímero central SEPT7(G).SEPT7(G), como mostra a Figura 43C, onde são dispostos 30 frames ao longo da simulação. As escalas de cores variam de vermelho para as regiões com menor variação posicional, a azul sendo as porções com maior grau de flexibilidade.

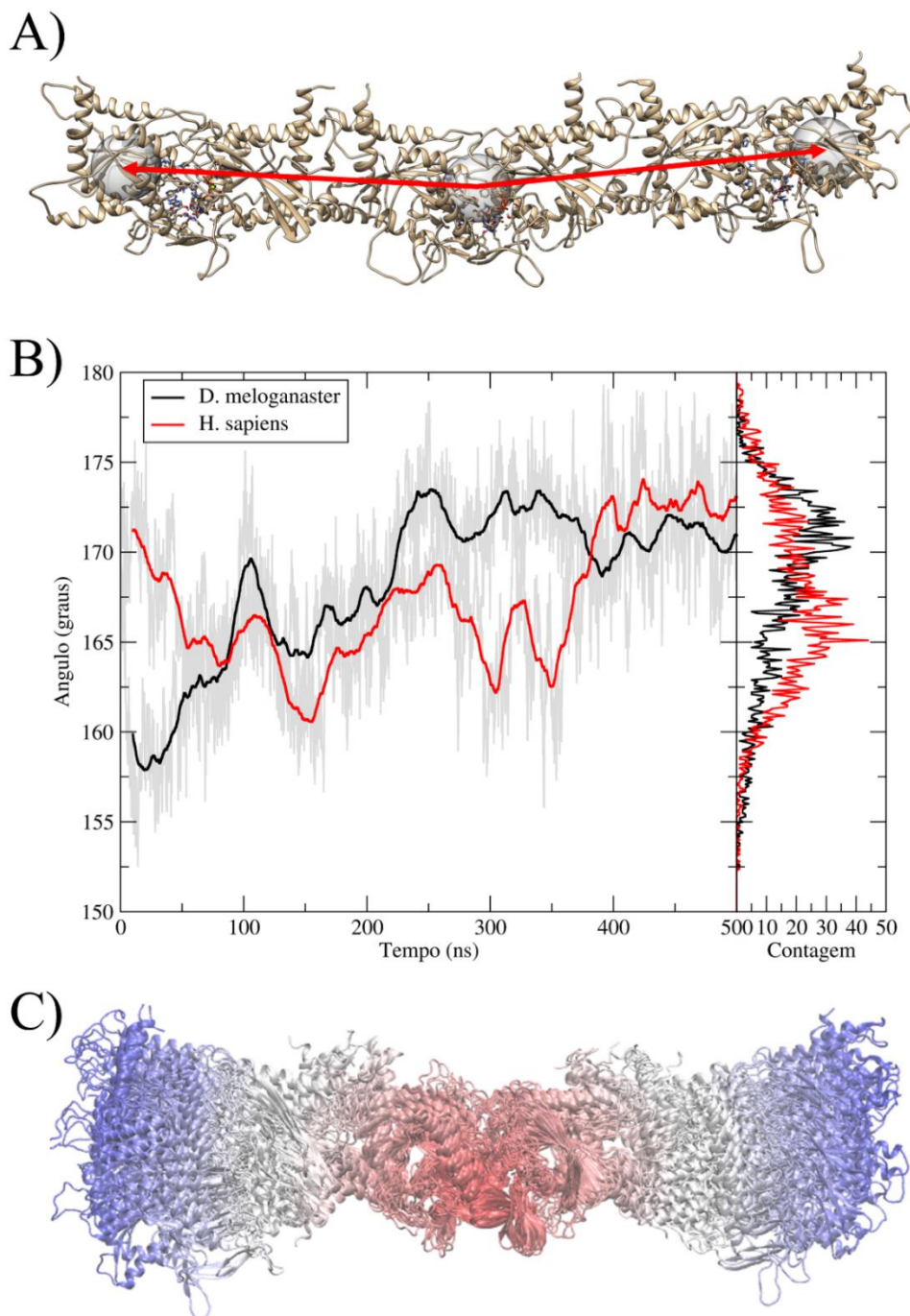


Figura 43 - Monitoramento da flexibilidade de hexâmeros. A) Definição do ângulo de curvatura a partir dos vetores definidos partindo do centro de massa dímero central (SEPT(G).SEPT7(G)) até os monômeros na extremidade do hexâmero. Estes pontos estão mostrados em esferas semitransparentes. B) Registro do ângulo de curvatura em função do tempo durante a trajetória de 500 ns. Em preto: hexâmero de *D. melanogaster*; em vermelho: hexâmero de *H. sapiens*. O gráfico ao lado mostra a distribuição da frequência (contagem de frames) para diferentes ângulos. C) Superposição de 30 frames da simulação do hexâmero humano. Os frames foram alinhados pelas estruturas do dímero central (SEPT7(G).SEPT7(G)) e o espectro de cores varia de vermelho (menor amplitude de movimento) a azul (maior amplitude de movimento) mostrando a evolução temporal dos frames na simulação. A flexibilidade do hexâmero como um todo é evidente na figura com um movimento de flexão no sentido *top-down* (usando a orientação mostrada na figura).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser constatado, os ângulos iniciais são de próximo a 160° para drosófila e de 172° para humanos. Nos primeiros 100 ns de trajetória, os ângulos de curvatura possuem comportamentos distintos, enquanto aumenta para *D. melanogaster*, diminui para o caso de *H. sapiens*. Ao longo da trajetória, a movimentação dos hexâmeros são bastante variáveis, sendo que próximo dos 500 ns, os ângulos dos dois complexos se assemelham. A contagem da frequência de cada ângulo revela gaussianas ligeiramente sobrepostas, com uma leve disposição do hexâmero de drosófila possuir ângulos mais distantes de 180° . Como demonstrado na Figura 43A, quanto menor o ângulo, maior é a curvatura (ou dobramento).

As distribuições de ângulos obtidas ao longo de 500 ns de simulação para os dois sistemas apresentam algumas características interessantes. Primeiramente, é interessante observar este caráter flexível do filamento. Enquanto as estruturas cristalográficas apresentam tipicamente uma estrutura de filamento *linear* (mantidas por contatos cristalinos e imposto pela rede), a simulação de DM em solvente explícito permite amostrar uma diversidade de conformações com curvaturas de até 25° em relação à estrutura linear inicial.

As diferenças observadas entre o hexâmero humano e o hexâmero de drosófila possivelmente não são significativas, dada a largura das distribuições de ângulos observadas na Figura 43B. Embora o hexâmero de drosófila apresente uma tendência de se manter mais linear em relação ao hexâmero humano, uma amostragem maior seria necessária para que esta conclusão seja validada. Uma vez que estes movimentos são movimentos de baixa frequência, outras estratégias de simulação precisam ser aplicadas a fim de amostrar mais apropriadamente esta diversidade conformacional, como a dinâmica acelerada (aMD) (159-160) ou mesmo simulações de equilíbrio em modelos simplificados (modelos *coarse-grained*) (161-162) e que permitem que simulações mais longas sejam realizadas empregando um tempo de máquina acessível. As duas estruturas não sugerem nenhum motivo para observar comportamentos significativamente diferentes.

A Análise de Componentes Principais (ACP ou PCA) da simulação de equilíbrio revela detalhes mais específicos deste movimento. (136,163-164) A Figura 44 mostra a projeção da primeira componente (PC1) sobre a estrutura do hexâmero humano. As duas representações mostram a mesma estrutura rotacionada 90 graus em torno do eixo horizontal. O PCA é útil para obter informações simplificadas sobre a dinâmica de um sistema, uma vez que o movimento real do sistema ao longo de uma simulação é representado por uma combinação dos PCs individuais. Na Figura 44 o hexâmero de septinas está demonstrado de duas maneiras

perpendiculares, sendo que na parte superior temos a representação mais clássica de visualização de septinas, a qual aqui iremos definir por “Vista de lado”, e na parte inferior, temos a representação do mesmo hexâmero, porém rotacionado por 90°, o qual definiremos aqui por “Vista de cima”. Em ambas as representações as projeções da PC1 são indicadas pelas setinhas amarelas que dão uma noção da direção principal do movimento.

É possível perceber na figura que a primeira componente apresenta um movimento de baixa frequência no sentido do aumento da curvatura do hexâmero. Este movimento tende a unir as extremidades do hexâmero em um movimento “vertical” (na orientação mostrada no painel superior da Figura 44). É interessante destacar que a escolha do sentido desta direção do movimento se deu sem nenhuma imposição externa ao sistema, ou seja, o sentido é definido pela maior variação das componentes principais. Fica evidente pelas duas representações que a PC1 descreve um movimento de dobramento do hexâmero no plano perpendicular a “Vista de lado” (movimento “*top to bottom*”). As linhas mais longas interligando as estruturas são artefatos da visualização dos resultados pelo programa Chimera, não estando presentes no hexâmero original utilizado para a dinâmica.

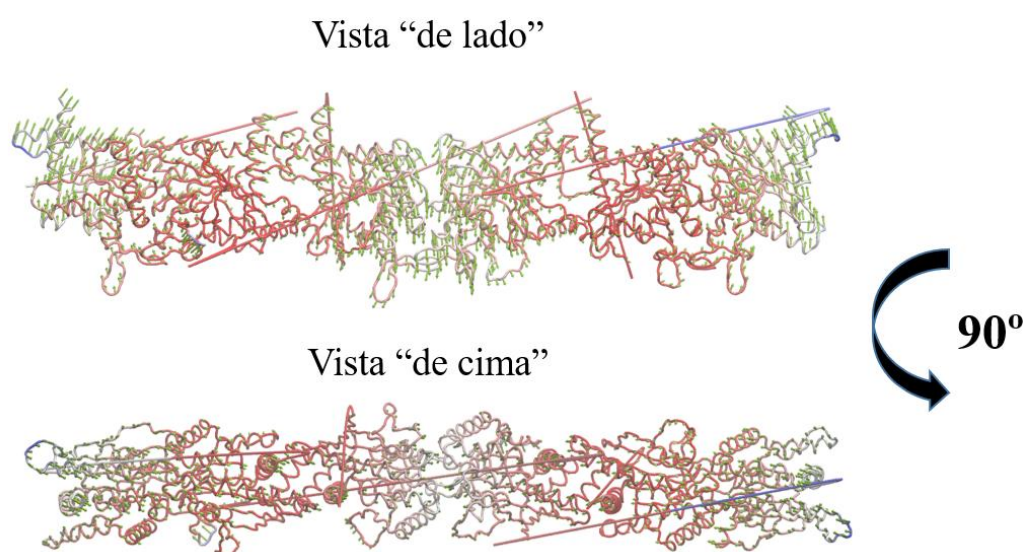


Figura 44 - Projeção da primeira componente (PC1) sobre a estrutura do hexâmero de septinas humanas. As figuras mostram (acima) o hexâmero de septinas humanas e (abaixo) outra visualização rotacionada 90 graus ao longo do eixo horizontal. As projeções da componente 1 estão mostradas como setas sobre os carbonos alfa. As conexões longas são artefatos da representação gerada no programa VMD e não fazem parte do sistema simulado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já a segunda componente (Figura 45) apresenta um movimento similar, ao movimento da primeira componente, mas no sentido “*side-to-side*”. Isto é, usando a o painel superior da

Figura 45 como referência, é como se as extremidades do hexâmero fossem trazidas para perto uma da outra por um movimento “frontal”. Da mesma forma da figura anterior, as linhas mais longas interligando as estruturas na Figura 45 são artefatos da visualização dos resultados pelo programa Chimera, não estando presentes no hexâmero original utilizado para a dinâmica.

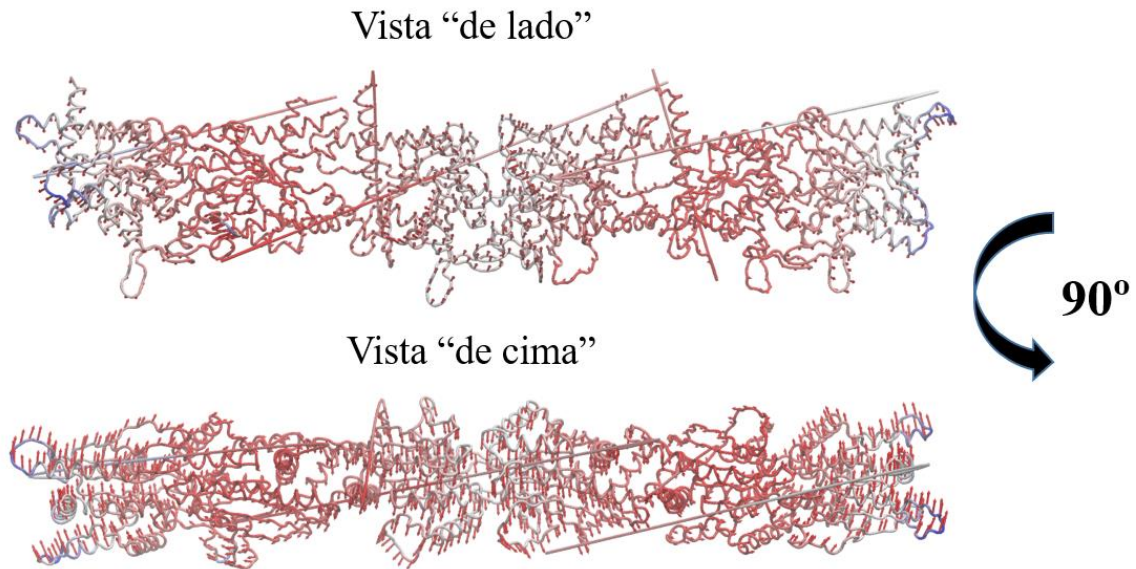


Figura 45 - Projeção da segunda componente (PC2) sobre a estrutura do hexâmero humano. A imagem inferior apresenta a mesma estrutura do painel superior, apenas rotacionada 90 graus ao longo do eixo horizontal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados de simulação obtidos até o momento revelam uma flexibilidade muito interessante para a estrutura hexamérica e consistente com o papel exercido pelas septinas *in vivo*. Os dados revelam ainda que esta curvatura possui dois componentes combinados: um movimento “*top-to-bottom*” e um movimento “*side-to-side*” e que podem facilmente ser percebidos como os dois primeiros componentes na análise de PCA.

Curiosamente, estes movimentos também são percebidos em dados de crio-microscopia eletrônica. (60) Mendonça *et al.*, discutiram este movimento, também aplicaram o método de PCA utilizando como referência a estrutura resolvida do hexâmero humano SEPT.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2 por crio-microscopia com resolução global de ~ 3.6 Å. (60) No seu trabalho Mendonça e colaboradores destacaram que o dobramento principal observado experimentalmente era do tipo “*side-to-side*” e justificaram esta tendência com base na forma da área de contato entre as subunidades centrais (SEPT7) que é aproximadamente oval e favorece o movimento predominante observado. Aqui observamos dois componentes em ambas as direções (“*top-to-bottom*” e “*side-to-side*”). (60)

A observação de Mendonça *et al.* de um sentido preferencial de flexão pode dar uma sugestão de como os filamentos reconhecem e interagem com as membranas. Se o filamento ficasse com seu lado contra a membrana como foi proposto (37,165-166), então seria esperado que o movimento lateral induzisse (ou fosse compatível com) a curvatura da membrana (Figura 46). Isso também é compatível com um papel específico para a região polibásica (PB1) na associação de membrana. PB1 corresponde à região C-terminal da hélice $\alpha 0$ que está enterrada na interface NC. Aqui acrescentamos uma segunda possibilidade que é da flexão “*top-to-bottom*” acompanhar a curvatura da membrana. Esta segunda possibilidade também está compatível com um papel importante desempenhado pela região PB1 desde que a membrana estivesse localizada abaixo do filamento quando visto de lado como na Figura 44 (parte superior).

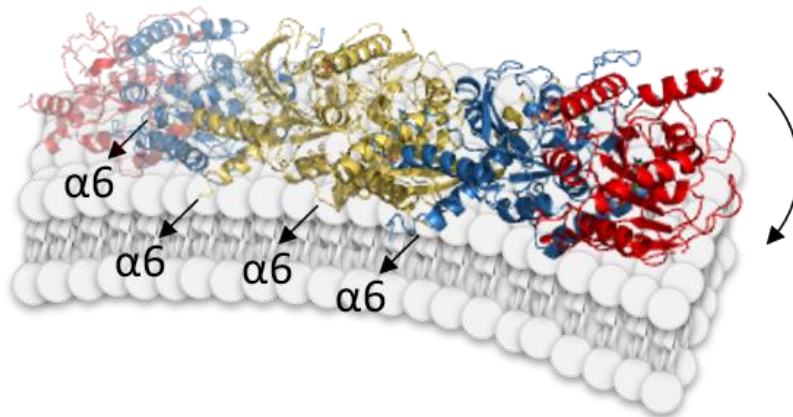


Figura 46 - Esquema de como o hexâmero pode ficar contra uma membrana curva com base na dobra lateral preferida da partícula. É apresentado um hexâmero posicionado com seu lado contra a membrana e as hélices- $\alpha 6$ paralelas ao plano da bicamada lipídica. Nesta orientação, uma das grandes aberturas que levam à cavidade NC ficaria voltada para a membrana.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.* (60)

A curvatura do filamento foi discutida muitas vezes em relação aos papéis fisiológicos das septinas em diferentes organismos. (167) Na ausência de parceiros de ligação do citoesqueleto, o complexo SEPT2.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2 dos mamíferos é capaz de formar anéis fechados autônomos de 400–700 nm de diâmetro. (28) Isso parece ser consistente com observações em septinas humanas, que demonstraram se ligar preferencialmente a esferas revestidas com lipídios de tamanho semelhante. (157) Há também evidências de que os filamentos de septinas podem induzir ativamente a curvatura da membrana, em vez de apenas detectar sua presença. (168) Isso é consistente com seus diversos

papéis nos eventos de remodelação da membrana e pode estar relacionado à maneira pela qual as septinas são capazes de reorientar durante o processo de brotamento à medida que a curvatura da membrana se altera. (169) É também sugerido que, alterando a composição do filamento em termos das septinas particulares envolvidas, pode resultar em preferências distintas para determinadas curvaturas. (169) Desta forma, há ainda uma grande lacuna sobre o conhecimento de como estes filamentos de septinas se curvam para interação com membranas, e desta forma desempenhar seu papel fisiológico, sendo possível que as duas formas de flexão sejam ambos relevantes em situações diferentes.

Como perspectivas deste estudo, ficam a aplicação da análise de PCA para a dinâmica molecular para os complexos de *Drosophila*, bem como o octâmero humano. Muitas perguntas ainda podem ser feitas em relação aos dados já obtidos, como por exemplo: (i) há diferenças no movimento de curvatura observado para a estrutura hexamérica em relação à estrutura octamérica (para septinas humanas)? (ii) A alternância de septinas na estrutura do filamento seguindo a Regra de Kinoshita afeta a dinâmica de curvatura do filamento? (iii) A atividade GTPásica é afetada ou afeta a dinâmica do hexâmero/octâmero? (iv) filamentos mistos contendo tanto hexâmeros quanto octâmeros poderiam ter propriedades diferentes dependentes da estequiometria? Neste sentido, o estudo computacional da dinâmica de curvatura de filamentos de septinas ainda se encontra em andamento na busca de respostas a estas e outras perguntas relativas à relação estrutura-dinâmica-função desta família de proteínas.

6.2 ANÁLISE DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DO HEXÂMERO DE SEPTINAS HUMANAS

A análise inicial das energias do hexâmero humano foi realizada com o programa AmberEnergy++. (137) Este programa calcula as energias potenciais de interação entre duas espécies em uma trajetória de dinâmica molecular como a soma dos termos de *Lennard-Jones* e de *Coulomb* (interações *não-ligadas*). O cálculo de energia de interação nas interfaces do filamento foi tomando em conta as septinas com seus respectivos nucleotídeos (GDP ou GTP) e íons de magnésio.

O sistema hexamérico humano foi composto pelas septinas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 na composição SEPT2.SEPT6.SEPT7.SEPT7.SEPT6.SEPT2 com a presença do *hook-loop*. As energias foram calculadas para as 5 interfaces a partir de uma simulação de equilíbrio de 500

ns de duração, sendo estas as interfaces G entre SEPT2 e SEPT6 e entre as duas cópias de SEPT7, e as interfaces NC entre SEPT6 e SEPT7. A partir das trajetórias da simulação de equilíbrio, as energias foram calculadas empregando os parâmetros usados na própria simulação (campo de força AMBER FF19SB). Em cada caso, as energias são calculadas para as septinas par a par. As medidas da energia de interação para cada um destes pares de interação são demonstradas na Figura 47.

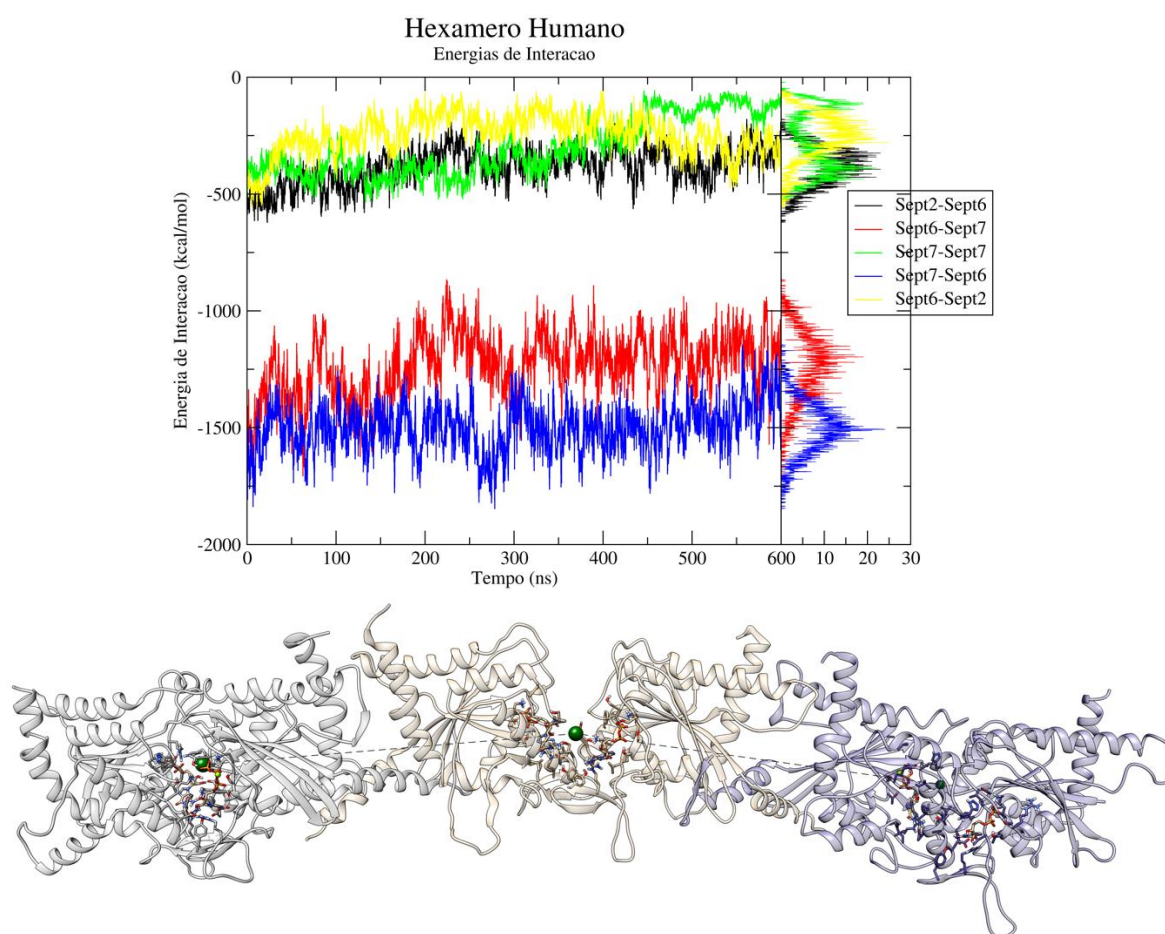


Figura 47 - (Painel superior) Energias potenciais de interação em função do tempo para uma trajetória de dinâmica molecular monitorando cada par de interface do hexâmero de septinas humano composto por SEPT2, SEPT6 e SEPT7. À direita, gráfico de contagem do número de ocorrências das energias. (Painel inferior) *Frame* observado aos 558 ns de simulação mostrando a curvatura do hexâmero. O dímero central, formado por SEPT7-SEPT7 e mostrado em marrom na figura tem uma separação na parte superior (orientação da figura) da interface de reconhecimento para acomodar a curvatura do hexâmero. O dímero em cinza corresponde a SEPT2-SEPT6 e o dímero em azul corresponde ao dímero SEPT6-SEPT2. As esferas em verde mostram os centros de massa dos três dímeros e a linha pontilhada mostra o ângulo formado entre os três centros de massa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 47 apresenta as energias de interação, as quais podem ser agrupadas em dois grupos principais, sendo o primeiro deles referente às interações da interface G (linhas preto, amarelo e verde, e o segundo grupo é referente às interações via interface NC (linhas em azul e vermelho).

A interação SEPT6.SEPT2 via interface G tem uma energia de interação média entre -250 e -385 kcal/mol ao longo da simulação (linhas preto e amarelo). Já a curva em verde mostra a energia de interação na interface G entre SEPT7 e SEPT7, central no hexâmero. Esta interface apresenta uma energia de interação mais dinâmica, com um valor médio de -293 kcal/mol, mas com uma flutuação de grande amplitude e que inclui interações de -500 a -50 kcal/mol em *frames* diferentes da simulação. Esta flutuação maior para a interface SEPT7.SEPT7 ocorre em função do movimento de curvatura do hexâmero, como discutido na seção anterior. Nos últimos 100 ns de simulação, a curvatura tem uma grande flutuação que culmina com uma distorção entre os monômeros de SEPT7 para acomodar a curvatura do hexâmero, como mostra o painel inferior da Figura 47. Curiosamente, dados de criomicroscopia eletrônica também indicam que a maior distorção observada na curvatura do hexâmero ocorre no dímero central, portanto, na interface SEPT7.SEPT7, como também foi observado nas simulações de equilíbrio. (60)

A dinâmica molecular realizada e os dados experimentais de Cryo-EM sugerem que a mobilidade do hexâmero em se curvar deve-se, pelo menos parcialmente, à flexibilidade da interface G de SEPT7.SEPT7. Também é interessante notar que a parte mais fraca desta interface (porção superior) é quebrada, mas a interação é mantida pela porção inferior. Estes dados são coerentes com dados de ASMD mostrados na seção anterior. As implicações das interfaces G para outras estruturas formadas por septinas, como o octâmero ainda precisam ser investigadas e fazem parte de perspectivas futuras para este projeto.

Finalmente, as curvas mostradas em azul e em vermelho na Figura 47 mostram as energias de interação calculadas para as interfaces NC entre as septinas SEPT6.SEPT7 (vermelho) e SEPT7.SEPT6 (azul). É interessante observar que nos dois casos, as energias de interação são significativamente mais negativas (favoráveis) que as energias de interação calculadas para as interfaces G, sugerindo que as interfaces NC contribuem mais energeticamente para a estabilidade do filamento do que as interfaces G. Para a interface entre SEPT6 e SEPT7, a energia de interação média é de -1.239 kcal/mol, enquanto para a interface SEPT7.SEPT6, a energia média é de -1.500 kcal/mol. A distribuição das energias, mostrada no painel da direita da figura acima mostra que as distribuições, embora largas, não se sobrepõem

às distribuições de energias de interação calculadas para as interfaces G, novamente revelando a significância da diferença de energias entre as interfaces G e NC.

Aqui deve-se mencionar que a interface NC poderia ser ainda mais estável uma vez que os *coiled-coils* foram excluídos do modelo usado para a simulação. Os resultados são coerentes com os estudos já feitos e descritos que também indicam que as interfaces NC são mais estáveis se comparado com as interfaces G em baixas concentrações de sal (menor que 150 mM). (59)

Porém, com o aumento do sal é a interface NC que enfraquece mais, se tornando mais fraco que G (59), resultado este também condizente com o que foi verificado nas análises deste estudo, onde as simulações forem realizadas num ambiente químico simulado com uma concentração de 150 mM de NaCl. A fragilidade da interface NC em altas concentrações de sal é coerente com o rompimento de filamentos numa interface deste tipo (entre duas cópias de SEPT2) em condições de elevada força iônica. No presente estudo, por estar exposto na extremidade do hexâmero, esta interface não foi explicitamente estudada no presente trabalho.

6.3 ANÁLISE DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DO HEXÂMERO DE SEPTINAS DE *D. melanogaster*

O hexâmero de septinas presente em *Drosophila melanogaster* e contendo as septinas Sep1.Sep2.Pnut.Pnut.Sep2.Sep1, (com a presença de seu respectivo *hook-loop* em cada subunidade) também foi estudado por meio de simulações de equilíbrio, de maneira similar às empregadas para o hexâmero humano. As análises das energias de interação nas interfaces também foram realizadas de maneira similar com o programa AmberEnergy++, como pode ser verificado na Figura 48.

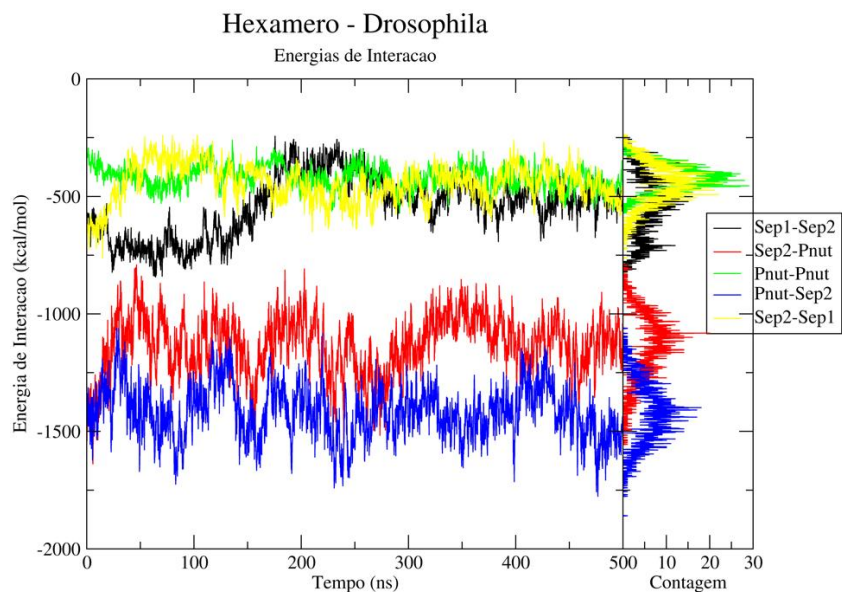


Figura 48 - Energias potenciais de interação em função do tempo para uma trajetória de dinâmica molecular monitorando cada par de interface do hexâmero de septinas de drosófila composto por Sep1, Sep2 e Pnut. À direita, gráfico de contagem do número de ocorrências das energias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se aqui para o hexâmero de drosófila uma diferença de energia significativa entre as interfaces G e NC, como visto também no caso humano, sugerindo que este seja um achado geral em septinas e não exclusivo às proteínas de um determinado organismo. As interfaces G entre Sep1.Sep2, Sep2.Sep1 e Pnut.Pnut apresentam energias de interação médias de -538, -446 e -418 kcal/mol, respectivamente, e a distribuição destas energias mostra gaussianas significativamente sobrepostas, sugerindo energias de interação muito similares para estas interfaces. Neste caso não foi observado uma distribuição bimodal no caso da interface Pnut.Pnut como visto para SEPT7.SEPT7 humano.

Ainda de forma similar aos sistemas humanos, as interfaces NC apresentam energias muito mais favoráveis do que aquelas observadas para as interfaces do tipo G. Para a interface Pnut.Sep2 observa-se uma energia média de -1.423 kcal/mol e de -1.1130 kcal/mol para a interface Sep2.Pnut. De uma forma geral, as simulações com os dois hexâmeros apresentam resultados muito parecidos e coerentes com observações relatadas anteriormente (59), sugerindo um comportamento semelhante.

Capítulo 7

Considerações Finais e

Perspectivas

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A presente tese de doutorado estabelece um protocolo experimental para obtenção das proteínas recombinantes de *D. melanogaster*, seguido de uma caracterização biofísica. As cinco proteínas deste organismo foram purificadas nas construções contendo apenas o domínio GTPase bem como inteiras (NGC), além de combinações de heterodímeros e mutantes.

As propriedades destas proteínas em solução foram determinadas com o auxílio de técnicas biofísicas tais como CD, SAXS, HPLC e SEC-MALS, sendo verificado que as septinas de *Drosophila* se comportam de maneira bem semelhante as septinas de outros organismos em solução. Dentre as principais conclusões, tem-se que as septinas do Grupo III apresentaram atividade catalítica, já as septinas do Grupo II não apresentaram atividade de hidrólise de GTP a GDP.

Posteriormente, realizou-se um estudo sobre caracterização estrutural das septinas, utilizando as técnicas de cristalografia de raios-X e modelagem/dinâmica molecular. Para a execução de parte desta caracterização, recorreu-se à técnica de cristalização dos heterodímeros de *Drosophila melanogaster*, sendo atingido o sucesso para o caso Sep1(G).Sep2(G) (PDB ID: 8DKT) com resolução de 2,38 Å, sendo reportado pela primeira vez uma estrutura para septinas de insetos. Estes dados experimentais suprem uma lacuna de mais de 50 anos em estudos de septinas, em que não havia nenhuma informação estrutural para septinas desta espécie. (100)

O comportamento das septinas de *Drosophila melanogaster* se apresentou muito semelhante ao comportamento observado para septinas humanas. A estrutura deste dímero auxiliou na identificação dos resíduos importantes para a interface do tipo G-G entre septinas do Grupo II e Grupo III. A obtenção destas proteínas por meio da co-expressão conferiu uma maior estabilidade se comparado com o que é encontrado para septinas purificadas individualmente, confirmado pela determinação dos valores de T_M por CD. O comportamento de interação aos nucleotídeos determinado por HPLC também foi coerente com a estrutura cristalográfica e a falta de atividade da Sep2, uma vez que foi verificado uma molécula de GTP ligado à Sep2 e uma de GDP ligado a Sep1.

A outra abordagem para a caracterização estrutural das septinas de drosófila se deu por meio da modelagem computacional. Esta técnica auxiliou para a obtenção de modelos estruturais para as demais comparações de heterodímeros de drosófila, sendo possível realizar uma comparação dos resíduos característicos essenciais para este tipo de interação.

Através da técnica de ASMD, foi possível investigar a importância dos resíduos Glu203 e Arg265 para estabelecer a interface de contato em Pnut.Pnut, e como a presença também de aminoácidos carregados nas posições de Lys173 e Glu58 em humanos aumenta a estabilidade ainda mais. Esta diferença entre os organismos revelou que a interface G de Pnut.Pnut em *Drosophila* requer apenas cerca de 60% da força necessária para separar o dímero SEPT7.SEPT7 em humanos.

Como perspectivas futuras, ficam a realização de novos testes de cristalização para outros pares de septinas de *Drosophila*, realização de experimentos que possam medir constantes de dissociação das subunidades (com uso de técnicas como a Termoforese em Microescala (MST)), e o trabalho com o complexo hexamérico Sep1(G).Sep2(G).Pnut(G).Pnut(G).Sep2(G).Sep1(G) por meio de técnicas microscópicas, a fim de obter informações estruturais do complexo.

Por fim, os estudos realizados durante este trabalho de doutorado fornecem um guia experimental para a obtenção das septinas de *Drosophila melanogaster*, além de uma discussão de seu comportamento em solução, bem como suas principais características estruturais. Ficam como perspectivas futuras para o prosseguimento deste projeto:

- Análise da taxa de consumo de GTP em função do tempo;
- Análise da formação de complexos de maior ordem (filamentos) bem como sua interação com componentes do citoesqueleto;
- Investigação do comportamento de septinas em ambiente celular, tais como: curvatura, ligantes, etc...
- Determinação da estrutura em alta resolução das proteínas Sep4, Sep5 e Pnut.
- Estender os estudos de DM para o octâmero humano.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 66, n. 2, p. 352–9, Jun. 1970.
- 2 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*, v. 69, n. 2, p. 265–276, Dec. 1971. DOI: 10.1016/0014-4827(71)90223-0.
- 3 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *Journal of Cell Biology*, v. 112, n. 4, p. 535–544, 1991.
- 4 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R. AND LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001. DOI: 10.1016/S1369-5274(01)00269-7.
- 5 LONGTINE, M. S. *et al.* The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 8, n. 1, p. 106–119, 1996.
- 6 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. DOI: 10.1038/nrm2407.
- 7 ZERAIK, A. E. *et al.* Septins of platyhelminths: identification, phylogeny, expression and localization among developmental stages of *schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 12, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002602.
- 8 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, v. 77, n. 3, p. 371–379, 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90152-X.
- 9 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biological Chemistry*, v. 72, n. 2, p. 181–204, 2011. DOI: 10.1038/nature13314.A.
- 10 PINTO, A. P. A. *et al.* Filaments and fingers: novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 26, p. 10899–10911, 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.762229.
- 11 ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. *Current Biology*, v. 21, n. 10, p. 384–387, 2011. DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.067.
- 12 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. The pathobiology of the septin gene family. *Journal of Pathology*, v. 204, n. 4, p. 489–505, 2004. DOI: 10.1002/path.1654.

13 KINOSHITA, M.; NODA, M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Structure and Function*, v. 26, n. 6, p. 667–670, 2001. DOI: 10.1247/csf.26.667.

14 SURKA, M. C.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. The Mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, p. 2559–2569, 2003. DOI: 10.1091/mbc.E02.

15 BRIDGES, A. A.; ZHANG, H.; MEHTA, S. B.; OCCHIPINTI, P.; TANI, T.; GLADFELTER, A. S. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 6, p. 2146–51, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1314138111.

16 HU, Q. *et al.* A septin diffusion barrier at the base membrane protein distribution. *Science*, v. 329, n. 2010, p. 436–439, 2012. DOI: 10.1126/science.1191054.

17 IHARA, M. *et al.* Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Developmental Cell*, v. 8, n. 3, p. 343–352, 2005. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.12.005.

18 KIM S. K. *et al.* Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science*, v. 329, n. 5997, p. 1337–1340, 2010. DOI: 10.1126/science.1191184.

19 HUANG, Y. W.; YAN, M.; COLLINS, R. F.; DICICCIO, J. E.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W. S. Mammalian septins are required for phagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 4, p. 1717–1726, 2008. DOI: 10.1091/mbc.E07-07-0641.

20 BEISE N.; TRIMBLE, W.; septins at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 24, p. 4141–4146, 2012. DOI: 10.1242/jcs.087007.

21 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 3, p. 183–194, Mar. 2012. DOI: 10.1038/nrm3284.

22 KALIKIN, L. M.; SIMS, H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, v. 63, n. 2, p. 165–172, 2000. DOI: 10.1006/geno.1999.6077.

23 KINOSHITA *et al.* Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65743-4.

24 IHARA, M. *et al.* Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 26, p. 24095–24102, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M301352200.

25 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n. 6, p. 511–524, 2010. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x.

- 26 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. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)80115-3.
- 27 KINOSHITA, N.; KIMURA, K.; MATSUMOTO, N.; WATANABE, M.; FUKAYA, M.; IDE, C. Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes to Cells*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2004. DOI: 10.1111/j.1356-9597.2004.00696.x.
- 28 MAVRAKIS, M.; TSAI, F. C.; KOENDERINK, G. H. Purification of recombinant human and Drosophila septin hexamers for TIRF assays of actin–septin filament assembly. *Methods in Cell Biology*, v. 136, p. 199–220, 2016. DOI: 10.1016/bs.mcb.2016.03.020.
- 29 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.
- 30 CASTRO, D. K. S. *et al.* A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. *IUCrJ*, v. 7, n. 3, p. 462–479, 2020.
- 31 PAN, F. MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 1–17, 2007. DOI: 10.1186/1471-2148-7-103.
- 32 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H.; PRINGLE, J. R. *The Septins*. Hoboken: John Wiley, 2008. 370 p. DOI: 10.1002/9780470779705.
- 33 GARCIA, W. *et al.* Dissection of a human septin: Definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, v. 45, n. 46, p. 13918–13931, 2006. DOI: 10.1021/bi061549z.
- 34 KINOSHITA, M. *et al.* Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development*, v. 11, n. 12, p. 1535–1547, 1997. DOI: 10.1101/gad.11.12.1535.
- 35 ROBERTSON, C.; CHURCH, S. W.; NAGAR, H. A.; PRICE, J.; HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding. *Journal of Pathology*, v. 203, n. 1, p. 519–527, 2004. DOI: 10.1002/path.1551.
- 36 MATTHIAS, B. V.; GULLBRAND, V. J. C.; SHULEWITZ, M. J.; BAHMANYAR, S.; RAYMOND A. E. C.; PATRICK, B., ALBER, T.; THORNER, J. Protein-Protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, p. 4568–4583, 2004. DOI: 10.1091/mbc.E04.
- 37 BERTIN, A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 24, p. 8274–8279, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0803330105.

38 MARQUES, I. A. *Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas*. 2010. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

39 LEONARDO, D. A. *et al.* Orientational ambiguity in septin coiled coils and its structural basis. *Journal of Molecular Biology*, v. 433, n. 9, p. 166889, 2021.

40 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.

41 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. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.10.032.

42 SERRÃO, V. H. B. *et al.* Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Letters*, v. 585, n. 24, p. 3868–3873, Dec. 2011. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.043.

43 VALADARES, N. F.; PEREIRA, H. D. M.; ARAUJO, A. P. U.; GARRATT, R. C. Septin structure and filament assembly. *Biophysical Reviews*, v. 9, n. 5, p. 481–500, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0320-4.

44 JENNINGS, B. H. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, v. 14, n. 5, p. 190–195, 2011. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70113-4.

45 O'NEILL, R. S.; CLARK, D. V. Partial functional diversification of *drosophila melanogaster* Septin genes Sep2 and Sep5. *Genes, Genomes, Genetics*, v. 6, n. 7, p. 1947–1957, 2016. DOI: 10.1534/g3.116.028886.

46 HARRIS, T. J. C.; PEIFER, M. Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, v. 167, n. 1, p. 135–147, 2004. DOI: 10.1083/jcb.200406024.

47 FARES, H.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Molecular Biology of the Cell*, v. 6, n. 12, p. 1843–1859, 2013. DOI: 10.1091/mbc.6.12.1843.

48 O'NEILL, R. S.; CLARK, D. V. The *Drosophila melanogaster* septin gene Sep2 has a redundant function with the retrogene Sep5 in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. *Genome*, v. 56, n. 12, p. 753–758, 2013. DOI: 10.1139/gen-2013-0210.

49 MUÑOZ-SORIANO, V.; NIETO-ARELLANO, R.; PARICIO, N. Septin 4, the *Drosophila* ortholog of human CDCrel-1, accumulates in Parkin mutant brains and is functionally related to the Nedd4 E3 ubiquitin ligase. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 48, n. 1, p. 136–143, 2012. DOI: 10.1007/s12031-012-9788-3.

50 FIELD, C. M.; AL-AWAR, O.; ROSENBLATT, J.; WONG, M. L.; ALBERTS, B.; MITCHISON, T. J. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *Journal of Cell Biology*, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996. DOI: 10.1083/jcb.133.3.605.

- 51 MURRAY, T. *et al.* Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *Cell*, v. 9, n. 3, p. 690–703, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.047.
- 52 FRAZIER, J. A. *et al.* Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *Journal of Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 737–749, 1998. DOI: 10.1083/jcb.143.3.737.
- 53 JOHN, C. M. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO Journal*, v. 26, n. 14, p. 3296–307, 2007. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601775.
- 54 ADAM, J. C.; PRINGLE, J. R.; PEIFER, M. Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, n. 9, p. 3123–3135, 2013. DOI: 10.1091/mbc.11.9.3123.
- 55 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003. DOI: 10.1093/jb/mvg182.
- 56 BRIDGES, A. A.; GLADFELTER, A. S. Septin form and function at the cell cortex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 28, 2015. DOI: 10.1074/jbc.R114.634444.
- 57 SIRAJUDDIN, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, p. 311–317, 2007. DOI: 10.1038/nature06052.
- 58 BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- 59 MENDONÇA, D. C. *et al.* A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton*, v. 76, n. 9–10, p. 457–466, 2019. DOI: 10.1002/cm.21569.
- 60 MENDONÇA, D. C. *et al.* An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. *Journal of Molecular Biology*, v. 433, n. 15, 2021. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167096.
- 61 ROSA, H. V. D. *et al.* Molecular recognition at septin interfaces: the switches hold the key. *Journal of Molecular Biology*, v. 432, n. 21, p. 5784–5801, 2020.
- 62 CABREJOS, D. A. L. *et al.* Structural determinants of the interaction specificity AT the G and NC interfaces of human septins. *Acta Crystallographica A-foundation and advances*, v. 75, p. E70–E70, 2019. DOI:10.1107/S2053273319094865.
- 63 ZERAIK, A. E. *et al.* 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. DOI: 10.1074/jbc.M113.525352.
- 64 BROGNARA, G.; PEREIRA, H. D. 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, Jul. 2019. DOI: 10.1016/J.JSB.2019.04.015.
- 65 CAVINI, I. A. *et al.* The structural biology of septins and their filaments: an update. *Journal of Structural Biology*, v. 9, p. 3246, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.765085

66 WERNER, B.; YADAV, S. Phosphoregulation of the septin cytoskeleton in neuronal development and disease. *Cytoskeleton*, 2022. DOI: 10.1002/cm.21728.

67 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

68 WALKER, J. M. *The proteomics protocols handbook*. Berlin: Springer, 2005.

69 SAHIN E.; ROBERTS, C. J. Size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering for elucidating protein aggregation mechanisms. *Methods in Molecular Biology*, v. 899, p. 403–423, 2012 . DOI: 10.1007/978-1-61779-921-1_25.

70 VELOURS, C. *et al.* Determination of the absolute molar mass of [Fe-S]-containing proteins using size exclusion chromatography-multi-angle light scattering (SEC-MALS). *Biomolecules*, v. 12, n. 2, p. 270, 2022.

71 WOODY, R. W. Theory of circular dichroism of proteins. *In: FASMAN, G.D. (ed.). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Boston: Springer, 1996. p. 25–67.

72 VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. Determination of protein secondary structure. *In: FASMAN, G.D. (ed.). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Boston: Springer, 1996. p. 69–107.

73 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.

74 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.

75 LEES, B. J. G.; SMITH, R.; WIEN, F.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004. DOI: 10.1016/j.ab.2004.06.002.

76 MOBERLY, J. G.; BERNARDS, M. T.; WAYNANT, K. V. Key features and updates for origin 2018. *Journal of Cheminformatics*, v. 10, n. 1, p. 1–2, 2018.

77 BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, v. 349, n. 6305, p. 117–127, 1991. DOI: 10.1038/349117a0.

78 SECKLER, R.; WU, G. M.; 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. 7655–61, 1990.

79 MACEDO, J. N. A. *Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7*. 2010. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. DOI: 10.1520/E0975-00.

80 OLIVEIRA NETO, M.; FERNANDES, A. F.; PIIADOV, V.; CRAIEVICH, A. F.; ARAÚJO, E. A.; POLIKARPOV, I. SAXSMoW 3.0: new advances in the determination of the molecular weight of proteins in dilute solutions from SAXS intensity data on a relative scale. *Protein Science*, v. 31, n. 1, p. 251–258, 2022. DOI: 10.1002/pro.4227.

81 KIKHNEY, A. Small angle X-ray scattering from biological macromolecules in solution. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 64, p. 37-54, 2013. DOI: 10.1146/annurev-physchem-040412-110132

82 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. *Biological Chemistry*, v. 391, n. 7, p. 737–43, 2010. DOI: 10.1515/BC.2010.093.

83 NEYLON, C. Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature. *European Biophysics Journal*, v. 37, n. 5, p. 531–541, 2008. DOI: 10.1007/s00249-008-0259-2.

84 NIELSEN, S. S. *et al.* BioXTAS RAW, a software program for high-throughput automated small-angle X-ray scattering data reduction and preliminary analysis. *Journal of Applied Crystallography*, v. 42, n. 5, p. 959–964, 2009.

85 HAMMERSLEY, A. P. *FIT2D*: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program. *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, n. 2, p. 646–652, Apr. 2016. DOI: 10.1107/S1600576716000455.

86 FRANKE, D. *et al.* ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *Journal of Applied Crystallography*, v. 50, p. 1212–1225, 2017. DOI: 10.1107/S1600576717007786.

87 KONAREV, P. V.; VOLKOV, V. V.; SOKOLOVA, A. V.; KOCH, M. H. J.; SVERGUN, D. I.; IUCr. *PRIMUS*: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, n. 5, p. 1277–1282, Oct. 2003. DOI: 10.1107/S0021889803012779.

88 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, v. 25, n. 4, p. 495–503, Aug. 1992. DOI: 10.1107/S0021889892001663.

89 SOSSO, G. C. *et al.* Crystal nucleation in liquids: open questions and future challenges in molecular dynamics simulations. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 12, p. 7078–7116, 2016.

90 SLABINSKI, L.; JAROSZEWSKI, L.; RYCHLEWSKI, L.; WILSON, I. A.; LESLEY, S. A.; GODZIK, A. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, v. 23, n. 24, p. 3403–3405, 2007. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm477.

- 91 VONRHEIN, C. *et al.* Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallographica D*, v. 67, n. 4, p. 293–302, 2011.
- 92 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 491–497, 1968.
- 93 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, n. 4, p. 658–674, 2007.
- 94 ADAMS, P. D. *et al.* The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods*, v. 55, n. 1, p. 94–106, 2011.
- 95 AFONINE, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica D*, v. 68, n. 4, p. 352–367, 2012.
- 96 EMSLEY, P.; COWTAN. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica D*, v. 60, n. 12, p. 2126–2132, 2004.
- 97 CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D*, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- 98 DELANO, W. L.; BROMBERG, S. PyMOL user's guide. 2004. Disponível em: <https://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2022.
- 99 WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering Design & Selection*, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.
- 100 FERNANDES, A. F. *et al.* Conservation and divergence of the G-interfaces of *Drosophila melanogaster* septins. *Cytoskeleton*, p. 1–17, 2022. DOI: 10.1002/cm.21740.
- 101 KOLLMAN, P. A.; MERZ JR, K. M.; Computer modeling of the interactions of complex molecules. *Accounts of Chemical Research*, v. 23, n. 8, p. 246–252, 1990.
- 102 AKSIMENTIEV, A. *et al.* Computer modeling in biotechnology. *Nanostructure Design*, p. 181–234, 2008.
- 103 CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal*, v. 5, n. 4, p. 823–826, 1986.
- 104 NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; KRYSTEK JR, S. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*, v. 15, n. 4, p. 808–824, 2006.
- 105 HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*, v. 9, n. 15, p. 659–669, 2004.
- 106 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

107 BEKKER, G.-J.; KAWABATA, T.; KURISU, G. The Biological Structure Model Archive (BSM-Arc): an archive for in silico models and simulations. *Biophysical Reviews*, v. 12, n. 2, p. 371–375, 2020.

108 WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. In: KAUFMANN, M.; KLINGER, C.; SAVELSBERGH, A. (ed.). *Functional genomics*. New York: Humana Press, 2017. p. 39-54. (Methods in molecular biology, v. 1654)

109 KRISSINEL, E. Stock-based detection of protein oligomeric states in jsPISA. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. W1, p. W314–W319, 2015.

110 MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, v. 267, n. 5612, p. 585–590, 1977.

111 KARPLUS, M.; WEAVER, D. L. Protein-folding dynamics. *Nature*, v. 260, n. 5550, p. 404–406, 1976.

112 BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.

113 JORGENSON, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS potential functions for proteins. energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1988.

114 JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1996.

115 VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angewandte Chemie International edition in English*, v. 29, n. 9, p. 992–1023, 1990.

116 PEARLMAN, D. A. *et al.* AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, v. 91, n. 1–3, p. 1–41, 1995.

117 CORNELL, W. D. *et al.* A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, 1995.

118 VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, v. 1, n. 3, p. 173–185, 1988.

119 HUANG, W.; LEIMKUEHLER, B. The adaptive Verlet method. *SIAM Journal on Scientific Computing*, v. 18, n. 1, p. 239–256, 1997.

120 MARTYS, N. S.; MOUNTAIN, R. D. Velocity Verlet algorithm for dissipative-particle-dynamics-based models of suspensions. *Physical Review E*, v. 59, n. 3, p. 3733, 1999.

121 HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

122 ZHUANG, Y.; BUREAU, H. R.; QUIRK, S.; HERNANDEZ, R. Adaptive steered molecular dynamics of biomolecules. *Molecular Simulation*, v. 47, n. 5, p. 408–419, 2021.

123 OZER, G.; QUIRK, S.; HERNANDEZ, R. Adaptive steered molecular dynamics: Validation of the selection criterion and benchmarking energetics in vacuum. *Journal of Chemical Physics*, v. 136, n. 21, p. 06B606, 2012.

124 PARK, S.; KHALILI-ARAGHI, F.; TAJKHORSHID, E.; SCHULTEN, K. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *Journal of Chemical Physics*, v. 119, n. 6, p. 3559–3566, 2003.

125 JURRUS, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018.

126 TIAN, C. *et al.* ff19SB: amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 16, n. 1, p. 528–552, 2019.

127 MEAGHER, K. L.; REDMAN, L. T.; CARLSON, H. A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 24, n. 9, p. 1016–1025, 2003.

128 MACHADO, M. R.; PANTANO, S. Split the charge difference in two! A rule of thumb for adding proper amounts of ions in MD simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 16, n. 3, p. 1367–1372, 2020.

129 HOPKINS, C. W.; LE GRAND, S.; WALKER, R. C.; ROITBERG, A. E. Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 11, n. 4, p. 1864–1874, 2015.

130 SWAILS, J.; HERNANDEZ, C.; MOBLEY, D. L.; NGUYEN, H.; WANG, L.-P.; JANOWSKI, P. *ParmEd*. 2010. Disponível em: <https://github.com/ParmEd/ParmEd>. Acesso em: 30 abr. 2022.

131 DARDEN, T.; PERERA, L.; LI, L.; PEDERSEN, L. New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. *Structure*, v. 7, n. 3, p. R55–R60, 1999.

132 GOTZ, A. W.; WILLIAMSON, M. J.; XU, D.; POOLE, D.; LE GRAND, S.; WALKER, R. C. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. generalized born. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 8, n. 5, p. 1542–1555, 2012.

- 133 SALOMON-FERRER, R.; GOTZ, A. W.; POOLE, D.; LE GRAND, S.; WALKER, R. C. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 9, n. 9, p. 3878–3888, 2013.
- 134 ROE, D. R.; CHEATHAM III, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 2013.
- 135 ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: computational statistics*, v. 2, n. 4, p. 433–459, 2010.
- 136 DAVID, C. C.; JACOBS, D. J. Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods in Molecular Biology*, v. 1084, p. 193–226, 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-658-0_11
- 137 NASCIMENTO, A. S. AmberEnergy++. 2018. Disponível em: <https://github.com/alessandronascimento/amberenergy>. Acesso em: 23 jan. 2022.
- 138 MILLER III, B. R.; MCGEE JR, T. D.; SWAILS, J. M.; HOMEYER, N.; GOHLKE, H.; ROITBERG, A. E. MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012.
- 139 PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- 140 ABBEY, M. *et al.* GTPase domain driven dimerization of SEPT7 is dispensable for the critical role of septins in fibroblast cytokinesis. *Science Reports*, v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep20007.
- 141 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biological Chemistry*, v. 395, n. 2, p. 169–180, 2014. DOI: 10.1515/hsz-2013-0268.
- 142 SIRAJUDDIN, M. *Structural studies on mammalian septins – new insights into filament formation.* 2007. 110 p. PhD Thesis (Doctoral) - Universität Dortmund, Dortmund, 2007.
- 143 FERNANDES, A. F.; SERRÃO, V. H. B.; SCORTECCI, J. F.; THIEMANN, O. H. Seryl-tRNA synthetase specificity for tRNA^{Sec} in bacterial Sec biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1868, n. 8, p. 140438, 2020. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140438.
- 144 MAJDOUB, H.; ROUDESLI, S.; DERATANI, A. Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour. *Polymer International*, v. 50, n. 5, p. 552–560, 2001.
- 145 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. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)01258-7.

- 146 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0902858106.
- 147 MACEDO, J. N. A. *et al.* 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.
- 148 PIIADOV, V.; ARAÚJO, E. A.; OLIVEIRA NETO, M.; CRAIEVICH, A. F.; POLIKARPOV, I. SAXSMoW 2.0: online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale. *Protein Science*, v. 28, n. 2, p. 454–463, 2019. DOI: 10.1002/pro.3528.
- 149 FISCHER, H.; OLIVEIRA NETO, M.; NAPOLITANO, H. B.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. F. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *Journal of Applied Crystallography*, v. 43, n. 1, p. 101–109, 2010. DOI: 10.1107/S0021889809043076.
- 150 BERMAN, P. E. B. H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N. The protein data bank Helen. *Nature Reviews Immunology*, v. 21, n. 5, p. 305–318, 2021. DOI: 10.1038/s41577-020-00473-z.
- 151 CARUGO, O.; PONGOR, S. Protein fold similarity estimated by a probabilistic approach based on C α -C α distance comparison. *Journal of Molecular Biology*, v. 315, n. 4, p. 887–898, 2002.
- 152 MIRDITA, M.; SCHÜTZE, K.; MORIWAKI, Y.; HEO, L.; OVCHINNIKOV, S.; STEINEGGER, M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.
- 153 MUSAFIA, B.; BUCHNER, V.; ARAD, D. Complex salt bridges in proteins: statistical analysis of structure and function. *Journal of Molecular Biology*, v. 254, n. 4, p. 761–770, 1995.
- 154 GVRITISHVILI, A. G.; GRIBENKO, A. V.; MAKHATADZE, G. I. Cooperativity of complex salt bridges. *Protein Science*, v. 17, n. 7, p. 1285–1290, 2008.
- 155 DONALD, J. E.; KULP, D. W.; DEGRADO, W. F. Salt bridges: geometrically specific, designable interactions. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, v. 79, n. 3, p. 898–915, 2011.
- 156 BROGNARA, G. Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9. 2019. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São carlos, 2019.
- 157 BRIDGES, A. A.; JENTZSCH, M. S.; OAKES, P. W.; OCCHIPINTI, P.; GLADFELTER, A. S. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, v. 213, n. 1, p. 23–32, 2016.

- 158 HEDGER, G.; SANSOM, M. S. P. Lipid interaction sites on channels, transporters and receptors: recent insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes*, v. 1858, n. 10, p. 2390–2400, 2016.
- 159 PEREZ, D.; UBERUAGA, B. P.; SHIM, Y.; AMAR, J. G.; VOTER, A. F. Accelerated molecular dynamics methods: introduction and recent developments. *Annual Reports in Computational Chemistry*, v. 5, p. 79–98, 2009.
- 160 XU, L.; HENKELMAN, G. Adaptive kinetic Monte Carlo for first-principles accelerated dynamics. *Journal of Chemical Physics*, v. 129, n. 11, p. 114104, 2008.
- 161 KMIECIK, S.; GRONT, D.; KOLINSKI, M.; WIETESKA, L.; DAWID, A. E.; KOLINSKI, A. Coarse-grained protein models and their applications. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 14, p. 7898–7936, 2016.
- 162 TOZZINI, V. Coarse-grained models for proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 15, n. 2, p. 144–150, 2005.
- 163 MAISURADZE, G. G.; LIWO, A.; SCHERAGA, H. A. Principal component analysis for protein folding dynamics. *Journal of Molecular Biology*, v. 385, n. 1, p. 312–329, 2009. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.018.
- 164 BALSERA, M. A.; WRIGGERS, W.; OONO, Y.; SCHULTEN, K. Principal component analysis and long time protein dynamics. *Journal of Physical Chemistry*, v. 100, n. 7, p. 2567–2572, 1996. DOI: 10.1021/jp9536920.
- 165 BERTIN, A. *et al.* Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *Journal of Molecular Biology*, v. 404, n. 4, p. 711–731, 2010.
- 166 JIAO, F.; CANNON, K. S.; LIN, Y.-C.; GLADFELTER, A. S.; SCHEURING, S. The hierarchical assembly of septins revealed by high-speed AFM. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.
- 167 MCMURRAY, M. A. The long and short of membrane curvature sensing by septins. *Journal of Cell Biology*, v. 218, n. 4, p. 1083, 2019.
- 168 TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHI, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Current Biology*, v. 19, n. 2, p. 140–145, 2009.
- 169 VRABIOIU, A. M.; MITCHISON, T. J. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature*, v. 443, n. 7110, p. 466–469, 2006.

ANEXO A – Sequência de nucleotídeos das proteínas de *Drosophila melanogaster*.

Sequências de nucleotídeos das construções de septinas utilizadas neste trabalho de doutorado.

> Sep1 (NGC) (1096 bp)

CATATGGCCGATACAAAGGGCTTTTCCAGCATCGAGACGCCCGGTATGTGGGCTTCGCCAACCTGCCAACCCAG
GTGCATCGAAAGTCCGTGAAAAAGGGATTCGAGTTCACCCCTAATGGTGGTGGGCGAGTCCGGACTGGGCAAGTCC
ACGCTGGTCAATAGTCTCTTTCTCACCGATCTCTATCCCGAGCGCATTATTCCGGACGCCATAGAGAAAACAAAAG
CAAACCGTAAAGCTGGAGGCATCGACGGTGGAGATCGAGGAGCGCGGCGTCAAGCTAAGATTGACGGTGGTGGAC
ACACCCGGATTCCGGCGATGCCATCGACAACCTCAACAGCTTTGGTGGCATACTCGAGTACATCGATGAGCAATAC
GAGCGCTTCTGCGCGACGAGAGCGGCCGTAACAGACGCAACATTTGTGGACAATCGCATTCACTGCTGTTTCTAC
TTTATATCGCCGTTCCGGTTCATGGCCTAAAACCCCTGGACGTAGAGTTCATGAAGAAGCTGCACTCTAAAGTTAAC
ATTGTGCCCGTGATCGCAAAGGCCGATTGTCTCACAAGAAGGAGATCCTGCGCCTGAAGTGCCGATTATGCAG
GAGATCGAGAGCCACGGCATCAAGATCTACCCACTGCCAGACTGTGATTCGGATGAGGACGAGGACTACAAGGAG
CAGGTGAAGCAACTTAAGGAAGCTGTGCCTTTTCGCCGTCTGCGGCGCCAACACACTGCTCGAGGTCAAGGGCAAG
AAGGTGCGCGGTCTGTATCCATGGGGCGTGGTTCGAGGTAGAGAATCCCGATCACTGCGACTTCATCAAGCTG
CGCACGATGCTCATCACCCACATGCAGGACCTGCAGGAGGTACGCAGGAGGTGCACACGAAAACCTACCGCTCC
GACCGCCTCGCCAAGGGCATCAAGGGCAAGGAGAACGGCGTGAAGGCCGAGCGGGACAGCAGCTCGCAGGTGGTG
TCGAACAGCGTGCTCGGCGAGAAGGACCGCATCCTGCAAGAGAAGGAGGCCGAGCTGCGGCGCATGCAGGAGATG
CTCGCCAGATGCAGGCGCGCATGCAGGCCAGCAGTGAGAAGCTT

> Sep2 (NGC) (1269 bp)

CATATGTCGGTTGAGTGGATTTCGTGCGACAAGAAGGAGGTGCACCTCCGCACCCCTGAAGCAGTCCGGTTCACGTG
GGATTTCGACAGCTTGCTTGACCAACTGGTCAACAAGAGTGTCCAGAATGGATTTCGTCTTCAACGTCATGTGTATA
GGCGAAACCGGACTGGGCAAGTTCGACGCTGATGGACACGCTGTTCAACACCAGCTTCGAGTCCACGCCGAGTCCC
CACACTTTGCCGAGCGTCAAGTTGAAGGCACACACCTACGAGCTGCAGGAGAGCAATGTGCGACTCAAGCTAAC
ATCTGCGACACGGTTGGCTACGGCGATCAGATCAACAAGGACGACTCGTTCAAGGCGGTGGTGGACTACATCGAC
GCACAGTTCGAGAACTATCTGCAGGAGGAGCTGAAGATCAAGCGATCGCTGGTGACATGCCACGACAGCCGCATC
CACATCTGCCTCTACTTCATTTGCCCCACTGGGCACGGCCTCAAATCGCTGGACCTGGTGTGCATGAAGAAGCTG
GACAGCAAGGTGAACATAATTCGGTGATTGCCAAGGCGGATACCATTTCCAAGGTTGAGCTACAGCGCTTCAAG
GCGAAGATCATTAGGAGCTAAACGCCAATGGAGTGCACATCTACCAGTTCCCCACCGACGATGAGACGGTGGCC
GAGACCAACACCAGCATGAACTCGCACATTCCTTCGCCGTGGTGGGCGAGCAGGAGTTTATTAAGGTGGGCAAC
AAGTTCATCCGCGCTCGCCAGTACCCCTGGGGCACGGTGCAGGTGGAGAACGAGACGCACCTGCGACTTTGTGAAG
CTGCGCGAGATGCTCATTCGCACCAACATGGAGGATATGCGCGAAAAGACACACACGCGCCACTACGAGCTGTAT
CGCCAGAAGAGGCTGGAGCAAAATGGGCTTCAGCGATGTGGACAGCGACAACAAGCCCATCTCGTTCCAGCAGACG
TTCGAGGCAAAAGCGCTCCAACCACTTGGCCGAGCTGCAGTCCAAGGAGGAGGAGTTTCGTGAGATGTTTCGTGAG
CGCGTTAAGGAGAAGGAGGCCGAGCTGAAGGAGAGCGAGAAGGACCTGCACGCCAAGTTCGAGAAGCTAAAGCGG
GATCACGCCGAGGAGAAGCGCAAGCTGGAAGAGTTCGCGCAAGGCGCTCGAGGAGGACTACCTCGACTTCCAGCGG
CGCAAGCAGCAGTTGGCCACCGCCACCACACGCTCACCCCTCGGCAAGAGCAAGAAGAAGTAGAAGCTT

> Sep4 (NGC) (1137 bp)

CATATGTCTAAAACGCCGTCGTTTCGACAAGGATCGCGATTACATAGGCTTTGCCACGCTTCCAGAGCAAGTGCAC
CGGAAGTCCGTTGAAGCGGGGCTTCGAGTTCACCCCTCATGGTGGTTCGGCGAGTCCGGACTGGGCAAGTCCACGCTG
ATCAACAGTCTCTTTCTGGGCGATCTCTACAAGAACCAGGAGATGCCCAATGTGGAGGAGCGCATCGAGAAGACG
ACGAAGGTGGAGAAGAAGACGATGGACATCGAGGAGCGGGGCGTCCGGCTCCGGCTGACGGTGGTGGACACCCCG
GGATTCCGGGATGCCATCAACTGTGAGGACAGCTGGCGCGTCTGCACCCAGTACATCGACGAGCAGTTCCGCCAG
TACTTCACCGACGAGAGCGGCCGTAATCGCCGCAACATCCAGGACAATCGGGTGCACCTGCTGCCTCTACTTCGTG
CCGCCATGGGGCCACAGCCTGCGACAGATGGACCTCGATTTGATACGGCGGCTGCACCGCAAGGTGAACATCGTG
CTGGTGATCGGCAAGGCCGATTGCCTCAACAAGCAGGAGGTGCGCAAGCTGAAGGAGCGCATCCTGCAGGACCTG
GAGGACAACCACATCCAGCTGTATCAGTTCGCCGAATGCGACTCCGACGAGGACGACGACTTCAAGCAGCAGGAC
CGCGAAGTGAAGGCCTCCATTCCGTTCCGCCGTCTGCGCAGCAACACCATTCTGGAGGTGGCCGGCAAGAAGGTC
CGAGGGCGCCAGTATCCGTGGGGCGTGGTAAACGTGGAGGATCCGGAGCACAGCGACTTCATCAAGCTGCGCACC
TTCTTGATATCCACGCACATGCAGGACCTCAAGGACACCACGCAGGACGTGCACCTACGAGAATTCGGGGCGCAG
TGCATCTCGCAGATTCGCGACACGCGCTGCGTGAGCGCGGCAAGTTGAAGCGGGACTCGATTAGCTCGACCAAT
GGATTTCGACGCGCCATCTCGGAGACGGACAGGCTGCTCCTGCAAAAGGACGAGGAGATAAGGAGGATGCAGGAC
ATGCTCACCCAGATGCAGGAGAAGCTCAAGCAGACCCATCTCATGGAGATGAAGAAGAATGACAGCGTGATCGAC
GTCTAGAAGCTT

> Sep5 (NGC) (1278 bp)

CATATGGTTTCATTTAGTGACTGAAAAGAAGACGCAGGAGGTGGCAACCAAAGTCCCCAGGCTCCTTCAACTCGGC
 GGCCACGTGGGGTTCGACACCCTACCGGACCAGCTGGTCAACAAGAGCGTCCAGAATGGCTTTAGCTTCAATATC
 CTATGCATCGGCGAGACCGCTCTCGGGAAATCCACTCTCATGGACACACTGTTCAATACCAGTTTTGGATCTACA
 CCGAGCCCGCACAACTGCCAATGTGAAGCTGAAGGCAAATACATACGAGCTGCAGGAGAGCAACGTCCGCCTG
 AAGCTGACCGTCTGTGACACGATCGGATACGGAGATCAGGTTAATAAAGCGGACAGCTACAAGGCTTTGGTGGAG
 TACGTGGACAGCCAGTTTGAAGCGTATTTGCAGGAAGAGCTCAAGATCCAGCGAGCGATGGCCAGTGCTCATGAT
 GGACGCGTTCACGCTGCCTGTACTTTCATCTGTCCCACGGGCCATGGTCTGAAAGCTATGGATTTGGTGTGCATG
 AAGCAGCTTGACACTAGGGTGAACATCATTTCCCGTGATCGCGAAGGCCGACACCATCTCCAAGTCGGAGCTGTGCG
 GGGTTTAAAGGAACGCATAATGGACGAACACGGCGGAACAATGTGAGCATATAACCAGTTTTCCCATGGACGACGAA
 ACCGTGTCCGAAACAAATGCTGCGATGAACGGCCATCTACCCTTTGCCGTTGTTGGCAGTACGGAGTTTTGTAAAG
 GTGGCCGGAAAGCAGGTTCTGTCGCCCAATATCCATGGGGAGCGGTGCACATAGAAAACGAGGCGCACTGCGAC
 TTTGTGAAGCTGCGCGAGATGCTCATTGCGACTAACATGGAGGATCTGCGCGAAGACTCACACAGCCACTAT
 GAGCTCTTCCGCCAGCGCGCCTACAACAAATGGGCTTTGTGGACGTGGACAGCAACAACCAGCCGGTCTCCTTC
 CAACAGACCTTCGAGTGAAGCGATCCGACCATCTGGCTTGCCCTACAGGCCAAGGAGGAGGAAGTGCGCCAAATG
 TTCGTTTCAGCGGGTCAAGCAGAAGGAGAAGCAGCTGAAGGACAACGAGAAGGAATTGCATACTAAGTTCGACCGG
 CTAACCGGGAGCATTTGGAGGAAAAGGCCCAACTGGAAGAGGCCCGTTCGGCAGCTGGAAGAGGATTGCCAGGAG
 CTACAGCGTTCGTAGGCTCCAGATGGCCAATGGTTCGCACACTCTCACCTTGGGCAGGGGCAAGAAAAAGTAGAAG
 CTT

> Pnut (NGC) (1629 bp)

CATATGAATAGTCTCGCTCGAACGCGGTTAATGGCGGCAGCGGGCGGCCATCTCCGCTCTGCCCAGCACTCTG
 GCCAACTGGCTCTGCGCGACAAGCAGCAGGCTGCGTCCGGCATCGGCGTCTCTGCCACGAACGGCAGCAGCGGC
 AGCGAGTCCCTTGGTGGGCGTCCGGTGGACGACCGCCCAATCAGCCGCCAGTGTGCCAGTGGCCGCCAGTGGCAAG
 CTGGACACCAGCGGCGGAGGCGCCTCCAACGGCGACTCGAACAACTGACCCACGATCTGCAGGAGAAGGAGCAC
 CAGCAGGCGCAGAAGCCACAGAAGCCACCGTCCCGGTGCGCCAGAAGCCCATGGAGATCGCCGGCTATGTGGGC
 TTCGCCAACCTGCCCAATCAGGTCTATCGCAAGGCCGTCAAGCGGGGATTTCGAGTTCACTCTGATGGTGGTGGGC
 GCCAGTGGGCTGGGCAAGTCGACGCTGATCAACTCCATGTTCTGTCCGACATCTACAACGCGGAACAGTATCCG
 GGCCCTCGCTCGCAGAAAAGACCCGTGGCGTGGAGGCCAACAAAGTAATGCTCAAGGAGAACCGGCTCAAT
 CTGACACTCACGGTGGTGGACACACCCGGATTCCGGTGTGCGGTTGACAACAGCAACTGCTGGGTGCCCATATG
 GAGTACGTGGATAGCAAGTACGAGGAGTACCTGACAGCCGAGTTCGCGGGTGTACCGAAAAACCATTTTCGGACAGC
 CGGGTGCCTGCTGCCTCTACTTTCATAGCGCCATCGGGACACGGACTCCTGCCGCTGGACATTGCCTGCATGCAG
 AGCCTGTCCGACAAGGTAAATCTGGTGGCGGTGATCGCCAAGGCGGACACCATGACGCCCCGACGAGGTGCATCTA
 TTTAAGAAGCAGATCCTTAACGAGATCGCCAGCACAAGATCAAGATCTACGACTTCCCCGCCACGCTGGAGGAT
 GCGGCCGAGGAGGCCAAAACCACGCAGAATTTGCGCAGCCGAGTGCATTTCGCGGTGGTGGGTGCCAACACCATC
 ATCGAGCAGGACGGAAGAAGGTCCGGGGTAGGCGTTATCCCTGGGGCCTGGTGGAGGTGGAGAACCCTGACGCAT
 TGCGACTTTATAGCGCTGCGCAACATGGTCATACGCACGCACCTTCAGGACCTCAAGGACGTGACGAACAACGTC
 CACTACGAGAACTACCGCTGCCGGAAGCTATCCGAGCTGGGATTGGTGGACGGCAAGGCCAGGCTGTCCAACAAG
 AACCCACTCACCCAGATGGAGGAGGAAAAGCGGGAGCACGAGCAGAAGATGAAGAAGATGGAGGCCGAGATGGAG
 CAGGTGTTTGACATGAAGGTCAAGGAGAAGATGCAGAAGCTCAGGGACTCGGAGCTGGAGCTGGCGCGGCCAC
 GAGGAGCGCAAGAAGGCGCTGGAGCTGCAGATCCGGGAGCTGGAGGAGAAGAGACGCGAGTTCGAGCGCGAGAAG
 AAGGAGTGGGAGGATGTCAACCACGTGACGCTCGAGGAGCTCAAGCGACGCAGCCTGGGGGCCAACAGCAGCACG
 GACAAATGTTGGATGGCAAGAAGGAGAAGAAAAAGAAAGGTCTGTTCTAAAAGCTT

> Sep1 (G) (831 bp)

CATATGGGATTCGAGTTCACCCTAATGGTGGTGGGCGAGTCCGGACTGGGCAAGTCCACGCTGGTCAATAGTCTC
 TTTCTACCGATCTCTATCCCGAGCGCATTATTTCCGGACGCCATAGAGAAACAAAAGCAAACCGTAAAGCTGGAG
 GCATCGACGGTGGAGATCGAGGAGCGCGCGTCAAGCTAAGATTGACGGTGGTGGACACACCCGGATTTCGGCGAT
 GCCATCGACAACCTCAACAGCTTTGGTGCCATACTCGAGTACATCGATGAGCAATACGAGCGCTTCTGCGCGAC
 GAGAGCGGCTGAACAGACGCAACATTGTGGACAATCGCATTCACTGCTGTTTCTACTTTATATCGCCGTTCCGGT
 CATGGCCAAAACCCCTGGACGTAGAGTTCATGAAGAAGCTGCACCTAAAGTTAACATTGTGCCCGTGATCGCA
 AAGGCCGATTGTCTCACAAAGAAGGAGATCCTGCGCCTGAAGTGCCGATTATGCAGGAGATCGAGAGCCACGGC
 ATCAAGATCTACCCACTGCCAGACTGTGATTCCGATGAGGACGAGGACTACAAGGAGCAGGTGAAGCAACTTAAG
 GAAGCTGTGCTTTTCGCCGCTGTCGGCGCCAACACACTGCTCGAGGTCAAGGGCAAGAAGGTGCGCGGTGCTCTG
 TATCCATGGGGCGTGGTTCGAGGTAGAGAATCCCGATCACTGCGACTTTCATCAAGCTGCGCACGATGCTCATCACC
 CACATGCAGGACCTGCAGGAGGTACGCAGGAGGTGCACCTACGAAAACCTACCGCTCCGACCGCCTCGCCAAGGGC
 AAGCTT

> Sep2 (G) (816 bp)

CATATGGGATTCGCTTTCACCGTTCATGTGTATAGGCGAAACCCGACTGGGCAAGTTCGACGCTGATGGACACGCTG
 TTCAACACCAGCTTCGAGTCCACGCCGAGTCCCCACACTTTGCCGAGCGTCAAGTTGAAGGCACACACCTACGAG
 CTGCAGGAGAGCAATGTGCGACTCAAGCTAACCATCTGCGACACGGTTGGCTACGGCGATCAGATCAACAAGGAC

GACTCGTTCAAGGCGGTGGTGGACTACATCGACGCACAGTTCGAGAACTATCTGCAGGAGGAGCTGAAGATCAAG
 CGATCGCTGGTGACATGCCACGACAGCCGCATCCACATCTGCCTCTACTTCATTTGCCCCACTGGGCACGGCCTC
 AAATCGCTGGACCTGGTGTGCATGAAGAAGCTGGACAGCAAGGTGAACATAATTCCGGTGATTGCCAAGGCGGAT
 ACCATTTCCAAGTTGAGCTACAGCGCTTCAAGGCGAAGATCATTCAGGAGCTAAACGCCAATGGAGTGCACATC
 TACCAGTTCCCCACCGACGATGAGACGGTGGCCGAGACCAACACCAGCATGAACCTCGCACATTCCTTCGCCGTG
 GTGGGCAGCACGGAGTTTATTAAGGTGGGCAACAAGCTCATCCGCGCTCGCCAGTACCCCTGGGGCACGGTGCAG
 GTGGAGAACGAGACGCACTGCGACTTTGTGAAGCTGCGCGAGATGCTCATTCGCACCAACATGGAGGATATGCGC
 GAAAAGACACACACGCGCCACTACGAGCTGTATCGCCAGAAGAGGCTGGAGCAAATGGGCAAGCTT

> Sep4 (G) (837 bp)

CATATGGGCTTCGAGTTCACCCTCATGGTGGTTCGGCGAGTCCGGACTGGGCAAGTCCACGCTGATCAACAGTCTC
 TTTCTGGGCGATCTCTACAAGAACCAGGAGATGCCAATGTGGAGGAGCGCATCGAGAAGACGACGAAGGTGGAG
 AAGAAGACGATGGACATCGAGGAGCGGGGCGTCCGGCTCCGGCTGACGGTGGTGGACACCCCGGGATTCCGGGGAT
 GCCATCAACTGTGAGGACAGCTGGCGCGTCTGCACCCAGTACATCGACGAGCAGTTCCGCCAGTACTTCACCGAC
 GAGAGCGGCCTGAATCGCCGCAACATCCAGGACAATCGGGTGCCTGCTGCCTCTACTTCGTGCCGCCATGGGGC
 CACAGCCTGCGACAGATGGACCTCGATTTGATACGGCGGCTGCACCGCAAGGTGAACATCGTGTGGTGCATCGGC
 AAGGCCGATTGCCTCAACAAGCAGGAGGTGCGCAAGCTGAAGGAGCGCATCCTGCAGGACCTGGAGGACAACCAC
 ATCCAGCTGTATCAGTTCCCGAATGCGACTCCGACGAGGACGACGACTTCAAGCAGCAGGACCGCGAATGAAG
 GCCTCCATTCGTTTCGCCGTGTCGGCAGCAACACCATTCTGGAGGTGGCCGGCAAGAAGTCCGAGGGCGCCAG
 TATCCGTGGGGCGTGGTAAACGTGGAGGATCCGGAGCACAGCGACTTCATCAAGCTGCGCACCTTCTTGATATCC
 ACGCACATGCAGGACCTCAAGGACACCACGACGAGGAGTGCCTACGAGAATTCGGGGCGCAGTGCATCTCGCAG
 ATTTCAAGCTT

> Sep5 (G) (816 bp)

CATATGGGCTTTAGCTTCAATATCCTATGCATCGGCGAGACCGCTCTCGGGAAATCCACTCTCATGGACACACTG
 TTCAATACCAGTTTTGGATCTACACCGAGCCCGCACAACTGCCAATGTGAAGCTGAAGGCAAATACATACGAG
 CTGCAGGAGAGCAACGTCCGCTGAAGCTGACCGTCTGTGACACGATCGGATACGGAGATCAGGTTAATAAAGCG
 GACAGCTACAAGGCTTTGGTGGAGTACGTGGACAGCCAGTTTGAAGCGTATTTGCAGGAAGAGCTCAAGATCCAG
 CGAGCGATGGCCAGTCTCATGATGGACGCGTTCACGCCTGCCCTGACTTTCATCTGCCACGGCCATGGTCTG
 AAAGCTATGGATTTGGTGTGCATGAAGCAGCTTGACACTAGGGTGAACATCATTTCCCGTGATCGCGAAGGCCGAC
 ACCATCTCCAAGTCGGAGCTGTCCGGGTTTAAGGAACGCATAATGGACGAACTACGGCGGAACAATGTGAGCATA
 TACCAGTTTCCCATGGACGACGAAACCGTGTCCGAAACAAATGCTGCGATGAACGGCCATCTACCCTTTGCCGTT
 GTTGGCAGTACGGAGTTTGTAAAGGTGGCCGGAAAGCAGGTTTCGTGCCCGCCAATATCCATGGGGAGCGGTGCAC
 ATAGAAAACGAGGCGCACTGCGACTTTGTGAAGCTGCGCGAGATGCTCATTCGCACATAACATGGAGGATCTGCGC
 GAACAGACTCACACACGCCACTATGAGCTCTTCCGCCAGCGGCGCCTACAACAATGGGCAAGCTT

> Pnut (G) (834 bp)

CATATGGGATTCGAGTTCACTCTGATGGTGGTGGGCGCCAGTGGGCTGGGCAAGTCGACGCTGATCAACTCCATG
 TTCTGTTCGGACATCTACAACGCGGAACAGTATCCGGGCCCTCGCTGCGCAAAAAGAAGACCGTGGCCGTGGAG
 GCCACCAAAGTAATGCTCAAGGAGAACGGCGTCAATCTGACACTCACGGTGGTGGACACACCCGGATTCCGGTAT
 GCCGTTGACAACAGCAACTGCTGGGTGCCCATACTGGAGTACGTGGATAGCAAGTACGAGGAGTACCTGACAGCC
 GAGTCGCGGGTGTACCGAAAAACCATTTCCGGACAGCCGGGTGCACTGCTGCCTCTACTTCATAGCGCCATCGGGA
 CACGGACTCCTGCCGTGGACATTCCTGTCATGCAGAGCCTGTCCGACAAGGTAATCTGGTGGCCGTGATCGCC
 AAGGCCGACACCATGACGCCCGACGAGGTGCATCTATTTAAGAAGCAGATCCTTAACGAGATCGCCCAGCACAAG
 ATCAAGATCTACGACTTCCCGCCACGCTGGAGGATGCGGCCGAGGAGGCCAAAACCACGCAGAATTTGCGCAGC
 CGAGTGCCATTCGCGGTGGTGGGTGCCAACACCATCATCGAGCAGGACGGAAAGAAGTCCGGGGTAGGCCTTAT
 CCCTGGGGCCTGGTGGAGGTGGAGAACCCTGACGCATTTGCGACTTTATAGCGCTGCGCAACATGGTGCATACGCACG
 CACCTTCAGGACCTCAAGGACGTGACGAACAACGTTCCACTACGAGAATACCCTGCCGGAAGCTATCCGAGCTG
 GGAAAGCTT

> Vetor de clonagem: pET-28a(+), sítio de restrição: NdeI/HindIII

ANEXO B – Exemplo de script utilizado para a modelagem utilizando o MODELLER.

> Exemplo de alinhamento das sequências. Aqui o modelo gerado a partir da estrutura cristalográfica de SEPT2(G).SEPT8(G).SEPT7(G) (hexamer267human.B99990097.BL00940001) de humanos foi utilizado como molde para a realização da modelagem dos dímeros de Sep1(G).Sep2(G).Pnut(G) de *D. melanogaster* (dm127hexamer).

```
>P1;hexamer267human.B99990097.BL00940001
structureX:hexamer267human.B99990097.BL00940001:1:A:1701:F:::
FANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLNSLFLTDLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIE
ERGVKLRLLTVVDTPGYGDAINCRDCFKTIISYIDEQFERYLHDESGLNRRRIIDNRVHCCFFYFISPFHG
LKPLDVAFMKAIHNKVNIVPIAKADTLTLKERERLKKRILDEIEEHNKIYHLPDAESDEDEDFKEQTR
LLKASIPFSVVGSNQLIEAKGKKVGRGLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRMTLITHMQDLQEVTDLHYENF
RSERLKR/PDQLVNKSVSQGFNFILCVGETGLGKSTLMDTLFNTKFEFEPATHTQPGVQLQSNQTYDLQE
SNVRLKLTIVSTVGFQDQINKEDSYKPIVEFIDAQFEAYLQEELKIRRVLHTYHDSRIHVCLYFIAPTGH
SLKSLDLVTMCKLDSKVNIIPIIAKADAIKSSELTKFKIKITSELVSNVQIYQFPPTDDESVAEINGTMN
AHLPAVIGSTEELKIGNKMMRARQYPWGTVOVNEAHCDFVKLREMLIRVNEMEDLREQTHTRHYELYRR
CKLEEMGFQ/NQVYRKSVKRGFEFTLMVVGESGLGKSTLNSLFLTDLYSPE-YPGPSHRIKKTVOVEQS
KVLIEKGGVQLLLTIVDTPGFGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDNRVQCCLYFIA
PSGHGLKPLDIEFMKRLHEKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKQIMKEIQEHKIKIYEFPET--DDEEEN
KLVKIKDRPLAVVGSNTIIEVNGKRVGRQYPWGVAEVENGEHCDFTLRNMLIRTHMQDLKDVNTNV
HYENYRSRKLAA/NQVYRKSVKRGFEFTLMVVGESGLGKSTLNSLFLTDLYSPE-YPGPSHRIKKTVOV
EQSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPGFGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDNRVQCCLY
FIAPSGHGLKPLDIEFMKRLHEKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKQIMKEIQEHKIKIYEFPET--DDE
EENKLVKIKDRPLAVVGSNTIIEVNGKRVGRQYPWGVAEVENGEHCDFTLRNMLIRTHMQDLKDVNTNV
NNVHYENYRSRKLAA/PDQLVNKSVSQGFNFILCVGETGLGKSTLMDTLFNTKFEFEPATHTQPGVQLQ
SNQTYDLQESNVRLKLTIVSTVGFQDQINKEDSYKPIVEFIDAQFEAYLQEELKIRRVLHTYHDSRIHVCL
YFIAPTGHSLKSLDLVTMCKLDSKVNIIPIIAKADAIKSSELTKFKIKITSELVSNVQIYQFPPTDESVA
EINGTMNAHLPAVIGSTEELKIGNKMMRARQYPWGTVOVNEAHCDFVKLREMLIRVNEMEDLREQTHTR
RHYELYRRCKLEEMGFQ/FANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLNSLFLTDLYPERVIPGA
AEKIERTVQIEASTVEIEERGVKLRLLTVVDTPGYGDAINCRDCFKTIISYIDEQFERYLHDESGLNRRRI
IDNRVHCCFFYFISPFHGHLKPLDVAFMKAIHNKVNIVPIAKADTLTLKERERLKKRILDEIEEHNKIY
HLPDAESDEDEDFKEQTRLLKASIPFSVVGSNQLIEAKGKKVGRGLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRMTL
ITHMQDLQEVTDLHYENFRSERLKR*
```

```
>P1;dm127hexamer
sequence:dm127hexamer:1:A:1701:F:::
FANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLVNSLFLTDLYPERIIPDAIEKQKQTVKLEASTVEIE
ERGVKLRLLTVVDTPGFGDAIDNSNSFGAILEYIDEQYERFLRDESGLNRRNIVDNRIHCCFFYFISPFHG
LKPLDVEFMKLLHSKVNIVPIAKADCLTKKEILRLKCRIMQEIESHGKIKIYPLPDCDSDEDEDYKEQVK
QLKEAVPFAVCGANTLLEVKGKKVGRGLYPWGVVEVENPDHCDFIKLRTMLIITHMQDLQEVTVQEVHYENY
RSDRLAK/PDQLVNKSVQNGFVFNVMCIGETGLGKSTLMDTLFNTSFESTPSPHTLPSVKLKAHTYELQE
SNVRLKLTICDVTGVDQINKDSSFKAVVYDIDAQFENYLQEELKIKRSLVTCHDSRIHICLYFICPTGH
GLKSLDLVCMCKLDSKVNIIPIIAKADTISKVELQRFKAKIIQELNANGVHIYQFPPTDDETV AETNTSMN
SHIPFAVVGSTEFIKVGNKLIARQYPWGTVOVENETHCDFVKLREMLIRTNMEDMREKTHTRHYELYRQ
KRLEQMGFS/NQVYRKAVKRGFEFTLMVVGASGLGKSTLINSMFLSDIYNAEQYPGPSLRKKTVAVEAT
KVMLKENGVNLTIVVDTPGFGDAVDNSNCWVPILEYVDSKYEEYLTAESRVYRKTISDSRVHCCLYFIA
PSGHGLPLDIAQMQLSCKVNIVPIAKADTMTPEVHLFKQILNEIAQHKIKIYDFPATLEDAEAEA
EAKTTQNLRSRVPFAVVGANTIIEQDGKVKVGRRYPWGLVEVENLTHCDFIALRNMVIRTHLQDLKDVNTNV
HYENYRCKLSE/NQVYRKAVKRGFEFTLMVVGASGLGKSTLINSMFLSDIYNAEQYPGPSLRKKTVAVE
EATKVMLKENGVNLTIVVDTPGFGDAVDNSNCWVPILEYVDSKYEEYLTAESRVYRKTISDSRVHCCLY
FIAPSGHGLPLDIAQMQLSCKVNIVPIAKADTMTPEVHLFKQILNEIAQHKIKIYDFPATLEDAEAEA
EAKTTQNLRSRVPFAVVGANTIIEQDGKVKVGRRYPWGLVEVENLTHCDFIALRNMVIRTHLQDLKDVNTNV
NNVHYENYRCKLSE/PDQLVNKSVQNGFVFNVMCIGETGLGKSTLMDTLFNTSFESTPSPHTLPSVKL
AHTYELQESNVRLKLTICDVTGVDQINKDSSFKAVVYDIDAQFENYLQEELKIKRSLVTCHDSRIHICL
YFICPTGHGLKSLDLVCMCKLDSKVNIIPIIAKADTISKVELQRFKAKIIQELNANGVHIYQFPPTDDETV
AETNTSMNSHIPFAVVGSTEFIKVGNKLIARQYPWGTVOVENETHCDFVKLREMLIRTNMEDMREKTHTR
RHYELYRQKRLQMGFS/FANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLNSLFLTDLYPERVIPGA
AEKIERTVQIEASTVEIEERGVKLRLLTVVDTPGYGDAINCRDCFKTIISYIDEQFERYLHDESGLNRRRI
IDNRVHCCFFYFISPFHGHLKPLDVAFMKAIHNKVNIVPIAKADTLTLKERERLKKRILDEIEEHNKIY
HLPDAESDEDEDFKEQTRLLKASIPFSVVGSNQLIEAKGKKVGRGLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRMTL
ITHMQDLQEVTDLHYENFRSERLKR*
```

> Exemplo de script escrito em Python para realizar a modelagem dos hexâmeros.

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *

env = environ()

env.schedule_scale = physical.values(default=1.0, soft_sphere=0.7)
env.io.hetatm = True

a = automodel(env, alnfile='hexamer267human.B99990097.BL00940001.pir',
              knowns=('hexamer267human.B99990097.BL00940001'), sequence='dm127hexamer',
              assess_methods=(assess.DOPE, assess.GA341))
a.starting_model = 1
a.ending_model = 100
a.deviation = 4.0

# Amount of randomization between models
a.generate_method = generate.transfer_xyz
a.rand_method = randomize.xyz

# Very thorough VTFM schedule
a.library_schedule = autosched.slow
a.max_var_iterations = 300

# Thorough MD optimization:
a.md_level = refine.very_slow

a.final_malign3d = True

a.make()

# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = filter(lambda x: x['failure'] is None, a.outputs)

# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))

# Get top model
m = ok_models[0]
print "Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key])
```

Artigo 1

Amino Acids (2018) 50:1145–1167
 https://doi.org/10.1007/s00726-018-2595-6

INVITED REVIEW



The unique tRNA^{Sec} and its role in selenocysteine biosynthesis

Vitor Hugo Balasco Serrão^{1,2} · Ivan Rosa Silva¹ · Marco Tulio Alves da Silva¹ · Jéssica Fernandes Scoretcci¹ · Adriano de Freitas Fernandes¹ · Otavio Henrique Thiemann^{1,3}

Received: 13 March 2018 / Accepted: 26 May 2018 / Published online: 12 June 2018
 © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

Selenium (Se) is an essential trace element for several organisms and is mostly present in proteins as L-selenocysteine (Sec or U). Sec is synthesized on its L-seryl-tRNA^{Sec} to produce Sec-tRNA^{Sec} molecules by a dedicated selenocysteine synthesis machinery and incorporated into selenoproteins at specified in-frame UGA codons. UGA–Sec insertion is signaled by an mRNA stem-loop structure called the SElenoCysteine Insertion Sequence (SECIS). tRNA^{Sec} transcription regulation and folding have been described showing its importance to Sec biosynthesis. Here, we discuss structural aspects of Sec-tRNA^{Sec} and its role in Sec biosynthesis as well as Sec incorporation into selenoproteins. Defects in the Sec biosynthesis or incorporation pathway have been correlated with pathological conditions.

Keywords Selenocysteine · Sec · Sec-tRNA^{Sec} · Selenoprotein

Introduction

In the course of protein biosynthesis, each mRNA codon is recognized by a specific anticodon at the cognate aminoacylated tRNA (Woese et al. 2000). A polymer of amino acid residues is then formed as the ribosome progresses along the mRNA until a termination (stop) codon (UAG—amber, UAA—ochre, or UGA—opal) is reached (Agris 2004, 2008). The efficiency of translation has been correlated, in some instances, to the availability of specific tRNA and tRNA gene copy number in the genome (Maraia and Iben 2014). Francis Crick stressed in 1966 that the wobble hypothesis does not permit UGA codon to code for any amino acid but cysteine or tryptophan (Crick 1966). Later,

the opal codon was shown to code for tryptophan in mitochondria (Macino et al. 1979) and cysteine in *Euplotes octocarinatus* (Meyer et al. 1991). Furthermore, the frozen accident theory stated that the genetic code is also universal and any change would be strongly selected against (Crick 1968).

However, Diamond and collaborators described, in 1981, an unusual seryl-tRNA_{UCA} (now known as seryl-tRNA^{Sec}) suppressor of the canonical UGA stop codon in chicken (Diamond et al. 1981). Over more than three decades of extensive research, this unusual RNA molecule was shown to function as a carrier molecule in which the 21st amino acid selenocysteine (Sec or U) is synthesized from serine and incorporated in a nascent selenoprotein (Bock et al. 1991a; Donovan and Copeland 2010; Rother et al. 2001; Xu et al. 2007a). Selenocysteine differs from serine and cysteine by a single atom (Se instead of O or S, respectively) in its side chain (Collins et al. 2012). Compared to cysteine, free selenocysteine has a lower pKa for the selenolate and is also more nucleophilic, conferring its unique properties when found in a microenvironment of a selenoprotein (Arner 2010).

Selenocysteine-specific incorporation into selenoproteins at a UGA codon is due to selenocysteinyl-tRNA^{Sec} anticodon recognition that is inconsistent with the frozen accident theory (Soll and RajBhandary 2006). This intricate process requires a complex selenocysteine-specific machinery that will be further described.

Handling Editor: J. D. Wade.

Vitor Hugo Balasco Serrão, Ivan Rosa Silva, Marco Tulio Alves da Silva have equal contribution.

✉ Otavio Henrique Thiemann
 thiemann@ifsc.usp.br

¹ São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, Brazil

² Neurobiology Department, Harvard Medical School, Boston, USA

³ Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil



Characterization of a *Schistosoma mansoni* NDPK expressed in sexual and digestive organs

Juliana Roberta Torini^{a,1}, Adriano de Freitas Fernandes^{a,1}, Vitor Hugo Balasco Serrão^{a,b,*,1}, Larissa Romanello^a, Louise E. Bird^c, Joanne E. Nettleship^c, Raymond J. Owens^c, José Brandão-Neto^d, Ana Eliza Zeraik^a, Ricardo DeMarco^a, Humberto D'Muniz Pereira^a

^a Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13563-120, São Carlos, SP, Brazil

^b Department of Medicine Pathobiology, University of Toronto, M5S 1A8, Toronto, Canada

^c OPPF-UK, Research Complex at Harwell, Rutherford Appleton Laboratory, Oxford, OX11 0FA, UK

^d Diamond Light Source, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, OX11 0DE, UK



ARTICLE INFO

Keywords:

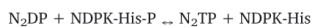
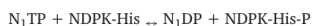
Crystallography
Isothermal titration calorimetry
NDPK
Schistosoma mansoni

ABSTRACT

Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) are crucial to keep the high triphosphate nucleotide levels in the biological process. The enzymatic mechanism has been extensively described; however, the structural characteristics and kinetic parameters have never been fully determined. In *Schistosoma mansoni*, NDPK (*Sm*NDPK) is directly involved in the pyrimidine and purine salvage pathways, being essential for nucleotide metabolism. The *Sm*NDPK enzymatic activity is the highest of the known purine metabolisms when compared to the mammalian NDPKs, suggesting the importance of this enzyme in the worm metabolism. Here, we report the recombinant expression of *Sm*NDPK that resulted in 1.7 and 1.9 Å apo-form structure in different space-groups, as well as the 2.1 Å *Sm*NDPK.ADP complex. The binding and kinetic assays reveal the ATP-dependence for enzyme activation. Moreover, *in situ* hybridization showed that *Sm*NDPK transcripts are found in reproductive organs and in the esophagus gland of adult worms, which can be intrinsically related with the oviposition and digestive processes. These results will help us fully understand the crucial participation of this enzyme in *Schistosoma mansoni* and its importance for the pathology of the disease.

1. Introduction

Nucleoside diphosphate kinase (EC2.7.4.6) is the enzyme responsible for the reversible transference of γ -phosphoryl group from a triphosphate to a diphosphate nucleoside [1,2]. This transfer mechanism occurs through a enzymatic transitory state, where a catalytic histidine is temporarily phosphorylated, creating a “ping-pong” mechanism [3], as can be seen at schema below:



The NDPK is found in all cells and it is able to use both purines and pyrimidines nucleotides, as well as oxy and deoxy derivatives, showing low specificity to bases moiety of the nucleotides [4,5]. These characteristics confer an important role on the balance and maintenance of oxy- and deoxy triphosphate nucleoside into cells [6–8] and could be

related with cardiovascular disease [9] and problems during the metastasis processes [10].

Due to their importance in cell metabolism, many structural studies have been performed (154 PDB entries). Interestingly, in only a few the native substrates (ADP, ATP, CDP, CTP, GDP, dGTP/GTP, TDP, and UDP) were used.

The *S. mansoni* parasite is an atypical trematode (the adult stage is sexually dimorphic); it is the causative agent of schistosomiasis, a neglected tropical disease that, according to World Health Organization, affects 218 million of people worldwide [11]. *S. mansoni* is incapable of synthesizing purine nucleotides or their immediate precursors by the *de novo* pathway [12–20], thus the purine salvage pathway represents a vital pathway for the maintenance of ATP or GTP energy systems, with NDPK occupying a central position in the control of cell functions.

This enzyme is important in several biological processes from bacteria to humans. In the *Schistosoma mansoni* parasite, NDPK activity is

* Corresponding author at: Department of Medicine Pathobiology, University of Toronto, 1 King's College Circle, M5S 1A8, Toronto, ON, Canada.
E-mail address: vitor.serrao@utoronto.ca (V.H. Balasco Serrão).

¹ The authors contribute equality to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111187>

Received 5 February 2019; Received in revised form 9 May 2019; Accepted 13 May 2019
Available online 16 May 2019

0166-6851/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molbiopara

In vitro and *in vivo* characterization of the multiple isoforms of *Schistosoma mansoni* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases

Larissa Romanello^a, Ana Eliza Zeraik^a, Adriano de Freitas Fernandes^a, Juliana Roberta Torini^a, Louise E. Bird^{b,c}, Joanne E. Nettleship^{b,c}, Heather Rada^{b,c}, Yamini Reddivari^{b,c}, Ray J. Owens^{b,c}, Vitor Hugo Balasco Serrão^d, Ricardo DeMarco^a, José Brandão-Neto^e, Humberto D'Muniz Pereira^{a,*}

^a Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13563-120, São Carlos, SP, Brazil

^b OPFF-UK, Research Complex at Harwell, Rutherford Appleton Laboratory, Oxford, OX11 0FA, UK

^c Division of Structural Biology, University of Oxford, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive, Headington, Oxon, OX2 7BN, UK

^d Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, M5S-1A8, Toronto, ON, Canada

^e Diamond Light Source, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, OX11 0DE, UK



ARTICLE INFO

Keywords:

Schistosoma mansoni
Purine salvage pathway
Hypoxanthine-guanine
phosphoribosyltransferase
HGPRT

ABSTRACT

Schistosoma mansoni, the parasite responsible for schistosomiasis, lacks the “*de novo*” purine biosynthetic pathway and depends entirely on the purine salvage pathway for the supply of purines. Numerous reports of praziquantel resistance have been described, as well as stimulated efforts to develop new drugs against schistosomiasis. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) is a key enzyme of the purine salvage pathway. Here, we describe a crystallographic structure of the *S. mansoni* HPGRT-1 (*Sm*HGPRT), complexed with IMP at a resolution of 2.8 Å. Four substitutions were identified in the region of the active site between *Sm*HGPRT-1 and human HGPRT. We also present data from RNA-Seq and WISH, suggesting that some isoforms of HGPRT might be involved in the process related to sexual maturation and reproduction in worms; furthermore, its enzymatic assays show that the isoform *Sm*HGPRT-3 does not present the same catalytic efficiency as other isoforms. Finally, although other studies have previously suggested this enzyme as a potential antischistosomal chemotherapy target, the kinetics parameters reveal the impossibility to use *Sm*HGPRT as an efficient chemotherapy target.

1. Introduction

Schistosoma mansoni is a pathogenic trematode parasite that causes schistosomiasis in humans, one of the most prevalent tropical diseases infecting approximately three hundred million people worldwide [1]. Despite its importance, this disease is neglected [2] because it is directly related to areas with precarious economic and social development, and especially a lack of appropriate sanitation [3].

The current treatment is limited to using a single drug called praziquantel. However, many reports of resistance have been described, suggesting the need for novel treatments [4,5]. Since *Schistosoma mansoni* does not have the *de novo* purine nucleotide pathway, unlike its human host, it depends completely on the purine salvage pathway to supply its demands of these nucleotides [6–14]. The findings of Dovey

et al. have shown that the key enzymes for purine salvage in *S. mansoni* are the phosphoribosyltransferases that catalyze the conversion of the purine bases hypoxanthine, and guanine, to their respective nucleotides IMP, and GMP, in the presence of 5-phosphorylribose 1-pyrophosphate (PRPP) [15].

Schistosomal HGPRTase has been proposed as a potential target for antischistosomal chemotherapy [8,13] since the inhibition of this enzyme will effectively block the supply of guanine nucleotides for the parasite [15]. Small interfering RNAs (RNAs) against *Sm*HGPRT was injected into infected mice and resulted in approximately 27% lower worm burden after a 60% reduction on the transcript levels for HGPRT [16]. Therefore, these results suggest that HGPRT may play some role, but not a major one, in the survival of this pathogen, probably due to their incapability of *de novo* purine synthesis and the lack of

Abbreviations: HGPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; *Sm*HGPRT, *Schistosoma mansoni* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; PRPP, 5-phosphorylribose 1-pyrophosphate; IMP, inosine monophosphate; GMP, guanosine monophosphate

* Corresponding author.

E-mail address: hmuniz@ifsc.usp.br (H.D. Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.005>

Received 3 December 2018; Received in revised form 30 January 2019; Accepted 12 February 2019

Available online 14 February 2019

0166-6851/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Proteins and Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapapSeryl-tRNA synthetase specificity for tRNA^{Sec} in Bacterial Sec biosynthesisAdriano de Freitas Fernandes^a, Vitor Hugo Balasco Serrão^{a,b}, Jéssica Fernandes Scoretcci^{a,c}, Otavio Henrique Thiemann^{a,d,*}^a Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Trabalhador São Carlense Av., 400, São Carlos, SP CEP 13566-590, Brazil^b Laboratory Medicine & Pathobiology, University of Toronto, 1 King's College Circle, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, 2350 Health Science Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada^d Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos – UFSCar, 13565-905 São Carlos, 16 SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Seryl-tRNA synthetase
tRNA^{[Ser]Sec}
Protein-tRNA interaction
Selenocysteine

ABSTRACT

tRNA synthetases are responsible for decoding the molecular information, from codons to amino acids. Seryl-tRNA synthetase (SerRS), besides the five isoacceptors of tRNA^{Ser}, recognizes tRNA^{[Ser]Sec} for the incorporation of selenocysteine (Sec, U) into selenoproteins. The selenocysteine synthesis pathway is known and is dependent on several protein-protein and protein-RNA interactions. Those interactions are not fully described, in particular, involving tRNA^{[Ser]Sec} and SerRS. Here we describe the molecular interactions between the *Escherichia coli* Seryl-tRNA synthetase (EcSerRS) and tRNA^{[Ser]Sec} in order to determine their specificity, selectivity and binding order, leading to tRNA aminoacylation. The dissociation constant of EcSerRS and tRNA^{[Ser]Sec} was determined as (126 ± 20) nM. We also demonstrate that EcSerRS binds initially to tRNA^{[Ser]Sec} in the presence of ATP for further recognition by *E. coli* selenocysteine synthetase (EcSelA) for Ser to Sec conversion. The proposed studies clarify the mechanism of tRNA^{[Ser]Sec} incorporation in *Bacteria* as well as of other domains of life.

1. Introduction

Decoding the mRNA codons into amino acids is achieved by the aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS). This family of enzymes recognize and aminoacylate the correct tRNAs with its cognate amino acid, for further incorporation into the specific codon at the ribosome. In particular, prokaryotic Seryl-tRNA synthetase (SerRS), discriminates five isoacceptor tRNA^{Ser} (anticodons CGA, GCU, GGA and UGA) in addition to tRNA^{[Ser]Sec} (anticodon UCA) among the full repertoire of cellular tRNAs [1].

Selenocysteine (Sec) amino acid is co-translationally incorporated into specialized selenoenzymes, selenoproteins. These selenoproteins are involved in essential biological functions, such as oxidoreduction, redox signaling, and antioxidant defense [1–3]. Specialized enzymatic machinery composed of five different proteins and two RNAs is required for Sec incorporation [1–4]. Therefore, the first step in Sec biosynthesis is the aminoacylation of tRNA^{[Ser]Sec}.

Seryl-tRNA synthetase from *E. coli* (EcSerRS) is a 430 amino acids, 48 kDa, class II aaRS that aminoacylates the tRNA^{[Ser]Sec} by two consecutive reactions. The first results in the formation of the L-seryl-

adenylate intermediate releasing inorganic pyrophosphate (PPi) in the presence of ATP and Mg²⁺ [5,6]. The L-seryl group is then transferred to the tRNA^{Ser}, or tRNA^{[Ser]Sec}, at the 3'-OH end resulting in L-seryl-tRNA^{Ser} or L-seryl-tRNA^{[Ser]Sec} [7–11].

Structural studies using human SerRS in complex with tRNA^{[Ser]Sec} [12] demonstrate that the specific SerRS.tRNA^{[Ser]Sec} interactions occur in the N-terminal portion of SerRS. Unlike tRNA^{Ser}, the interaction regions of tRNA^{[Ser]Sec} with SerRS were mainly mapped to the acceptor and variable arms of tRNA^{[Ser]Sec} [12]. Although this important structural information, the dynamic interaction of SerRS and tRNA^{[Ser]Sec} has not been fully demonstrated.

In this report, we investigated the EcSerRS and tRNA^{[Ser]Sec} interactions using different tRNA mutants with fluorescence anisotropy spectroscopy (FAS) and circular dichroism (CD). FAS experiments using distinct tRNA^{[Ser]Sec} constructions allowed to determine the structural importance of SerRS recognition. Moreover, we also demonstrated the specific delivery interactions among SerRS, tRNA^{[Ser]Sec} and EcSelA, thus elucidating the ternary complex EcSerRS.tRNA^{[Ser]Sec}.EcSelA formation. Therefore, this study contributes to the understanding the tRNA^{[Ser]Sec} mechanism of recognition in the Sec biosynthesis pathway

Abbreviations: PLP, pyridoxal 5'-phosphate; Sec, selenocysteine; SEC, size-exclusion chromatography; SelA, selenocysteine synthase; SelB, selenocysteine-specific elongation factor; SelC or tRNA^{[Ser]Sec}, specific RNA transporter for Sec incorporation; SelD, selenophosphate synthetase; SerRS, seryl-tRNA synthetase; FAS, fluorescence anisotropy spectroscopy; CD, circular dichroism

* Corresponding author at: Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, 400 Trabalhador São Carlense Av., São Carlos - SP CEP 13566-590, Brazil.

E-mail address: thiemann@ifsc.usp.br (O.H. Thiemann).

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140438>

Received 7 February 2020; Received in revised form 8 April 2020; Accepted 18 April 2020

Available online 21 April 2020

1570-9639/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Initial steps in selenocysteine biosynthesis: The interaction between selenocysteine lyase and selenophosphate synthetase

Jessica F. Scortecchi^{a,b}, Vitor Hugo B. Serrão^{a,c}, Adriano F. Fernandes^a, Luis G.M. Basso^{a,d}, Raissa F. Gutierrez^a, Ana Paula U. Araujo^a, Mario O. Neto^e, Otavio H. Thiemann^{a,f,*}

^a Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Trabalhador São Carlense Av., 400, São Carlos, SP CEP 13566-590, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, 2350 Health Science Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada

^c Laboratory Medicine & Pathobiology, University of Toronto, 1 King's College Circle, Toronto, Ontario, M5S 1A8, Canada

^d Faculty of Science, Philosophy and Letters, University of Sao Paulo, CEP 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Bioscience Institute of Universidade Estadual Paulista, Rubião Jr., Botucatu, SP CEP 18618-000, Brazil

^f Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos – UFSCar, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 January 2020

Received in revised form 29 February 2020

Accepted 28 March 2020

Available online 8 April 2020

Keywords:

Selenophosphate synthetase

Selenocysteine lyase

Selenocysteine biosynthesis

ABSTRACT

The selenocysteine (Sec) incorporation is a co-translational event taking place at an in-frame UGA-codon and dependent on an organized molecular machinery. Selenium delivery requires mainly two enzymes, the selenocysteine lyase (CsdB) is essential for Sec recycling and conversion to selenide, further used by the selenophosphate synthetase (SelD), responsible for the conversion of selenide in selenophosphate. Therefore, understanding the catalytic mechanism involved in selenium compounds delivery, such as the interaction between SelD and CsdB (*EcCsdB.EcSelD*), is fundamental for the further comprehension of the selenocysteine synthesis pathway and its control. In *Escherichia coli*, *EcCsdB.EcSelD* interaction must occur to prevent cell death from the release of the toxic intermediate selenide. Here, we demonstrate and characterize the *in vitro EcSelD.EcCsdB* interaction by biophysical methods. The *EcSelD.EcCsdB* interaction occurs with a stoichiometry of 1:1 in presence of selenocysteine and at a low-nanomolar affinity (~1.8 nM). The data is in agreement with the small angle X-ray scattering model fitted using available structures. Moreover, yeast-2-hybrid assays supported the macromolecular interaction in the cellular environment. This is the first report that demonstrates the interaction between *EcCsdB* and *EcSelD* supporting the hypothesis that *EcSelD.EcCsdB* interaction is necessary to sequester the selenide during the selenocysteine incorporation pathway in *Bacteria*.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Selenocysteine (Sec) is known as the 21st amino acid [1], being incorporated in selenoproteins at specific UGA codons. [2,3]. This unique amino acid is present in the three domains of life: *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya* in selenoproteins involved in various biological functions [4].

In *Bacteria*, Sec biosynthesis pathway requires a highly complex molecular machinery that includes five different proteins and two specific RNAs. The Sec biosynthesis initiates by the specific tRNA (tRNA^{Sec}) loading with L-serine (L-Ser) by the seryl-tRNA synthetase (SerRS, E.C. 6.1.1.11). Selenophosphate is the selenium donor in the conversion of Ser to Sec by a homodecamer complex, selenocysteine synthase (SelA,

E.C. 2.9.1.1), in the Ser-tRNA^{Ser}Sec, producing selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Sec-tRNA^{Sec}) [3], for further incorporation into nascent selenoproteins.

Selenium is recycled in the cell from selenocysteine mainly by selenocysteine lyase (CsdB, E.C. 2.8.1.7 and E.C. 4.4.1.16), which reduces Sec to selenide (Se²⁻) in the presence of a reducing agent. [5] The Se²⁻ compound, in turn, is converted to selenophosphate by the ATP-dependent enzyme selenophosphate synthetase (SelD, E.C. 2.7.9.3) [6]. In *Escherichia coli*, it had been demonstrated that selenophosphate is part of the transient ternary complex *EcSelD.EcSelA.Ser-tRNA^{Ser}Sec*, for Sec-tRNA^{Sec} biosynthesis [7]. Sec-tRNA^{Sec} is transferred to the ribosome by a GTP-dependent specific elongation factor (SelB, E.C. 3.6.5.3), guided to the UGA-codon by the mRNA structural element, SelenoCysteine Insertion Sequence (SECIS) [8–10].

Since selenium compounds are highly toxic to the cell, it is essential to understand the catalytic mechanism and the elements involved in the formation of protein complexes. Mihara and collaborators previously demonstrated the formation of selenium containing tRNA in the absence of *csdB* [11]. On the other hand, selenocysteine lyase has been reported as necessary for selenoprotein synthesis in conditions of

Abbreviations: *EcSelD*, selenophosphate synthetase from *E. coli*; *EcCsdB*, selenocysteine lyase from *E. coli*.

* Corresponding author at: Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Trabalhador São Carlense Av., 400, São Carlos, SP CEP 13566-590, Brazil

E-mail address: thiemann@fisc.usp.br (O.H. Thiemann).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.241>

0141-8130/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



The Specific Elongation Factor to Selenocysteine Incorporation in *Escherichia coli*: Unique tRNA^{Sec} Recognition and its Interactions

Vitor Hugo Balasco Serrão^{1,2†}, Adriano de Freitas Fernandes^{1†}, Luis Guilherme Mansor Basso^{3,4}, Jéssica Fernandes Scortecci^{1,5}, Edson Crusca Júnior⁶, Marinônio Lopes Cornélio⁷, Bibiana Monson de Souza⁸, Mário Sérgio Palma⁸, Mario de Oliveira Neto⁹ and Otavio Henrique Thiemann^{1,10*}

1 - Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Trabalhador Sao Carlense Av., 400, São Carlos, SP CEP 13566-590, Brazil

2 - Department of Chemistry and Biochemistry, University California – Santa Cruz, 1156 High St., Santa Cruz, CA 95060, United States

3 - Physical Sciences Laboratory, State University of Northern Rio de Janeiro Darcy Ribeiro – UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

4 - Faculty of Science, Philosophy and Letters, University of Sao Paulo, CEP 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

5 - Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, 2350 Health Science Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada

6 - Department of Physical Chemistry, Chemistry Institute of the São Paulo State University – UNESP, CEP 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

7 - Physics Department, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University – UNESP, São Jose do Rio Preto, SP, Brazil

8 - Department of General and Applied Biology, Institute of Biosciences of Rio Claro, São Paulo State University – UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

9 - Bioscience Institute of Universidade Estadual Paulista, Rubião Jr., Botucatu, SP CEP 18618-000, Brazil

10 - Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos – UFSCar, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil ¹

Correspondence to Otavio Henrique Thiemann: Department of Physics and Interdisciplinary Science, Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo – USP, 1100 Joao Dagnone Av, Jardim Santa Angelina, CEP 13563-120 Sao Carlos, SP, Brazil. thiemann@ifsc.usp.br (O.H. Thiemann)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167279>

Edited by Ruben L. Gonzalez

Abstract

Several molecular mechanisms are involved in the genetic code interpretation during translation, as codon degeneration for the incorporation of rare amino acids. One mechanism that stands out is selenocysteine (Sec), which requires a specific biosynthesis and incorporation pathway. In *Bacteria*, the Sec biosynthesis pathway has unique features compared with the eukaryote pathway as Ser to Sec conversion mechanism is accomplished by a homodecameric enzyme (selenocysteine synthase, SelA) followed by the action of an elongation factor (SelB) responsible for delivering the mature Sec-tRNA^{Sec} into the ribosome by the interaction with the Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS). Besides this mechanism being already described, the sequential events for Sec-tRNA^{Sec} and SECIS specific recognition remain unclear. In this study, we determined the order of events of the interactions between the proteins and RNAs involved in Sec incorporation. Dissociation constants between SelB and the native as well as unacylated-tRNA^{Sec} variants demonstrated that the acceptor stem and variable arm are essential for SelB recognition. Moreover, our data support the sequence of molecular events where GTP-activated SelB strongly interacts with SelA-tRNA^{Sec}. Subsequently, SelB.GTP.tRNA^{Sec} recognizes the mRNA SECIS to deliver the tRNA^{Sec} to the ribosome. SelB in complex with its specific RNAs were examined using Hydrogen/Deuterium exchange

Received: 5 October 2021 | Revised: 5 November 2021 | Accepted: 5 November 2021
 DOI: 10.1002/pro.4227

TOOLS FOR PROTEIN SCIENCE



SAXSMoW 3.0: New advances in the determination of the molecular weight of proteins in dilute solutions from SAXS intensity data on a relative scale

Mario de Oliveira Neto¹ | Adriano de Freitas Fernandes² | Vassili Piiadov² |
 Aldo Felix Craievich³ | Evandro Ares de Araújo⁴ | Igor Polikarpov²

¹Biophysics and Pharmacology Department, Bioscience Institute, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Sao Carlos Institute of Physics, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

³Department of Applied Physics, University of Sao Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence

Igor Polikarpov, Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, Trabalhador São-Carlense, 400. São Carlos, SP, CEP 13566-590, Brazil. Email: ipolikarpov@ifsc.usp.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 140739/2017-3, 303988/2016-9, 307490/2019-0, 310531/2019-5; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2015/13684-0, 2018/22300-0

Abstract

SAXSMoW (SAXS Molecular Weight) is an online platform widely used over the past few years for determination of molecular weights of proteins in dilute solutions. The scattering intensity retrieved from small-angle X-ray scattering (SAXS) raw data is the sole input to SAXSMoW for determination of molecular weights of proteins in liquid. The current updated SAXSMoW version 3.0 determines the linear dependence of the true protein volume on their apparent protein volume, based on SAXS curves calculated for 67,000 protein structures selected from the Protein Data Bank. SAXSMoW 3.0 was tested against 43 experimental SAXS scattering curves from proteins with known molecular weights. Our results demonstrate that most of the molecular weights determined for the nonglycosylated and also for the glycosylated proteins are in good agreement with their expected molecular weights. Additionally, the average discrepancies between the calculated molecular weights and their nominal values for glycosylated proteins are similar to those for nonglycosylated ones.

KEYWORDS

molecular weight, protein density, SAXS

1 | INTRODUCTION

Small-angle X-ray scattering (SAXS) technique is being widely used to retrieve low-resolution structural information on biomacromolecules in solution.^{1–4} After the pioneering works by A. Guinier,⁵ the SAXS technique found its applications in investigations of polymers, liquid crystals, proteins in solution, and other materials.⁶ Modern synchrotron-based X-ray sources, powerful computers, and specialized software along with new area detectors

significantly improved the quality of the results derived from SAXS experiments.^{1,2,7} Isotropic systems composed of a diluted set of randomly oriented identical nanoparticles immersed in liquids (e.g., proteins diluted in buffers) are particularly favorable for SAXS data analysis.⁸ As a matter of fact, in this case the associated SAXS curves are free from frequently complex effects due to anisotropy, size polydispersity, and spatial correlation.^{7,9–11}

Using classical setups, SAXS technique allows for the determination of low-resolution structural parameters of

Received: 26 November 2022 | Revised: 19 December 2022 | Accepted: 26 December 2022
 DOI: 10.1002/cm.21740

RESEARCH ARTICLE



Conservation and divergence of the G-interfaces of *Drosophila melanogaster* septins

Adriano de Freitas Fernandes | Diego Antonio Leonardo | Italo Augusto Cavini |
 Higor Vinicius Dias Rosa | Jhon Antoni Vargas | Humberto D'Muniz Pereira |
 Alessandro S. Nascimento | Richard Charles Garratt

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, Brazil

Correspondence

Richard Charles Garratt, São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, Avenida João Dagnone 1100, São Carlos 13563-120, Brazil.
 Email: richard@ifsc.usp.br

Present address

Higor Vinicius Dias Rosa, Structural and Computational Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.

Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Numbers: 2017/18173-0, 2020/03983-9, 2019/22000-9, 2018/19992-7, 2021/08158-9, 2020/02897-1, 2014/15546-1; CNPq, Grant/Award Numbers: 302992/2021-9, 140739/2017-3; Instruct-ERIC, Grant/Award Number: PID 18526; iNEXT-Discovery

Abstract

Septins possess a conserved guanine nucleotide-binding (G) domain that participates in the stabilization of organized hetero-oligomeric complexes which assemble into filaments, rings and network-like structures. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has five such septin genes encoding Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 and Pnut. Here, we report the crystal structure of the heterodimer formed between the G-domains of Sep1 and Sep2, the first from an insect to be described to date. A G-interface stabilizes the dimer (in agreement with the expected arrangement for the *Drosophila* hexameric particle) and this bears significant resemblance to its human counterparts, even down to the level of individual amino acid interactions. On the other hand, a model for the G-interface formed between the two copies of Pnut which occupy the centre of the hexamer, shows important structural differences, including the loss of a highly favourable bifurcated salt-bridge network. Whereas wild-type Pnut purifies as a monomer, the reintroduction of the salt-bridge network results in stabilizing the dimeric interface in solution as shown by size exclusion chromatography and thermal stability measurements. Adaptive steered molecular dynamics reveals an unzipping mechanism for dimer dissociation which initiates at a point of electrostatic repulsion within the switch II region. Overall, the data contribute to a better understanding of the molecular interactions involved in septin assembly/disassembly.

KEYWORDS

crystal structure, *Drosophila*, molecular dynamics, protein-protein interaction, septin

1 | INTRODUCTION

Septins are P-loop-containing GTP-binding proteins present in most eukaryotes which were initially reported for their role in the process of cytokinesis and septum formation in baker's yeast (Hartwell, 1971). It is currently known that they participate in several other important cellular processes, such as the maintenance of cell structure and polarity, spermatogenesis, exocytosis, ciliogenesis, phagocytosis, vesicle trafficking, motility, apoptosis and defence against bacterial infection (Beise & Trimble, 2011; Bridges et al., 2014; Hu et al., 2012; Huang

et al., 2008; Ihara et al., 2005; Kim et al., 2010; Kinoshita & Noda, 2001; Mostowy & Cossart, 2012; Robertin & Mostowy, 2020; Surka, Tsang, & Trimble, 2002). These roles are believed to be related to the ability of septins to form highly organized filamentous structures like bundles, rings and gauzes (Byers & Goetsch, 1976; Field et al., 1996; Marquardt, Chen, & Bi, 2019).

Septins are composed of a central GTP binding domain (G-domain) flanked by variable N- and C-terminal domains, the latter frequently containing coiled-coil repeats (Cavini et al., 2021). The G-domain resembles that found in small GTPases, including the G1,