

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ELOY CONDORI MAMANI

*Engenharia de septinas: quimeras envolvendo o C-terminal*

São Carlos  
2022



ELOY CONDORI MAMANI

*Engenharia de septinas: quimeras envolvendo o C-terminal*

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ulian de Araujo

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

São Carlos  
2022

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.

Condori Mamani, Eloy

Engenharia de septinas: quimeras envolvendo o C terminal / Eloy Condori Mamani; orientadora Ana Paula Ulian de Araujo - versão corrigida -- São Carlos, 2022.  
109 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Septina. 2. Proteína de quimeras. 3. Coiled-coil.  
4. Interface de interação. I. Araujo, Ana Paula Ulian de, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho à minha família: meus pais Felipa e José Luis por todo incentivo, apoio à todas as minhas decisões e amor ao longo da minha vida.*

*À minha noiva Magaly, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho e incansável apoio nesta longa estrada.*

*À minha família: avós, tios, primos que sempre estiveram presentes durante minha formação. A Universidade Nacional de San Agustín (UNSA) de Arequipa, por me formar como Biólogo com a capacidade de lutar por meus sonhos.*



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ulian de Araujo, pela oportunidade de trabalho, confiança e orientação. Sou muito grato por todos os ensinamentos, experiências e conduta como orientadora, um exemplo de profissional e de pessoa.

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt por me permitir conhecer seu laboratório no ano 2017 e pelas contribuições, discussões e ideias que auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo de Biofísica e Biologia Estrutural. Aos técnicos Bel, Rafael, Susana, Fernando por auxiliarem na rotina de trabalho e, em especial, a Andressa cujas discussões e ajuda para utilizar os equipamentos foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. A meus colegas do grupo pelas sugestões e discussões durante as reuniões de grupo: Danielle, Ítalo, Helô, Diego, Debora, Higor, Luis, Adriano Furtado, Adriano Fernandez e Rafael.

A todos os meus amigos que nestes anos de trabalho estiveram presentes, fisicamente ou não, me aconselhando, torcendo e proporcionando momentos de felicidade e distração. Em especial ao Jhon que virou meu irmão aqui no Brasil.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela infraestrutura disponibilizada. Ao Programa Nacional de Bercas e Créditos Educativo (PRONABEC) do Perú, pela bolsa de mestrado. Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento que permitiu a realização deste projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste projeto, o meu muito obrigado.





*"Em questões de ciências, a autoridade de milhões não vale  
o raciocínio humilde de um único indivíduo."*

**Galileo Galilei**



## RESUMO

CONDORI MAMANI, E. **Engenharia de septinas:** quimeras envolvendo o C-terminal. 2022. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

As septinas são proteínas citoesqueléticas que participam de muitos processos celulares e são encontradas em diversos eucariotos. Uma propriedade importante das subunidades de septinas é sua capacidade de interagir entre si formando heterocomplexos, os quais se polimerizam em filamentos funcionais. As septinas possuem três domínios estruturais, o domínio N-terminal variável; o domínio G ou domínio de ligação ao nucleotídeo altamente conservado; e o domínio C-terminal, de tamanho variável. Estudos já mostraram que o domínio G das septinas é necessário e suficiente para a formação e polimerização dos heterocomplexos, mas regiões além do domínio G podem ser determinantes para a escolha da septina parceira. Assim, neste trabalho foram produzidas septinas humanas quiméricas na tentativa de avaliar a importância do domínio C-terminal na seleção de parceiros para interação septina-septina. Partindo das interações observadas no modelo hexamérico canônico de septinas 2-6-7-7-6-2, foram construídas proteínas quiméricas pela fusão das regiões codificantes do domínio G de SEPT9 (que não participa do hexâmero) com a região C-terminal de SEPT7. Inicialmente, duas versões quiméricas foram produzidas, sendo que ambas foram capazes de interagir com SEPT2G-SEPT6 formando um complexo 2-6-9/7. Análises por SEC-MALS de complexos sugerem que hexâmeros quiméricos podem ser formados, mas experimentos adicionais ainda são necessários. Para ampliar o entendimento das interfaces de interação, realizou-se uma modelagem do complexo formado entre a quimera e SEPT6. Esta análise permitiu identificar resíduos importantes na interface do *coiled-coil* heterodimérico formado entre os C-terminais, os quais aumentam a área de contato e proporcionam maior estabilidade ao complexo. Além disso, considerando a formação de um hexâmero, novas interfaces potenciais também foram modeladas e avaliadas. Em conjunto, os resultados mostraram que é possível substituir SEPT7 por SEPT9 no complexo 2-6-7, apenas pela inclusão do domínio C-terminal de SEPT7 no domínio G de SEPT9. Ainda, a formação dos complexos quiméricos amplia a importância da região C-terminal para a correta seletividade da septina parceira.

Palavras-chave: Septina. Proteína quimérica. *Coiled-coil*. Interface de interação.



## ABSTRACT

CONDORIMAMANI, E. **Septin engineering**: chimeras involving the C-terminal. 2022. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Septins are cytoskeletal proteins that participate in many cellular processes and are found in several eukaryotes. An important property of septin subunits is their ability to interact with each other to form heterocomplexes, which polymerize into functional filaments. Septins have three structural domains, the N-terminal variable domain; the highly conserved G domain or nucleotide binding domain; and the C-terminal domain, of variable length. Studies have already shown that the G domain of septins is necessary and sufficient for the formation and polymerization of heterocomplexes, but regions beyond the G domain can be decisive for the choice of the septin partner. Thus, in this work chimeric human septins were produced in an attempt to assess the importance of the C-terminal domain in the selection of partners for septin-septin interaction. Based on the interactions observed in the canonical hexamer model of septins 2-6-7-7-6-2, chimeric proteins were constructed by fusing the coding regions for the G domain of SEPT9 (which does not participate in the hexamer) with the C-terminal region of SEPT7. Initially, two chimeric versions were produced, both of which were able to interact with SEPT2G-SEPT6 forming a 2-6-9/7 complex. SEC-MALS analyzes of complexes suggest that chimeric hexamers can be formed, but further experiments are still needed. To broaden the understanding of the interaction interfaces, a modeling of the complex formed between the chimera and SEPT6 was carried out. This analysis allowed us to identify important residues in the heterodimeric coiled-coil interface formed between the C-terminals, which increase the contact area and provide greater stability to the complex. Furthermore, considering the formation of a hexamer, new potential interfaces were also modeled and evaluated. Taken together, the results showed that it is possible to replace SEPT7 with SEPT9 in the 2-6-7 complex, just by including the C-terminal domain of SEPT7 in the G domain of SEPT9. Furthermore, the formation of chimeric complexes increases the importance of the C-terminal region for the correct selectivity of the partner septin.

Keywords: Septin. Chimeric protein. *Coiled-coil*. Interaction interface.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das septinas no ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
Figura 2 - Arquitetura da septina durante o ciclo celular de leveduras. ....	24
Figura 3 - Interação das septinas com a membrana celular .....	25
Figura 4 - Mecanismos moleculares das Septina nos neurônios. ....	26
Figura 5 - Funções de septinas nos órgãos e sua conexão com doenças em humanos.....	27
Figura 6 - Distribuição filogenética das septinas em eucariotos. ....	29
Figura 7 - Características estruturais gerais das septinas.....	30
Figura 8 - Classificação das septinas humanas.....	31
Figura 9 - Região N-terminal das septinas humanas e suas regiões estruturadas.....	32
Figura 10 - Motivos de interação nas interfaces G da septinas .....	33
Figura 11 - Especificidades de interação na interface G das septinas .....	34
Figura 12 - Orientações dos <i>coiled-coils</i> .....	35
Figura 13 - Elementos estruturais do heterocomplexo de septinas.....	36
Figura 14 - Representação das diferentes formas que as septinas podem se formar. ....	37
Figura 15 - Reordenamento das posições das septinas no hexâmetro. ....	38
Figura 16 - Sequências de aminoácidos das quimeras SEPT9G/h7C e SEPT9G/7C.....	57
Figura 17 - Análise dos produtos da PCR do inserto e do vetor para a construção SEPT9G/h7C .....	58
Figura 18 - Análise do padrão de restrição dos clones da SEPT9G/h7C em pETDuet-1.....	59
Figura 19 - Análise de expressão e solubilidade de SEPT9GC $\alpha$ 0 e SEPT2G-SEPT6NGC.....	60
Figura 20 - Análise da purificação de SEPT9GC $\alpha$ 0 em presença de SEPT2G-SEPT6NGC...	61
Figura 21 - Análise de purificação do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6 com a quimera SEPT9G/7C .....	63
Figura 22 - Resultado da purificação em cromatografia de afinidade do heterocomplexo SEPT9G/h7C-SEPT2G-SEPT6NGC.....	64

Figura 23 - Cromatografias de exclusão molecular do heterocomplexo contendo o SEPT9G/h7C.....	<b>65</b>
Figura 24 - Cromatograma da dispersividade da amostra do heterocomplexo com a quimera SEPT9G/h7C analisada pelo método de SEC-MALS .....	<b>67</b>
Figura 25 - Resultado da purificação em cromatografia de afinidade da quimera SEPT9G/h7C analisado em SDS-PAGE 12% .....	<b>69</b>
Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular da quimera SEPT9G/h7C isolada.....	<b>69</b>
Figura 27 - Cromatograma da dispersividade da amostra da quimera SEPT9G/h7C analisada pelo método de SEC-MALS. ....	<b>70</b>
Figura 28 - Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina em coluna de troca iônica da quimera SEPT9G/h7C desnaturada.....	<b>71</b>
Figura 29 - Micrografias do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C com dimensões 2048 xels .....	<b>73</b>
Figura 30 - Representação do modelo da SEPT6 e SEPT9G/h7C usando a técnica de <i>deep learning</i> do AlphaFold2 em duas orientações.....	<b>74</b>
Figura 31 - Avaliação do modelo gerado entre SEPT6 e SEPT9G/h7C (quimera) usando <i>Procheck</i> e <i>Verify3D</i> .....	<b>75</b>
Figura 32 - Modelos estruturais de oligômeros de septinas humanas e suas interfaces.....	<b>76</b>
Figura 33 - Registro e camadas presentes no modelo <i>AlphaFold2</i> do <i>coiled-coil</i> da SEPT6C e SEPT7C.....	<b>77</b>
Figura 34 - Tipos de <i>coiled-coil</i> e suas periodicidades. ....	<b>78</b>
Figura 35 - Sobreposição da interface NC formada pelas SEPT6-SEPT9 e SEPT6-SEPT7...	<b>79</b>
Figura 36 - Vista em superfície das subunidades e interfaces G da SEPT9.....	<b>81</b>
Figura 37 - Conformações da região <i>Switch II</i> na interface G. ....	<b>82</b>
Figura 38 - Resíduos característicos na formação das pontes salinas na região média da interface G das septinas.....	<b>83</b>
Figura 39 - Resíduos do <i>Septin Unique Element</i> (SUE) que interagem na formação da interface G entre duas SEPT9. ....	<b>84</b>
Figura 40 - Escala comparativa da energia de livre de Gibbs de interação ( $\Delta^iG$ kcal/mol) e as áreas das interfaces nativas e promíscuas das septinas .....	<b>85</b>



Figura 41 - Resíduos aromáticos presentes no registro dos <i>coiled-coil</i> homodiméricos e heterodiméricos.....	<b>87</b>
Figura 42 Modelo do heterocomplexo hexamérico SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C-SEPT9G/h7C-SEPT6-SEPT2G .....	<b>89</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Construções para expressão de septinas humanas, armazenadas no banco de plasmídeos do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutura do IFSC e utilizadas neste trabalho. ....	47
Tabela 2 - Lista de primers específicos usado para a amplificação do inserto e o vetor para a construção da quimera SEPT9G/h7C.....	47
Tabela 3 - Reagentes, e quantidades deles mesmos, utilizados na reação de amplificação. ....	48
Tabela 4 - Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.....	49
Tabela 5 - Quantidade recomendada de fragmentos utilizados para montagem de Gibson.....	49
Tabela 6 - Características físico-químicas das construções das quimeras sem <i>hinge</i> e com <i>hinge</i> (SEPT9G/7C e SEPT9G/h7C, respetivamente). ....	59
Tabela 7 - Parâmetros obtidos da análise de SEC-MALS do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C.....	67
Tabela 8 - Parâmetros obtidos da análise de SEC-MALS da quimera SEPT9G/h7C .....	71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å <sup>2</sup>	Angstrom ao quadrado (unidade de medida de área de interface)
aa	aminoácidos
CC	<i>Coiled-Coil</i>
CDC	<i>Cell Division Cycle</i>
Cryo-EM	<i>Cryo-Electron Microscopy</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DnaK	chaperona molecular (Hsp70)
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina-5-trifosfato
HL	Hook-Loop
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDR	<i>Intrinsically Disordered Region</i> (região intrinsecamente não estruturada)
IPTG	Isopropil β-D-1—tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Meio de cultura <i>Lysogeny broth</i> (ou Luria-Bertani)
MALS	<i>Multi-Angle Light Scattering</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MMseqs2	<i>Many-against-Many sequence searching</i>
N <sub>DS</sub>	Pontes de dissulfeto
N <sub>HB</sub>	Número de Ligações de hidrogênio
N <sub>SB</sub>	Número de pontes salinas

PAR	<i>Polyacidic Region</i> (região poliácida das septinas)
PB1	<i>Polybasic sequence 1</i> (Região polibásica 1 de septinas)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de estruturas proteicas)
pI	Ponto isoelétrico
PIP	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PISA	<i>Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Raiz quadrada do desvio quadrático)
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão por tamanho)
SEPT	Septina
SUE	<i>Septin Unique Element</i> (elemento único de septinas)
SwI	<i>Switch I</i>
SwII	<i>Switch II</i>
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
$\Delta^iG$	Energia livre de Gibbs de interação, indica o ganho de energia na formação da interface

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 Descoberta das septinas .....	23
1.2 Funções e distribuição das septinas .....	24
1.3 Estrutura e características das septinas .....	29
1.3.1 Domínio N-terminal.....	32
1.3.2 Domínio de ligação ao GTP (domínio G).....	33
1.3.3 Domínio C-terminal.....	34
1.4 Complexos das septinas.....	36
<b>2 MOTIVAÇÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 Clonagem e construção dos sistemas de expressão .....	45
4.1.1 Linhagens bacterianas, vetores e condições de cultivo .....	45
4.1.2 Enzimas, <i>kits</i> e procedimentos em biologia molecular.....	45
4.1.3 Construção da proteína quimérica .....	46
4.1.4 Construções presentes no banco de plasmídeos .....	46
4.1.5 Construção da quimera com <i>hinge</i> (SEPT9G/h7C).....	47
4.1.5.1 <i>Gibson Assembly</i> para a inserção do <i>hinge</i> na quimera SEPT9G/7C.....	48
4.2 Expressão heteróloga dos heterocomplexos .....	50
4.3 Purificação e preparação das amostras .....	51
4.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade.....	51
4.3.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC) .....	52
4.3.3 <i>Desalting</i> e troca iônica .....	52
4.4 Caracterização biofísica dos produtos .....	53
4.4.1 Avaliação da massa molecular aparente e estado oligomérico.....	53

4.4.2 Análise do teor de nucleotídeo da quimera SEPT9G/h7C .....	54
4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	55
4.6 Modelamento da estrutura do complexo .....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1 Construção das proteínas quiméricas .....	57
5.2 Experimento controle: copurificação de SEPT2G-SEPT6 com SEPT9GC $\alpha$ 0 (não quimérica) .....	60
5.3 Expressão heteróloga, purificação e análise do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C.....	61
5.4 Expressão heteróloga, purificação e análise do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6NGC-SEPT9G/h7C.....	64
5.5 Análise do estado oligomérico por SEC-MALS .....	66
5.6 Análise do teor de nucleotídeo da quimera SEPT9G/h7C .....	68
5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	72
5.8 Modelamento da estrutura do complexo quimérico.....	73
5.9 Estudo da interface NC entre os <i>coiled-coils</i> da SEPT6 e SEPT7 .....	75
5.10 Estudo da interface NC entre SEPT6G e SEPT9G .....	79
5.11 Estudo da interface G entre SEPT9-SEPT9 .....	81
5.12 Estudo da região média da interface G entre SEPT9-SEPT9 .....	83
5.13 Estudo do SUE da interface G entre SEPT9-SEPT9 .....	84
5.14 Avaliação da estabilidade das interfaces dos heterofilamentos das septinas .....	85
5.15 Proposta do modelo do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C.....	88
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u>.....</b>	<b>93</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Descoberta das septinas

Desde a primeira identificação, já se passaram mais de 50 anos que Leland H. Hartwell, em 1970, nomeou os primeiros genes de septinas como CDCs (do inglês, *Cell Division Cycle*). Na época, esta denominação se deu em função dos estudos usando mutantes termossensíveis de *Saccharomyces cerevisiae* visarem identificar genes relacionados à divisão celular.<sup>1-3</sup> Assim, quatro genes (CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12), relacionados ao surgimento de múltiplos brotos alongados e que impediam a separação da célula-mãe da célula-filha, foram identificados na etapa final da citocinese de levedura.<sup>3</sup> Após alguns anos, Byers e Goetsh visualizaram por microscopia eletrônica filamentos altamente ordenados em forma de anel (Figura 1A) no septo (*bud neck*) de leveduras, de aproximadamente 10 nm de espessura.<sup>4</sup>

Mais tarde, os produtos proteicos destes genes foram identificados por imunofluorescência ao redor do septo (Figura 1B) e, por essa razão, as proteínas foram chamadas de septinas, sendo consideradas proteínas chave na citocinese.<sup>5</sup>

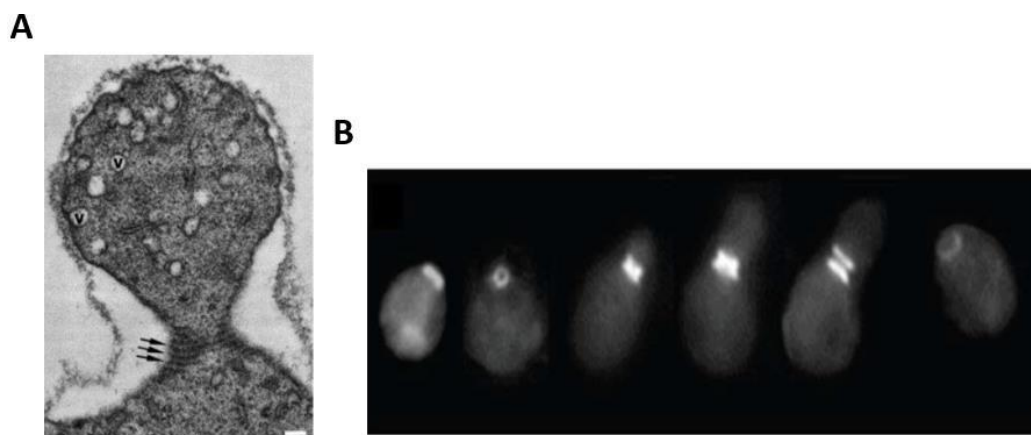


Figura 1 - Localização das septinas no ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Microscopia eletrônica com escala representando 0,1  $\mu\text{m}$ . B) Microscopia de imunofluorescência, na imagem se observa a formação de um anel de septinas no ciclo celular no estágio final da etapa G1 da citocinese, até a separação da célula-mãe e célula-filha.

Fonte: BYERS *et al.*<sup>6</sup>

## 1.2 Funções e distribuição das septinas

Como já mencionado, as septinas participam da divisão celular, mas esta função pode variar de um organismo para outro ou mesmo de um tipo celular para outro. Em leveduras, as septinas intervêm nas diferentes fases da divisão celular da (Figura 2).<sup>7-8</sup> Elas são necessárias para o recrutamento e retenção de proteínas de citocinese no pescoço do broto, seja por meio de interações diretas, por exemplo, com a proteína Hof1, uma das cinco proteínas da F-BAR,<sup>9</sup> ou por meio de proteínas de ligação à septina como Bni5, que liga os filamentos de septina à cadeia pesada de Myo1.<sup>10-11</sup>

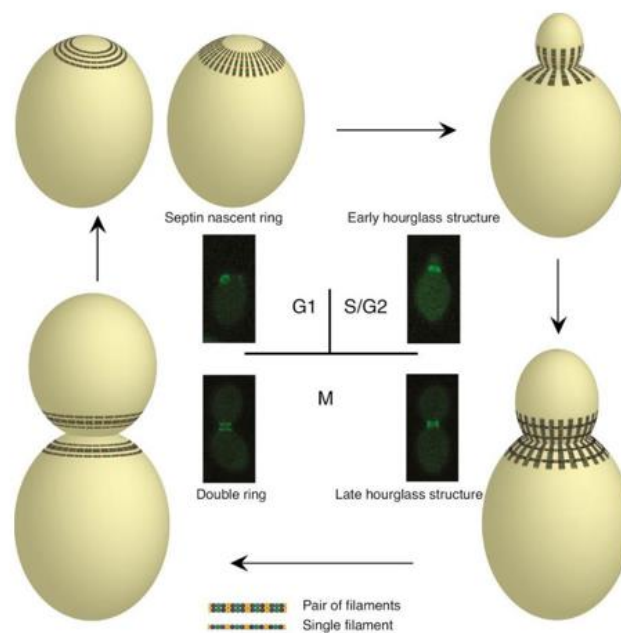


Figura 2 - Arquitetura da septina durante o ciclo celular de leveduras. O anel de septinas nascente na fase G1 é composto por longos filamentos em circunferência, simples e/ou duplos, ou as septinas são alinhadas como filamentos paralelos que são dispostos em forma de anel. Na fase S/G2, o anel se remodela em uma estrutura de ampulheta inicial, que é composta de filamentos duplos curtos dispostos como arranjos radiais alinhados com o eixo do broto mãe. À medida que a célula entra em anáfase, os septos se reorganizam em uma estrutura de ampulheta tardia, na qual filamentos duplos curtos alinhados paralelamente ao eixo do broto mãe são conectados por filamentos simples em circunferência.

Fonte: FARKAŠOVSKÝ<sup>7</sup>

Assim, além do papel originalmente descrito na citocinese (Hartwell 1971), um número crescente de observações tem atribuído às septinas outras funções biológicas. Descobriu-se que as septinas contribuem para vários processos celulares, participando do desenvolvimento e fisiologia de tecidos e de órgãos específicos, além de terem sido relacionadas a potenciais papéis em vários estados fisiopatológicos.

Ao interagir com outros componentes do citoesqueleto, as septinas desempenham um papel no suporte e regulação da morfologia e rigidez celulares, facilitando a migração celular.<sup>12-13</sup> Experimentos em células HeLa na ausência de SEPT2 ou SEPT11 demonstraram que a rigidez celular é reduzida.<sup>14</sup> Em células T de camundongo, a depleção de SEPT7 resulta numa morfologia significativamente prejudicada. Além disso, os filamentos de septina demonstraram atuar como andaimes na membrana plasmática para regular a distribuição/recrutamento de proteínas ligadas à membrana (Figura 3), promovendo sua interação funcional<sup>15</sup> e também podem servir para a compartimentalização de domínios celulares discretos.<sup>16</sup> O papel das septinas no sistema imunológico tem sido muito pouco estudado, porém, sabe-se que SEPT9 é essencial para o desenvolvimento de linfócitos T,<sup>17</sup> e também que SEPT6 e SEPT7 possuem efeito sobre a estrutura e capacidade de migração das células T.<sup>18-19</sup>

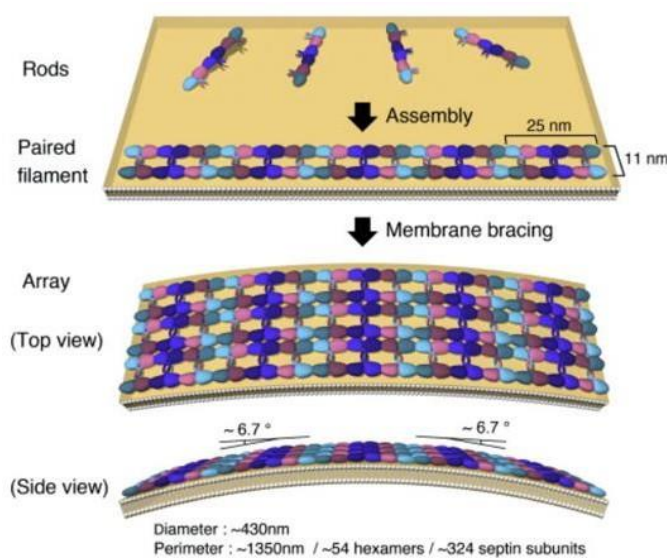


Figura 3 - Interação das septinas com a membrana celular. Os filamentos de septinas hexaméricas são desenhados de acordo com a estrutura atômica e os modelos propostos<sup>20</sup>. As SEPT2, 6 e 7 são coloridas em azul, rosa e ciano, respectivamente. Cada bastonete de septina está fracamente associado à bicamada lipídica contendo fosfolípidios de Inositol. Os *coiled-coils* de cada subunidade apontam para a contraparte do filamento pareado. À medida que a matriz do filamento de septina cresce, ela se adere à membrana mais avidamente. Quando a rigidez da massa filamentar supera a tensão lipossomal, surge a curvatura intrinsecamente favorecida.

Fonte: TANAKA-TAKIGUCHI<sup>21</sup>

As septinas, podem desempenhar um papel na mecanobiologia e na regulação das vias mecanotransducionais.<sup>12-13,22</sup> Apesar de não apresentarem atividade motora ou não gerarem força, elas têm um efeito potencial que pode modificar as respostas celulares ativadas por estiramento e a mecanotransdução.<sup>23-24</sup>

Além disso, as septinas também participam da indução e manutenção da curvatura celular, devido à sua capacidade de interagir com filamentos de actina afetando na rigidez da membrana celular (Figura 3).<sup>21,25-26</sup> O papel nas membranas plasmáticas tem sido atribuído à interação de uma região polibásica conservada, próxima ao N-terminal das septinas, com fosfolipídios de membrana.<sup>27</sup> Além disso, o C-terminal de algumas septinas, como ocorre em *Schistosoma mansoni* pode estar envolvido na interação com fosfolipídios.<sup>28</sup> Recentemente, uma hélice anfipática localizada no C-terminal de Cdc12 e Shs1 foi descrita como necessária e suficiente para que as septinas distingam diferentes composições lipídicas e curvaturas em escalas nanométricas e micrométricas.<sup>29-30</sup>

Outros estudos demonstram que o silenciamento de genes das septinas como SEPT7, SEPT9 e SEPT11 podem ser letais na embriogênese de mamíferos.<sup>31</sup> Em humanos, as septinas demonstraram ter muitas funções. No sistema nervoso, foi revelado que as septinas SEPT4, 6, 7, 11 e 14 participam da diferenciação de axônios e dendritos da migração neuronal, da formação de espinhos dendríticos, da ramificação dendrítica e de axônios.<sup>32</sup> Um esquema dos mecanismos moleculares das septinas envolvidos nos neurônios podem ser visualizados na Figura 4.

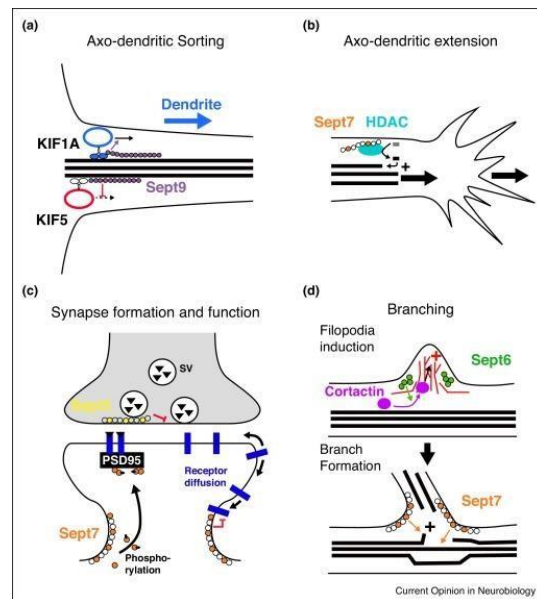


Figura 4 - Mecanismos moleculares das Septina nos neurônios. A) SEPT9 está depositada nos microtúbulos dendríticos proximais, que interagem com o motor KIF1A para facilitar seu movimento em direção aos dendritos. B) Septina 7 suporta alongamento axodendrítico e crescimento de microtúbulos que poderia facilitar também a desacetilação de microtúbulos. C) A SEPT5, quando está presente na zona ativa, pode impedir que as vesículas sinápticas (SVs) se acoplem à membrana. D) O recrutamento da SEPT6 estabiliza a cortactina para a formação de filopódios, segundos depois acontece a acumulação de SEPT7.

O desenvolvimento e a função do sistema excretor, do trato gastrointestinal e do sistema respiratório dependem do bom funcionamento das células epiteliais, o que requer a localização bem definida de canais e moléculas transportadoras na membrana. SEPT2 demonstrou ser necessária para o transporte de vesículas do Golgi para a membrana e também para a estrutura do citoesqueleto.<sup>34-35</sup> Sua remoção resulta numa forma inadequada das células epiteliais e no acúmulo de proteínas de membrana no citoplasma, já que SEPT2 e o complexo SEPT2/7/9 regulam a morfologia do cílio, que ajuda a controlar o fluxo de fluido no néfron.<sup>36-37</sup>

Uma vez que as septinas têm funções importantes em diversos órgãos do corpo humano, o comprometimento da expressão das septinas resulta em diversas doenças (Figura 5). Por exemplo, a síndrome de Bernard-Soulier, uma doença sanguínea autossômica recessiva rara, está ligada à expressão alterada de SEPT5;<sup>38</sup> SEPT2, 4, 5, 6, 9 e 11 também já foram relacionadas a diferentes tipos de leucemias,<sup>39-40</sup> distúrbios neurodegenerativos, como esquizofrenia, transtornos bipolares,<sup>41</sup> síndrome de Down,<sup>42</sup> doença de Alzheimer<sup>43</sup> e doença de Parkinson.<sup>33,44</sup> Ainda, alterações na função do sistema reprodutivo também têm sido relacionadas às septinas, particularmente a não expressão de SEPT1, 6, 7 e 12 (SEPT12 é expressa apenas nos testículos) causando infertilidade, enquanto uma super expressão das isoformas SEPT9-v1 e SEPT9-v4 de SEPT9 mostrou relação com câncer de ovário.<sup>45-47</sup>

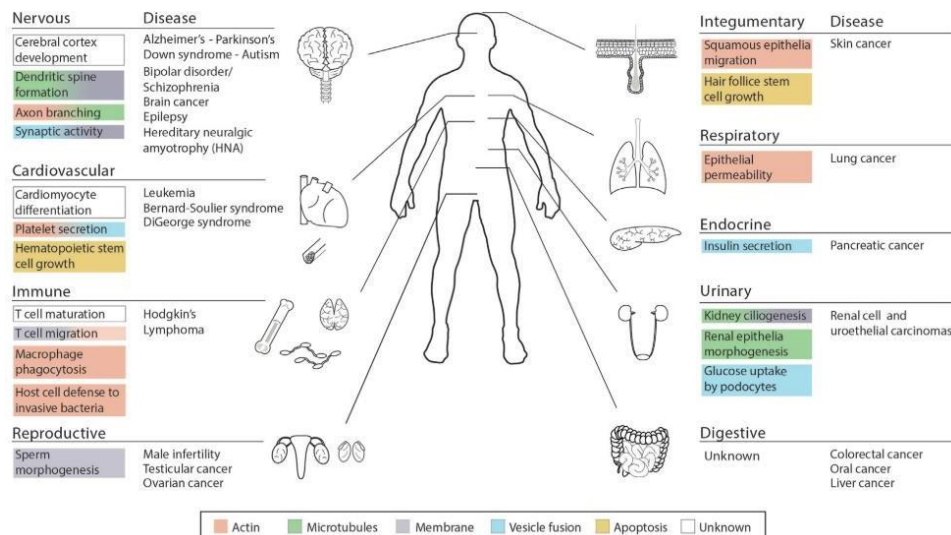


Figura 5 - Funções de septinas nos órgãos e sua conexão com doenças em humanos. A figura descreve os principais sistemas e órgãos do corpo humano que requerem septinas. Os códigos de cores indicam o envolvimento intracelular das septinas, que inclui as funções da septina na organização da actina (vermelho), microtúbulos (verde) e membranas celulares (cinza), fusão de vesículas (azul) e apoptose (amarelo). As doenças são listadas com base em evidências genéticas, histológicas, genômicas e proteômicas que implicam as septinas na patologia de vários distúrbios nos órgãos.

No câncer colorretal humano há superexpressão de SEPT4,<sup>48-49</sup> enquanto o nível de SEPT9 diminui progressivamente devido à metilação do gene. Assim, o nível de expressão de SEPT9 é usado para detectar o câncer de cólon em estágio inicial.<sup>50</sup> No sistema respiratório, SEPT2 ajuda a manter a integridade da membrana das células epiteliais sob estresse constante.<sup>51</sup>

A expressão das septinas no corpo humano pode ser de três tipos; podem-se expressar de forma ubíqua, como SEPT2, SEPT7 e SEPT9,<sup>52-54</sup> outras, como SEPT4, SEPT8, SEPT10 e SEPT11, são expressas extensivamente, mas não em todos os tecidos; e as septinas como SEPT1, SEPT3, SEPT12 e SEPT14, mostram expressão tecido-específica.<sup>55</sup>

Em relação à distribuição, as septinas estão presentes em pelo menos alguns representantes de todos os supergrupos eucarióticos, com a possível exceção de Excavata. No entanto, a estrutura, montagem e funções biológicas das septinas fora dos opistocontes (animais, fungos e seus parentes próximos) permanecem amplamente desconhecidas.<sup>56</sup> Em não opistocontes, foram encontrados genes de septinas em *Chlamydomonas reinhardtii* e *Nannochloris bacillaris* e em duas outras algas clorófitas; na alga marrom *Ectocarpus siliculosus*; e em dois ciliados, *Tetrahymena thermophila* e *Paramecium tetraurelia*<sup>57</sup> (Figura 6). Não há registro de septinas em plantas.<sup>56-57</sup>

A presença do homólogo representativo dos subgrupos SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7 no cordado não vertebrado *Ciona intestinalis* sugere que o aparecimento dos quatro subgrupos de septina descritos por Cao *et al.* (2007) ocorreu antes da divergência entre vertebrados e invertebrados. Ainda, a expansão do número de genes de septinas em vertebrados parece ter sido causada principalmente pela duplicação de genes pré-existentes, ao invés do aparecimento de um novo subgrupo de septina.<sup>52</sup> Os seres humanos têm 13 membros septina: 1-12 e 14.<sup>57-58</sup> Ortólogos da maioria das septinas humanas existem em *Danio rerio* (peixe paulistinha ou *zebrafish*), sugerindo que o conjunto de genes de septinas humanas se formou antes que peixes e vertebrados terrestres divergissem. Em mamíferos, a taxa evolutiva dentro da família de septinas varia significativamente, com as septinas humanas SEPT1, SEPT10, SEPT12 e SEPT14 mostrando uma taxa relativamente alta em comparação com outros grupos.<sup>52</sup>

Os genes que codificam proteínas do citoesqueleto de levedura têm ortólogos humanos, incluindo os genes de septinas, sendo que quatro das 13 septinas humanas (SEPT3, SEPT6, SEPT9, SEPT10) substituíram funcionalmente Cdc10 de levedura,<sup>59</sup> demonstrando o alto grau

de conservação funcional em sistemas eucarióticos em escalas de tempo evolutivas de bilhões de anos.<sup>60-61</sup>

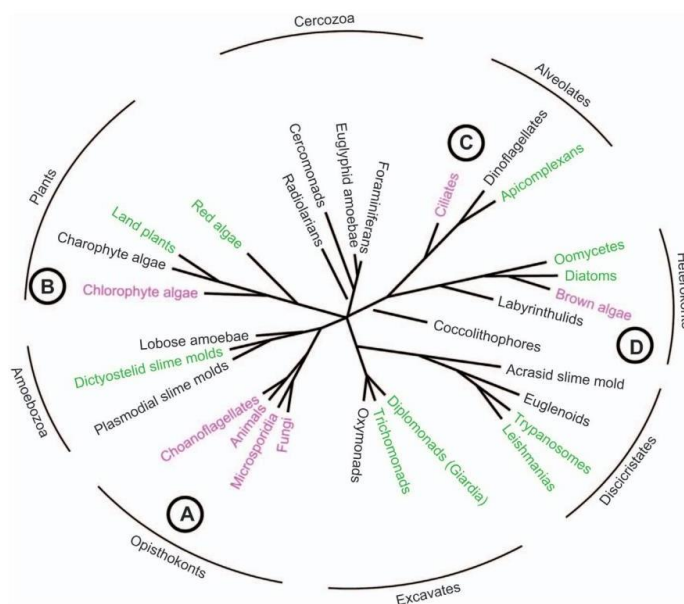


Figura 6 - Distribuição filogenética das septinas em eucariotos. Os grupos taxonômicos de cor magenta são aqueles grupos conhecidos com genes de septina; verde, grupos para os quais nenhum gene de septina foi encontrado nos bancos de dados de sequências anotadas. Os grupos em preto, são aqueles para os quais a presença ou ausência de genes de septina não pode ser determinada devido à falta de sequências de genoma completo.

Fonte: NISHIHAMA *et al.*<sup>57</sup>

### 1.3 Estrutura e características das septinas

Com a riqueza de informações estruturais de septinas humanas, tornou possível racionalizar muitos aspectos funcionais de domínios individuais e os motivos estruturais que eles contêm. Até o momento, existem 32 estruturas de septinas disponíveis no PDB, representando diferentes domínios e estados oligoméricos.<sup>62</sup>

Baseando-se nos estudos filogenéticos, as septinas são classificadas como proteínas que pertencem a família *P-loop* GTPases (*phosphate binding loop*) que incluem as *Ras-like* GTPases,<sup>63</sup> portanto, elas têm a capacidade de ligar-se a GTP e, na maioria dos casos, hidrolisá-lo. As septinas possuem três domínios estruturais, um domínio N-terminal variável (que em geral apresenta uma região polibásica PB1 que interage com as membranas); o domínio G ou domínio de ligação ao nucleotídeo, altamente conservado com um mínimo de 63 % de

similaridade entre septinas da mesma espécie. Este domínio é composto por hélices  $\alpha$  e fitas  $\beta$  separadas por *loops* flexíveis, tendo três regiões envolvidas na ligação do nucleotídeo: G1 (*Walker A motif* GxxxxGK[ST]), G3 (*Walker B motif* DxxG) e G4 (*GTP-specificity motif* NKxD) (Figura 7). Uma região importante no final do domínio G é o SUE (*septin unique element*, que será detalhado no item 1.3.2). Finalmente, o domínio C-terminal, de tamanho variável e que, frequentemente, é composto por sequências estruturadas em hélice, compatíveis com formação de *coiled-coils*. Este domínio está associado à interação septina-septina e septinas com outras proteínas (Figura 7).<sup>52,58</sup>

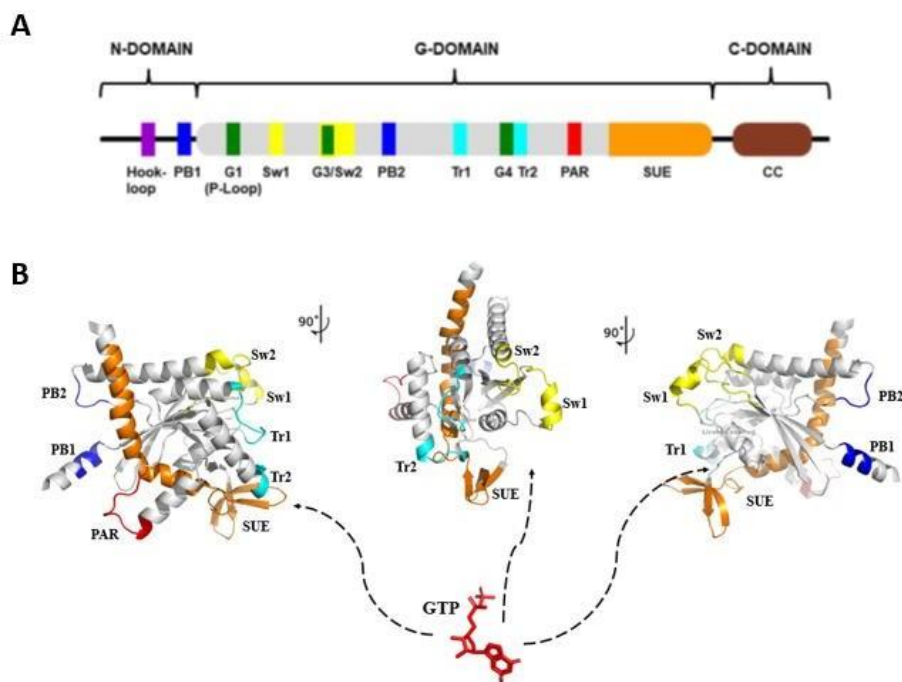


Figura 7 - Características estruturais gerais das septinas. A) Representação dos domínios das septinas. O domínio N-terminal de tamanho variável, inclui a hélice  $\alpha_0$ , contém o “Hook-loop” e a região polibásica 1 (PB1). No domínio G, destacam-se os motivos essenciais para ligação a nucleotídeos (G1, G3, G4) e os *switches* para a catálise. Outros elementos funcionais relacionados à formação da interfase são indicados, como a região polibásica 2 (PB2), a região poliácida (PAR), os *trans-loops* 1 e 2 (Tr1 e Tr2) e o *Septin Unique Element* (SUE). O domínio C-terminal contém repetições heptaméricas que formam os *Coiled-coil* (CC). B) Representação estrutural do domínio G destacando algumas de suas características, com o mesmo código de cores usado no painel A.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Kinoshita e colaboradores, em 2003, com base na similaridade sequencial dividiram as septinas em quatro grupos e sugeriram que elas podem ser substituídas por outras do mesmo grupo dentro do heterofilamento (Figura 8).<sup>64</sup> Por exemplo, no heterofilamento formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, a SEPT2 pode ser substituída por SEPT1, SEPT4 ou SEPT5,



enquanto a SEPT6 pode ser substituída por SEPT8-SEPT10-SEPT11 ou SEPT14. Já SEPT9, poderia ser substituída por SEPT3 ou SEPT12, sendo que a SEPT7, por ser a única no grupo, estaria presente em todos os heterofilamentos possíveis, podendo formar até 60 combinações diferentes de heterofilamentos. Esta hipótese foi nomeada pelo nosso grupo de pesquisa como “Regra de Kinoshita” (Figura 8).<sup>65-66</sup> Mais tarde, verificou-se que os membros do mesmo grupo de septinas não eram permutáveis dentro de complexos de septinas premontados,<sup>67</sup> os quais parecem ser estáveis.

Muitas isoformas de cada septina podem ser produzidas, devido ao processo de *splicing* alternativo e ou por modificações pós-traducionais, relacionadas à expressão tecido-específica. Outra característica importante é que a maioria das septinas têm a capacidade de hidrolisar GTP, embora os membros do grupo II (Figura 8, em azul) sejam cataliticamente inativos e ligados a GTP.<sup>68-69</sup>

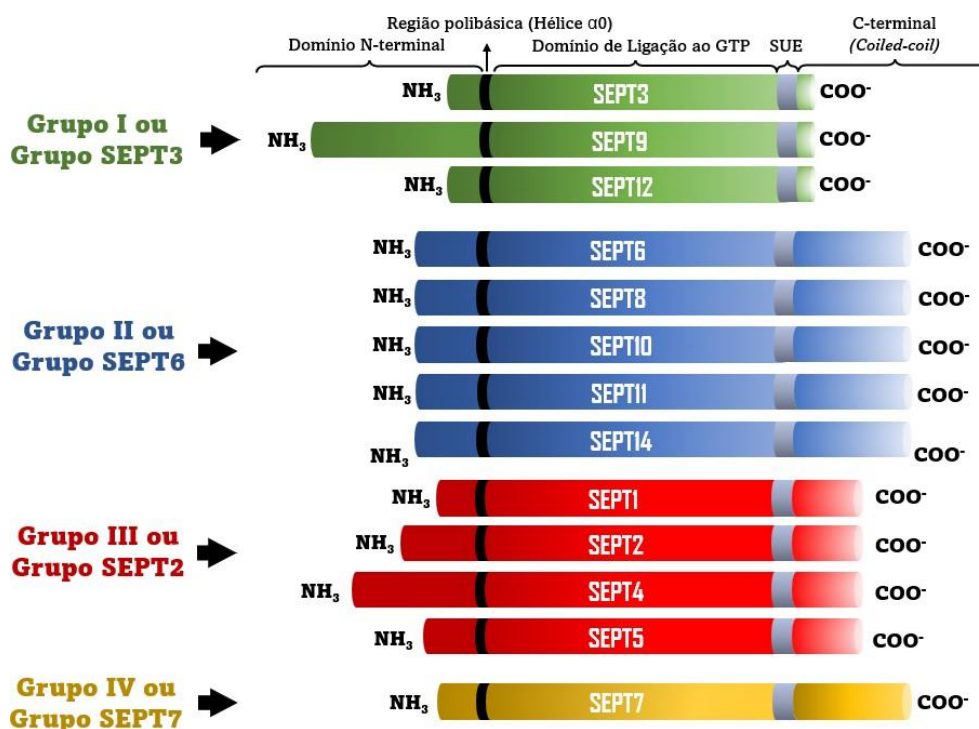


Figura 8 - Classificação das septinas humanas. A classificação das septinas foi feita pela similaridade das sequências de aminoácidos nos quatro grupos. Cada grupo foi nomeado por uma septina representante; grupo SEPT3 (grupo I), grupo SEPT6 (grupo II), grupo SEPT2 (grupo III) e grupo SEPT 7 (grupo IV). As cores representadas para cada grupo serão mantidas ao longo do texto, cor verde (SEPT3), azul (SEPT6), vermelho (SEPT2) e amarelo (SEPT7), para facilitar a identificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 1.3.1 Domínio N-terminal

O domínio N-terminal das septinas é o menos estudado em termos de estrutura e a região mais variável entre elas (Figura 9). Este domínio pode ser dividido em dois módulos: o primeiro trata-se de uma região não estruturada ou variável (IDR).<sup>70</sup> Em SEPT4 e SEPT9, por exemplo, constituem-se em N-terminais longos e estas septinas são expressas como inúmeras isoformas. No segundo módulo, a região é estruturada e mais conservada, exibindo uma  $\alpha$ -hélice ( $\alpha 0$ , precedendo o domínio G), que geralmente contém uma região polibásica (PB1), que é considerada crucial para a interação com a membrana,<sup>27</sup> embora essa interação possa ser atribuída à região C-terminal em algumas septinas.

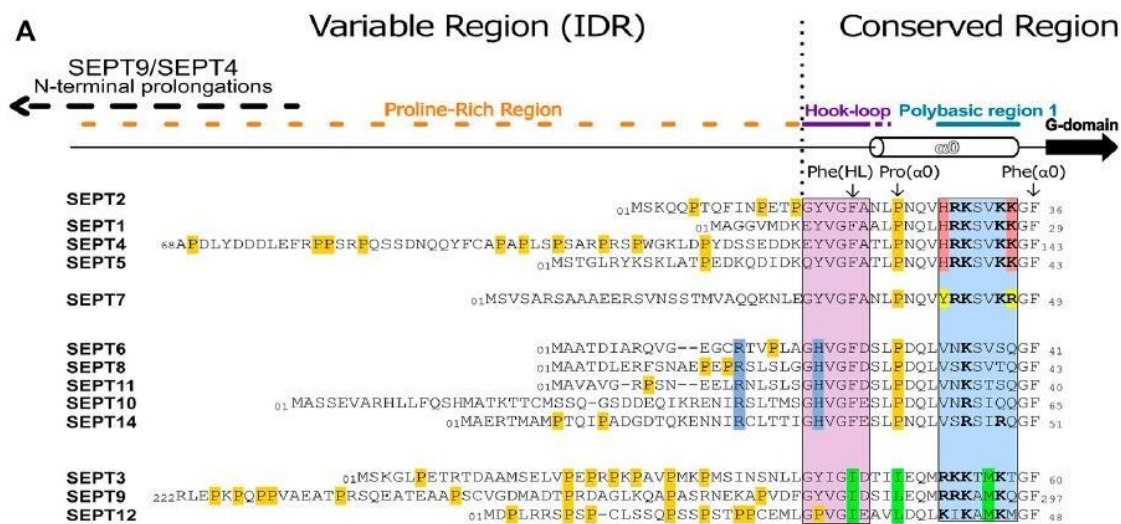


Figura 9 - Região N-terminal das septinas humanas e suas regiões estruturadas. Alinhamento de todas as sequências N-terminais humanas mostrando a região não estruturada (região variável ou região intrinsecamente desordenada, IDR) e a região estruturada (região conservada). Neste alinhamento também destacam-se resíduos conservados dentro de um grupo de septinas (também conhecidos como resíduos característicos, em suas respectivas cores), bem como resíduos de prolina (em laranja).

Fonte: CAVINI *et al.*<sup>62</sup>

Os domínios N-terminais presentes em SEPT4 e SEPT9 estão envolvidos na interação com outras proteínas como actina e microtúbulos e também estão associados a outras funções, como o tráfego de vesículas<sup>71</sup> e vias de sinalização.<sup>72-73</sup> Este domínio tem uma região rica em prolina. Algumas isoformas de septina têm uma maior afinidade por fatores de sinalização contendo domínios SH3, que são conhecidos por reconhecer esses motivos ricos em prolina. Muitos motivos regulatórios e sítios de modificações pós-traducionais também foram descritos nesta região (como motivos de acetilação, fosforilação e SUMOilação).<sup>74-76</sup> Foi sugerido que a

presença desses motivos ricos em prolina (juntamente com resíduos carregados) pode ajudar as interações da interface NC e restringir ainda mais os contatos anormais e a montagem incomum do filamento.<sup>77-80</sup>

### 1.3.2 Domínio de ligação ao GTP (domínio G)

O domínio G é o mais conservado entre as septinas e geralmente o mais longo. Seu dobramento se assemelha ao das proteínas Ras,<sup>81,82</sup> mostrando uma folha  $\beta$  central de seis fitas envolta por  $\alpha$ -hélices em um sanduíche  $\alpha\beta\alpha$ . Este domínio apresenta vários componentes estruturais (motivos) (Figura 10), descritos brevemente a seguir.

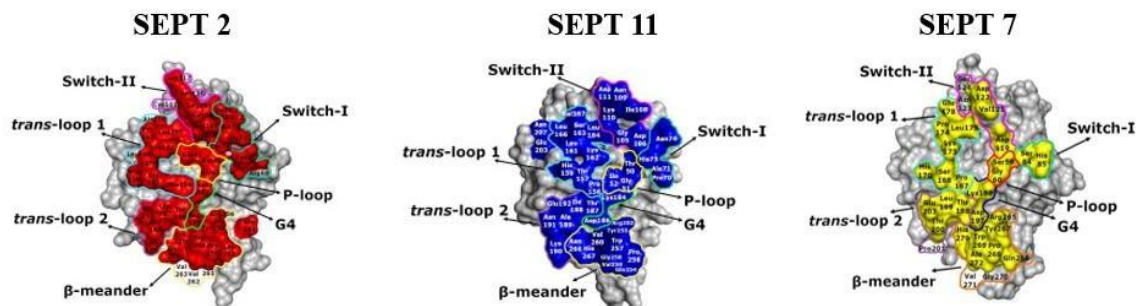


Figura 10 - Motivos de interação nas interfaces G da septinas. Sete regiões de contato principais são indicadas no lado G do monômero da septina 2, septina 11 e septina 7. Na parte superior o *switch II*; *switch I*, *trans-loops* 1 e 2, o *P-loop* e *G4* no centro, e finalmente o  $\beta$ -meandro na parte inferior.

Fonte: Adaptada de ROSA *et al.*<sup>83</sup>

O primeiro motivo é o *Switch I*, que é exposto ao solvente, e herda o nome das pequenas GTPases. A treonina do *Switch I*, Thr(Sw1), promove a conformação de hidrólise do GTP,<sup>84,85</sup> sendo esta região a menos conservada e ainda incompleta em muitas estruturas cristalográficas (Figura 11A). O *Switch II* participa do mecanismo hidrolítico e contribui para a estabilidade da interface G. Este motivo conservado contém um resíduo de glicina (GlyI(Sw2)), que se liga a  $\gamma$ -fosfato, e um resíduo de ácido aspártico (Asp(Sw2)), que coordena o íon  $Mg^{2+}$  através de uma molécula de água (Figura 11B).<sup>62,83</sup>

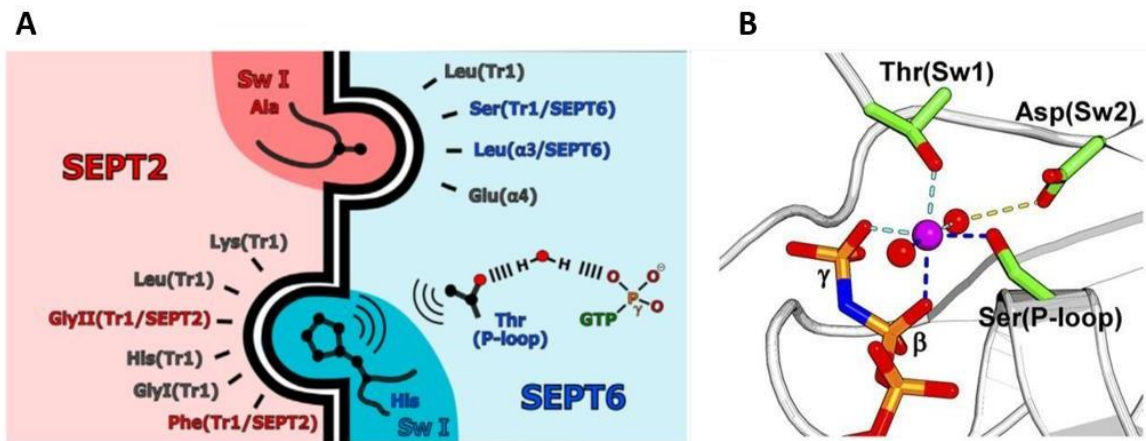


Figura 11 - Especificidades de interação na interface G das septinas. A) Esquema simplificado para a interface heterotípica destacando a importância dos resíduos provenientes do *switch* I em ambos os lados da interface. Os resíduos específicos do grupo (característicos) são mostrados coloridos, em vermelho para SEPT2 e em azul para SEPT6. A rede de interações que vai da interface ao  $\gamma$ -fosfato do GTP é mostrada. B) Coordenação de magnésio em uma septina cataliticamente ativa ligada ao análogo de GTP não hidrolisável (PDB:6MQ9).

Fonte: CAVINI *et al.*<sup>62</sup>

A região SUE (*Septin Unique Element*), uma sequência de 56 resíduos de aminoácidos conservada em diferentes espécies, é importante para a associação entre septinas,<sup>86</sup> e estende-se da interface G a NC. A presença desta região explica porque, ao contrário de outras GTPases pequenas, as septinas podem se polimerizar.

### 1.3.3 Domínio C-terminal

Os domínios C-terminais das septinas, parecem estar associados a função de agrupamento de filamentos. Os modelos sugerem que esses domínios podem formar pontes cruzadas entre filamentos vizinhos formando os complexos de ordem superior. Neste domínio se encontram sequências de aminoácidos que podem formar estruturas do tipo *coiled-coil* (CC), que se caracterizam por ter duas ou mais hélices anfipáticas que se enrolam entre si, ao redor de um centro hidrofóbico; estas hélices podem ser paralelas ou antiparalelas (Figura 12).<sup>87</sup> Os *coiled-coils* podem ser descritos também como montagens super helicoidais de duas ou mais  $\alpha$ -hélices enroladas juntas.<sup>88-89</sup>

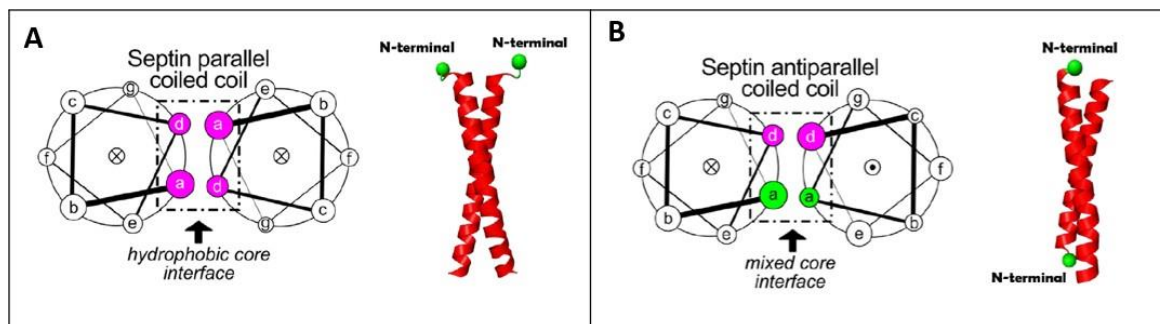


Figura 12 - Orientações dos *coiled-coils*. A) O *coiled-coil* paralelo tem os N-terminais na mesma orientação e uma mistura de aminoácidos *a* e *d* em ambas as faces. B) O *coiled-coil* antiparalelo tem os N-terminais com orientações opostas e as duas faces do núcleo hidrofóbico estão formadas por aminoácidos na mesma posição gerando a face *a* e face *d*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As regiões preditas a formarem *coiled-coils* estão presentes na maioria das septinas, mas não estão presentes no grupo SEPT3 humano ou em Cdc10 de levedura. O comprimento deste domínio pode variar de 30 resíduos, como no grupo SEPT2, a até cerca de duas vezes mais resíduos, como nos grupos de SEPT6 e de SEPT7.<sup>86,90-92</sup> Uma de suas principais funções é promover a oligomerização da proteína e as principais características das sequências enroladas diméricas são as repetições de 7 resíduos chamados *a* – *b* – *c* – *d* – *e* – *f* – *g*. As posições *a* e *d* são ocupadas por resíduos hidrofóbicos, frequentemente leucina ou isoleucina, formando o núcleo hidrofóbico. As demais posições (*b*, *c*, *e*, *f*, *g*) estão mais expostas e são ocupadas por resíduos hidrofílicos.<sup>62</sup>

Além da região da hélice envolvida na formação dos *coiled-coil*, o C-terminal pode ser dividido em duas regiões: a primeira região  $C_N$ , entre a hélice final do domínio G ( $\alpha_6$ ) e o início da predição do *coiled-coil*. Esta região é chamada também como *hinge*, que é altamente variável e flexível, permitindo assim que o *coiled-coil* tenha mais liberdade de movimento em relação ao domínio G.<sup>20,25</sup> O  $C_N$  de Shs1 (formada pelos resíduos 350-445) tem uma região que estabiliza o octâmero.<sup>92</sup> A segunda região  $C_C$ , posterior à predita como *coiled-coil*, não é estruturada em sua maior parte, mas nela já foram identificadas sequências polibásicas (K/RK/RDKxK/RKN/K e EKNKKGK) nas SEPT6 e SEPT7 respectivamente, o que poderia ajudar na interação com a membrana plasmática.<sup>29,62,79,93</sup>

## 1.4 Complexos das septinas

As septinas possuem funções fisiológicas sob a forma de heterofilamentos.<sup>15,68</sup> Para que os filamentos se formem, é necessário a presença de pelo menos um representante de cada grupo da septina e, dependendo do organismo, o heterocomplexo pode ser um tetrâmero, hexâmero ou octâmero (Figura 13).<sup>25,94-95</sup>

Alguns heterocomplexos já observados (Figura 13) incluem os de *Caenorhabditis elegans*, que possui duas septinas e que podem formar um tetrâmero.<sup>94</sup> Já em *Drosophila*, foi feito o primeiro estudo bioquímico de um hexâmero composto pelas septinas Pnut, Sep1 e Sep2<sup>1,96</sup>. Em leveduras, um octâmero foi visto contendo razões estequiométricas das septinas Cdc3, Cdc10 e Cdc12, com níveis subestequiométricos de Cdc11 e Shs1, as quais competem pela posição terminal do octâmero.<sup>97-99</sup> Em humanos, as septinas podem formar hexâmeros ou octâmeros, tendo este último complexo sido isolado de células HeLa.<sup>62,100-101</sup>

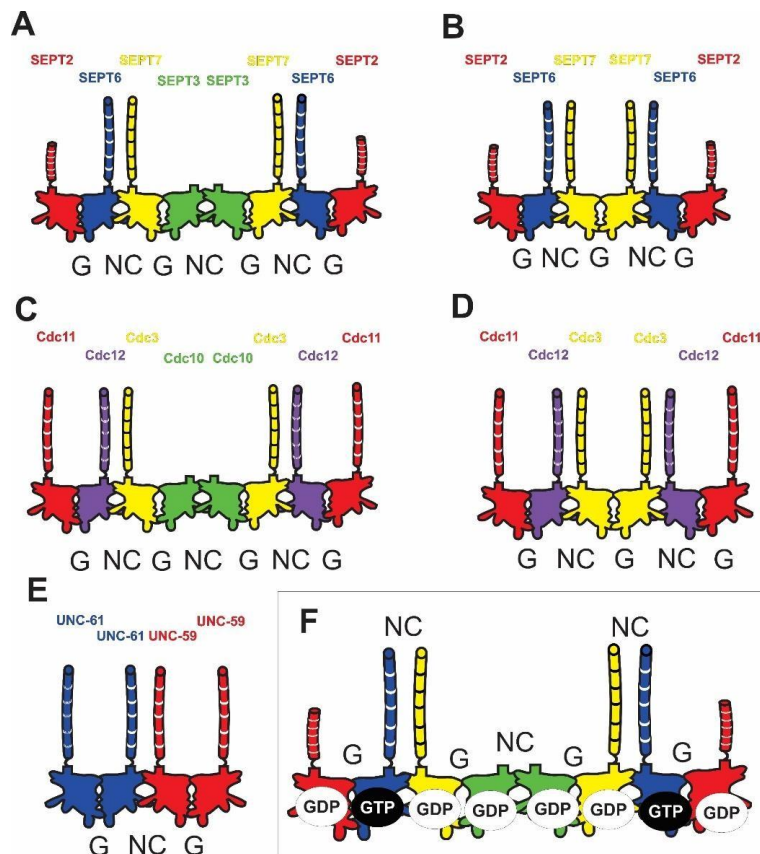


Figura 13 - Elementos estruturais do heterocomplexo de septinas. A) Octâmero humano. B) Hexâmero humano. C) Octâmero de *S. Cerevisiae*. D) Hexâmero de *S. Cerevisiae*. E) Tetrâmero de *C. elegans*. F) Octâmero humano destacando as interfaces G (sítio de ligação ao nucleotídeo) e NC (domínios N-terminal e C-terminal), bem como os nucleotídeos ligados a cada proteína.

Foi observado que complexos formados por SEPT2, SEPT6 e SEPT7 podiam formar filamentos de aproximadamente 7-9 nm de espessura.<sup>97</sup> Ainda, Sheffield e colaboradores verificaram que as mesmas septinas formavam heterotrímeros ou pares de heterodímeros.<sup>102</sup> Um pouco mais tarde, Sirajuddin e colaboradores, em 2007, resolveram a primeira estrutura de uma septina e do complexo hexamérico formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7<sup>25</sup>. A estrutura foi obtida a uma resolução de 4 Å<sup>25</sup> e permitiu observar quatro características principais: 1) um hexâmero era a unidade de polimerização; 2) as septinas tinham uma ordem específica para cada subunidade, onde a SEPT2 interagia com a SEPT6 e esta com SEPT7; 3) existiam 4 interfaces de interação entre cada subunidade; e 4) havia a presença de nucleotídeos endógenos (mesmo que durante a expressão e purificação da proteína não fosse adicionado excesso de nucleotídeo). Esses complexos de septinas foram mostrados formar filamentos os quais interagem para gerar anéis, redes, gaiolas e outras estruturas (Figura 14).<sup>15,103</sup>

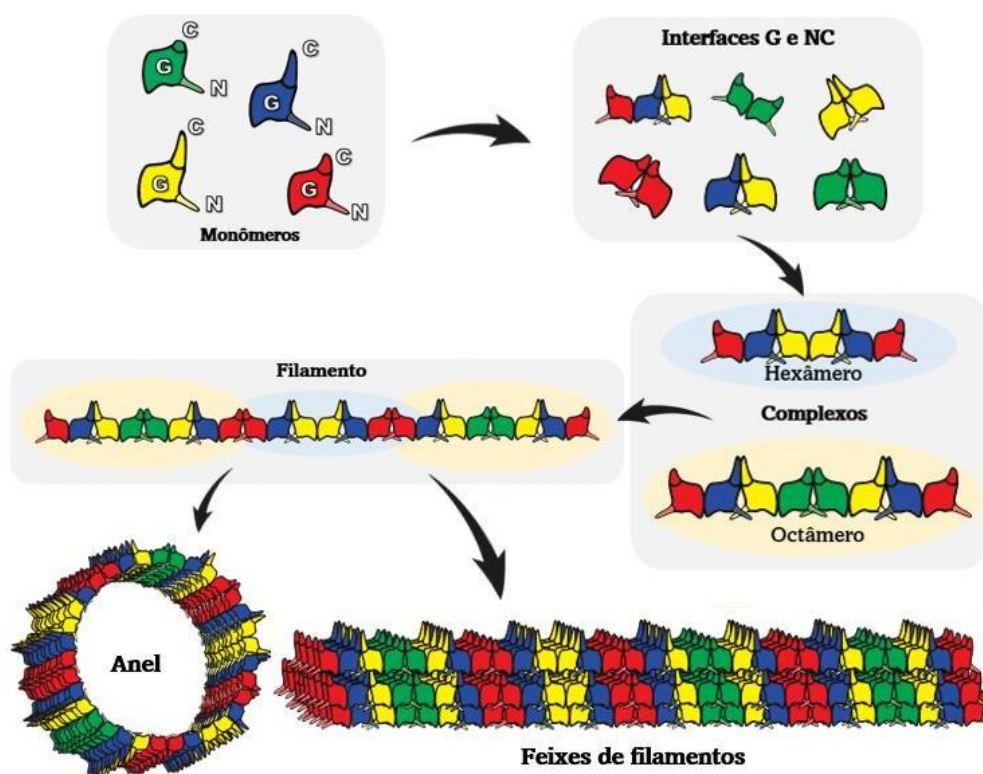


Figura 14 - Representação das diferentes formas que as septinas podem se formar. Os grupos de cada septina estão representados de cores diferentes. O grupo da SEPT9 está representado de cor verde, o grupo da SEPT6 de cor azul, o grupo da SEPT2 de cor vermelho e a SEPT7 de cor amarelo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da estrutura do hexâmero, ficou estabelecido que SEPT2 ocupava o centro do complexo.<sup>25</sup> Porém, recentemente, a posição de SEPT2 foi revisada por nosso grupo e, na verdade, esta septina situa-se na extremidade do oligômero.<sup>20,104</sup> Assim, o complexo hexamérico de septinas de mamífero mostrou ter simetria especular, resultando em um “bastão” não polar com a seguinte ordem: SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2 (Figura 15).<sup>25,104</sup> Esta correção das posições de cada septina deixa claro a importância da interface NC para o crescimento longitudinal do heterofilamento.

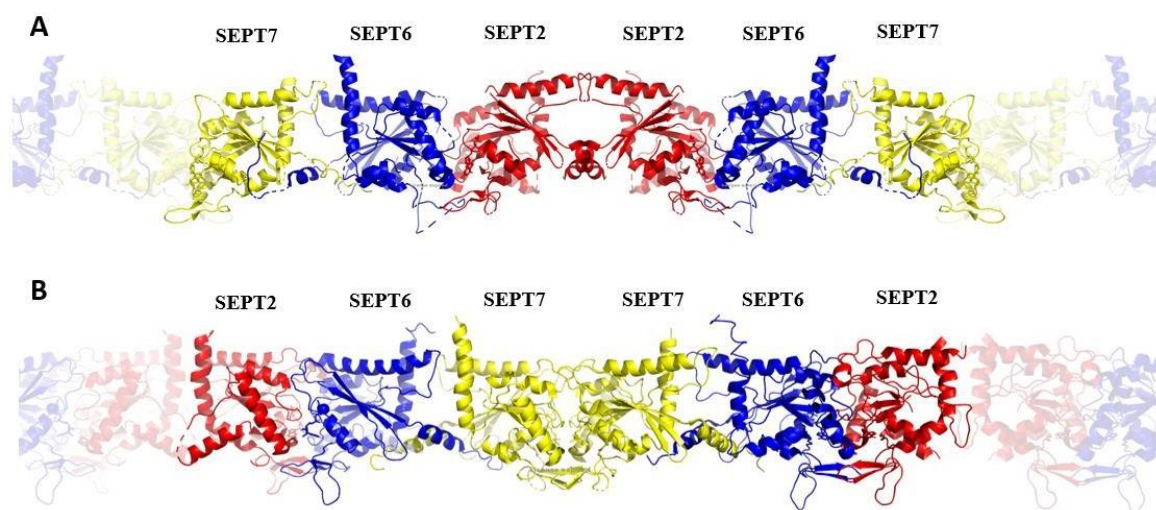


Figura 15 - Reordenamento das posições das septinas no hexâmero. A) Primeira estrutura cristalográfica resolvida do hexâmero humano, posicionando a septina 2 no centro da estrutura (PDB 2QAG). B) Correção da posição das septinas no hexâmero, colocando a septina 2 na ponta e a septina 7 no centro da estrutura (PDB 7M6J). A continuidade do filamento pelo acréscimo de outros oligômeros está representada sombreada nas extremidades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar nas estruturas, que os heterofilamentos tem dois tipos de interfaces, que são as que mantêm a estabilidade do oligômero: a interface G, que é formada pela região do sítio de ligação ao nucleotídeo e a interface NC, formada pelos N- e C-terminais do domínio G. As septinas SEPT2 e SEPT6 possuem interface G heterotípica, enquanto, entre duas subunidades de SEPT7 há uma interface G homotípica. Do mesmo modo, observa-se uma interface NC heterotípica entre SEPT6 e SEPT7 (Figura 15). Na formação de um filamento, uma interface NC homotípica é formada entre duas SEPT2. Outros dados mostram que a presença de septinas do grupo I (SEPT9) permite a formação de um octâmero como unidade de polimerização,<sup>100</sup> com esta septina ocupando o centro do octâmero e formando uma interface NC homotípica SEPT9-SEPT9 e uma interface G heterotípica entre SEPT9 e SEPT7.



Estudos já mostraram que as septinas podem formar também homofilamentos, porém estes foram observados em cristais, a partir da estrutura cristalográfica do domínio G da SEPT2 e de outras septinas produzidas individualmente.<sup>25,28,105-107</sup> Além disso, SEPT2, SEPT3 e SEPT4 foram capazes também de formar homofilamentos, caracterizados como amiloides (20 - 50 nm de espessura)<sup>106,108-109</sup> *in vitro*.



## 2 MOTIVAÇÃO

As septinas humanas fazem parte de uma família de proteínas com funções fisiológicas desempenhadas na forma de heterofilamentos.<sup>15,68</sup> Os estudos mostram que a interação entre as subunidades de septinas é realizada pelas interfaces G e NC.<sup>62</sup> Embora o domínio G tenha se mostrado suficiente para a formação dos heterocomplexos e sua polimerização, regiões além desse domínio pode ser determinantes para a escolha das septinas parceiras nos complexos.

Há poucos trabalhos na literatura sobre a troca de regiões de septinas. Assim, septinas humanas quiméricas foram planejadas e construídas, nas quais o C-terminal de SEPT7 (SEPT7C) foi transferido para o domínio G da SEPT9 (SEPT9G). A ideia central foi centrada na avaliação da importância dos C-terminais, particularmente da região envolvida na formação de *coiled-coils*, na escolha de septinas parceiras e na consequente montagem dos oligômeros.



### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho constituiu-se em avaliar a importância da região C-terminal da septina 7 humana na seleção de parceiros para interação septina-septina, via interface NC, para a composição dos heterocomplexos. Fundamentado neste, o estudo baseou-se no complexo canônico (SEPT2-SEPT6-SEPT7), através da produção do complexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C, tendo sido delineados os seguintes objetivos específicos:

- Planejar e produzir as construções quiméricas SEPT9G/7C (sem *hinge*) e SEPT9G/h7C (com *hinge*)
- Co-expressar e co-purificar o complexo humano SEPT2G-SEPT6 com SEPT9G, a ser utilizado como controle negativo da interação;
- Co-expressar e co-purificar os complexos humanos quiméricos SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C e SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C
- Caracterizar a proteína e complexos quiméricos: avaliação das massas por cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS) e avaliação do teor de nucleotídeo.
- Analisar os complexos quiméricos utilizando microscopia eletrônica de transmissão.
- Realizar modelagem utilizando AlphaFold para prever a estrutura da quimera SEPT9G/h7C.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Clonagem e construção dos sistemas de expressão

#### 4.1.1 Linhagens bacterianas, vetores e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas diferentes linhagens bacterianas. A linhagem DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* foi utilizada para fins de propagação de DNA plasmidial e clonagem, uma vez que as mutações específicas (*recA1* e *endA1*) tornam a linhagem adequada a tais procedimentos. A linhagem escolhida para expressão das proteínas heterólogas foi a *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen), pois esta fornece tRNAs para seis códons raros em *E. coli*, permitindo a tradução “universal” de proteínas. Esta linhagem possui uma marca de seleção para o antibiótico cloranfenicol (34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Além disso, também possui o lisogênico  $\lambda\text{DE3}$  e, portanto, carrega uma cópia cromossômica do gene da RNA polimerase T7, sob o controle do promotor *lacUV5*. *E. coli* Rosetta (DE3) é adequada para a produção de proteínas a partir de genes alvo clonados em vetores pET e similares que se utilizam de promotores derivados do fago T7. As células competentes de *E. coli* de ambas linhagens foram previamente preparadas e estocadas a -80 °C, sendo cultivadas conforme demanda em meio *Lysogenic Broth* (LB) da Sigma, a 37 °C e 250 rpm.

Os vetores do tipo Duet (Novagen) em geral têm dois promotores T7lac, duas regiões com múltiplos sítios de clonagem (MCS) e um único terminador T7, para clonagem e expressão de duas sequências de DNA codificantes (CDS) alvo. Os plasmídeos também carregam o gene *lacI* para assegurar a expressão de repressor lac suficiente para controlar a expressão basal. Os plasmídeos pETDuet e pRSFDuet (Novagen) foram projetados para a co-expressão de dois genes-alvo cada, cujas diferenças essenciais consistem na origem de replicação e na marca de seleção, o que possibilita a transformação dos dois plasmídeos na mesma célula e a coexpressão de até quatro proteínas diferentes.

#### 4.1.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular

Os kits de extração de DNA plasmidial foram adquiridos da Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)). As enzimas de restrição e DNA polimerase foram adquiridas da

Fermentas-Thermo Scientific. Os antibióticos utilizados, ampicilina, canamicina e cloranfenicol foram adquiridos da Sigma.

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica ou superior. Técnicas de biologia molecular foram realizadas por métodos padronizados,<sup>110</sup> ou como detalhadas ao longo do trabalho.

#### **4.1.3 Construção da proteína quimérica**

O DNA codificante da proteína quimérica SEPT9G/7C foi sintetizado comercialmente. A empresa BIOMATIK (<https://www.biomatik.com/>) sintetizou o gene no vetor pETDuet-1 flanqueado pelos sítios de restrição específicos *EcoRI* e *HindIII*. O gene sintético foi otimizado para expressão em *E. coli*. Rosetta (DE3). A sequência da quimera é mostrada na Figura A1 do Apêndice.

#### **4.1.4 Construções presentes no banco de plasmídeos**

Nosso grupo de pesquisa, a partir de uma biblioteca comercial de cDNA de cérebro fetal humano, já produziu diversas construções integrais e truncadas das septinas humanas previamente, que estão disponíveis em vetores de expressão para outros membros do grupo. Sendo assim, tais construções foram utilizadas nesse trabalho como molde específico para as construções dos complexos (Tabela 1 e Figura A2 do Apêndice). As sequências de DNA utilizadas neste trabalho estão depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com os seguintes códigos de acesso NM\_001008491.1 para SEPT2, NM\_015129.5 para SEPT6, NM\_001788.3 para SEPT7 e NM\_006640.2 para SEPT9.



Tabela 1 - Construções para expressão de septinas humanas, armazenadas no banco de plasmídeos do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutura do IFSC e utilizadas neste trabalho.

Nome do clone	Código UNIPROT	Vetor	Sítios de clonagem	Tamanho (pb)	Coordenadas da sequência de aa
SEPT2G	Q15019	pRSF-Duet	NdeI/XhoI	1086	35 - 308
SEPT6NGC	Q14141-2	pRSF-Duet	NcoI/SalI	1283	1 - 427
SEPT9G $\alpha$ 0	Q9UHD8-2	pET28a	NdeI/XhoI	1707	262 - 568
SEPT7NGC	Q16181	pETDuet	BamHI/PstI	1257	20 - 437

Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.1.5 Construção da quimera com *hinge* (SEPT9G/h7C)

Para a inserção do *hinge*, correspondente a 18 aminoácidos adicionais (Apêndice 3) na construção da quimera sintética, foram amplificadas as regiões do inserto e do vetor por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), para construir a nova quimera, denominada SEPT9G/h7C.

Para a amplificação do inserto, utilizou-se como molde a construção presente no clone pETDuet-SEPT7NGC (banco de plasmídeos do grupo) e os *primers Fwd\_SEPT9ins* e *Rev\_SEPT9ins* (Tabela 2). Para a amplificação do vetor, o gene sintético SEPT9G/h7C foi utilizado como molde, utilizando os *primers Fwd\_pETDuet* e *Rev\_pETDuet* (Tabela 2).

Tabela 2 - Lista de primers específicos usado para a amplificação do inserto e o vetor para a construção da quimera SEPT9G/h7C.

Primer	Sequência	TM	Tamanho
<i>Fwd_SEPT9ins</i>	5' CGCCTGAATGAAGGTAGCAGCACTTATAATGGAGT TGATAACAACAAG 3'	55 °C	48 pb
<i>Rev_SEPT9ins</i>	5' TAAGCATTATGCGGCCGC 3'	58 °C	18 pb
<i>Fwd_pETDuet</i>	5' GCGGCCGCATAATGCTTAAG 3'	61 °C	20 pb
<i>Rev_pETDuet</i>	5' GCTGCTACCTTCATTCAGGCG 3'	60 °C	21 pb

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.5.1 *Gibson Assembly* para a inserção do *hinge* na quimera SEPT9G/7C

*Gibson Assembly* é uma técnica que une eficientemente vários fragmentos de DNA sobrepostos em uma reação *in vitro*. O *Gibson Assembly Master Mix* inclui três enzimas diferentes que são utilizadas em um único tampão: 1) uma exonuclease, que cria saliências 3' de fita simples que facilitam a hibridação de fragmentos que compartilham complementaridade em uma extremidade (a região de sobreposição); 2) uma DNA polimerase, que preenche as lacunas dentro de cada fragmento; 3) uma DNA ligase que sela os cortes no DNA remontado.

Para a reação de inserção do *hinge* na quimera SEPT9G/7C, foi realizado o *Gibson Assembly* utilizando: 50 ng dos DNAs amplificados de vetor e de inserto, *HiFi PCR MasterMix* (Takara) e demais reagentes detalhados na Tabela 3.

Feito o mix para a amplificação, este foi colocado no termociclador e os demais detalhes do ciclo de amplificação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3 - Reagentes, e quantidades deles mesmos, utilizados na reação de amplificação.

Reagente	Quantidade
DNA molde	50 ng
<i>Primer Fwd</i> 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
<i>Primer Rev</i> 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
CloneAmp <sup>TM</sup> HiFi PCR MasterMix (Takara) 2X	25 $\mu$ L
Água Mili-Q	<i>q.s.q</i> 50 $\mu$ L
Volume Final	50 $\mu$ L

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação com a descrição das etapas, temperaturas adotadas, tempo de duração de cada etapa e número de ciclos empregados.

<b>Etapa da PCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Repetição</b>
Desnaturação inicial	98 °C	1 min	1X
Desnaturação	98 °C	10 seg	
Hibridização	56 °C (para o inserto)	15 seg	30X
	60 °C (para o vector)		
Extensão	72 °C	4 min	
Extensão Final	72 °C	7 min	1X
	4 °C	∞	1X

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, foi verificada a pureza e o rendimento dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando-se o *kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Aos fragmentos purificados adicionou-se 1 ul de *DpnI* (NEB) para cada amplificado, incubando-os por 1 h, a 37 °C, para digestão do DNA metilado. Uma nova purificação das bandas de interesse foi realizada em gel de agarose 0,8% após a digestão. Foi feita a quantificação do DNA purificado e calculado o número de nanogramas necessários do vetor e do inserto para prosseguir com a reação, segundo a Tabela 5.

Tabela 5 - Quantidade recomendada de fragmentos utilizados para montagem de Gibson.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Vector amplificado	100 ng
Inserto na proporção: 1 vetor: 3 inserto	$massa = \frac{inserto(pb)}{vetor(pb)} \times 100ng \times 3$
Mix Gibson	5 µL
H2O	<i>q.s.q</i> 10 µL
Volume Final	10 µL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após da reação de Gibson, o produto foi usado para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes (produzidas por meio do tratamento com Cloreto de Cálcio).<sup>111</sup> As células foram espalhadas em uma placa Petri contendo meio LB sólido e 30  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, por 16 horas. As colônias crescidas (clones positivos) foram repicadas em 5 mL de meio LB contendo 30  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina. Após o crescimento, por 12 horas, a 37 °C, sob agitação constante de 250 rpm, o DNA plasmidial destas células foi extraído utilizando-se o *kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

Os DNAs foram submetidos à análise de restrição com as enzimas *EcoRI Fast Digest* e *HindIII Fast Digest* (Thermo Scientific), seguindo os protocolos do fabricante. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 0,8% e os clones positivos confirmados foram sequenciados pelo método de Sanger,<sup>112</sup> no sequenciador automático 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). A sequência obtida foi analisada com o auxílio das ferramentas bioinformáticas *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), *SnapGene 6.1* e *Traslate-Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>).

#### **4.2 Expressão heteróloga dos heterocomplexos**

Os vetores de expressão contendo os CDSs das quimeras (SEPT9G/h7C ou SEPT9G/7C) e o vetor carregando os CDSs correspondentes a SEPT2G e SEPT6 foram utilizados, separadamente, na transformação de células de *E. coli* Rosetta (DE3) competentes por tratamento com cloreto de cálcio. Após a transformação, as células hospedando cada vetor foram inoculadas em placas de Petri em meio LB sólido seletivo (suplementado com 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina e 34  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol para qualquer das quimeras; ou, 34  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol e 30  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina para o vetor de expressão das demais septinas). Ambas as culturas foram incubadas por 16h, a 37 °C.

A seguir, células transformadas de cada construção foram independentemente inoculadas em 20 mL de meio LB, contendo os antibióticos de seleção adequados. As culturas foram incubadas por 12h, a 37 °C, sob agitação a 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo da quimera foi diluído para o volume final de 600 mL e o pré-inóculo de SEPT2G e SEPT6 para um volume final de 1800 mL em meio *Terrific Broth* (23,6 g/L de extrato de levedura, 11,8 g/L de triptona, 9,4 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 4ml/L de glicerol), todos contendo os antibióticos de seleção. As culturas foram crescidas a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir

uma densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) entre 0,6 e 0,8. Atingida a  $DO$ , a expressão das proteínas de interesse foi induzida com 0,3 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), por 16h, a 18 °C, sob agitação de 200 rpm.

Ao final do período de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 4500 g por 40 min, a 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos em tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl e 5 % [v/v] de glicerol) e as células contendo as construções relativas à expressão de uma das quimeras com SEPT2G-SEPT6 foram misturadas. A seguir, as suspensões foram submetidas à lise por pulsos de ultrassom sob banho de gelo durante 7,5 min, sendo 20,0 s *pulse on* e 30,0 s *pulse off*, a 25% de amplitude (*Fisher Scientific – Sonic Dismembrator Model 500*). As frações solúveis foram separadas das insolúveis por duas centrifugações sucessivas a 13000 g, por 30 min, a 4 °C, e transferidas a um novo tubo para prosseguir com a purificação dos complexos.

### **4.3 Purificação e preparação das amostras**

#### **4.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade**

A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, que foi possível pela presença de uma cauda de seis histidinas, a His-tag, no N-terminal das quimeras (SEPT9G/7C ou SEPT9G/h7C) e também no domínio G de SEPT9, usado como controle negativo da interação (SEPT9GC $\alpha$ 0). A construção co-expressando SEPT2G e SEPT6 foi produzida sem His-tag, de modo que a copurificação dos complexos só é possível se houver interação do heterodímero (SEPT2G-SEP6NGC) com a proteína com His-tag.

A coluna foi empacotada utilizando-se 3 mL de resina de níquel (His60 Ni *Superflow Resin*, obtida da TAKARA), em seguida foi lavada com água Mili-Q e pré-equilibrada com 10 vol. do tampão A. A fração solúvel do extrato foi então aplicada na coluna de afinidade, seguida de uma primeira lavagem com 10 vol. de tampão A; uma segunda lavagem com 10 vol. de tampão A acrescido 0,1% [v/v] de Triton X-100; uma terceira lavagem com 20 mL de tampão A acrescido com 20 mM de imidazol (para remover os contaminantes de baixa afinidade). Finalmente, a eluição do complexo foi realizada com 5 mL de tampão A, contendo 500 mM de imidazol. Esta etapa foi repetida duas vezes para garantir a total eluição das proteínas imobilizadas na resina.

Na etapa de eluição, alíquotas de 1 mL foram coletadas e a concentração da proteína foi estimada pela medida da absorbância em 280 nm, com o auxílio do coeficiente de extinção molar. Este valor foi obtido após a análise da sequência de aminoácidos das proteínas na ferramenta bioinformática *ProtParam Tool*.

#### 4.3.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Numa segunda etapa do processo de purificação, os complexos foram submetidos à cromatografia de exclusão por tamanho ou exclusão molecular (SEC, do inglês *size exclusion chromatography*). A coluna Superdex 200 *Increase* 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) foi pré-equilibrada com o tampão A e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (GE Healthcare Life Sciences).

Amostras de cada complexo, provenientes da cromatografia de afinidade, foram concentradas até um volume de 500 µL e injetadas na coluna Superdex 200 *Increase* 10/300 GL. A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 0,5 mL/min e a eluição das frações de interesse foi monitorada pela medida da absorbância a 280 nm. Todas as frações de interesse foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80 °C e a integridade das amostras analisadas em SDS-PAGE 12%.

Particularmente para o complexo contendo a quimera SEPT9G/h7C, amostra eluídas da purificação por SEC, foram aplicadas numa coluna Superose 6 *Increase* 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), pré-equilibrada com o tampão A e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (GE Healthcare Life Sciences). Alternativamente, amostras do complexo provenientes da cromatografia de afinidade foram concentradas até um volume de 500 µL e injetadas diretamente na coluna Superose 6 *Increase* 10/300 GL, seguindo com os mesmos parâmetros e passos que já foram descritas anteriormente.

#### 4.3.3 *Desalting* e troca iônica

Com o objetivo de eliminar contaminantes, o complexo contendo a quimera SEPT9G/7C, após da purificação por SEC, foi submetido a uma cromatografia de *desalting*, seguida de uma troca iônica.

A cromatografia de *Desalting* foi feita na coluna *HiTrap Desalting* de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) foi pré-equilibrada com o tampão B (50mN Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 5% [v/v] glicerol) e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (GE Healthcare Life Sciences). Dez mililitros da amostrado complexo, eluídos da coluna de afinidade, foram injetados na *HiTrap Desalting* e acromatografia foi realizada sob um fluxo de 2 mL/min. A eluição das frações de interesse foi monitorada pela medida da absorbância a 280 nm.

Após da troca de tampão, a cromatografia de troca iônica, foi feita numa coluna RESOURCE™ Q 1 mL (GE HealthcareLife Sciences) com o tampão C (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0.5 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 5% [v/v] de glicerol) e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (GE Healthcare LifeSciences). Amostras do complexo após *desalting* (volume 10 mL) foram injetadas na coluna e as cromatografias foram realizadas sob um fluxo de 2 mL/min, num gradiente de sal sendo a concentração final 0.5 M NaCl. A eluição das frações de interesse foi monitorada pela medida da absorbância a 280 nm. Após a troca iônica, as frações eluídas contendo o complexo foram submetidas a uma nova cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex 200 *Increase* 10/300 GL, nas mesmas condições já descritas no item 4.3.2. Todas as frações de interesse foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80 °C e a integridade das amostras analisadas em SDS-PAGE 12%.

#### **4.4 Caracterização biofísica dos produtos**

##### **4.4.1 Avaliação da massa molecular aparente e estado oligomérico**

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) separa moléculas de acordo com o seu volume hidrodinâmico, permitindo calcular a massa molecular. No entanto, é imprecisa para calcular a massa de proteínas não globulares. As septinas caracterizam-se por formar oligômeros e filamentos, os quais podem crescer ao longo de um único eixo, gerando estruturas em formato alongado ou de bastão (não globulares). Por esse motivo, optou-se por usar a técnica de SEC-MALS, que é uma SEC acoplada à análise da dispersão de luz em vários ângulos (MALS, do inglês *multi angles light scattering*). Esta permite a determinação da massa molecular absoluta das moléculas em solução, e por consequência, seu estado oligomérico.

As frações eluídas da SEC referentes ao complexo foram concentradas até ~ 1 mg/mL, em um volume de 50 µL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 10 min, a 4 °C, e injetadas numa coluna de exclusão molecular Superdex 200 *Increase* 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), pré-equilibrada com tampão D (25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>). A coluna foi acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) *Waters*

600 Controler (Wyatt Technology), um detector de espalhamento *mini DAWN TREOS* (Wyatt Technology) com a capacidade de detecção em três ângulos (43,6°, 90,0° e 136,4°), e o refratômetro *OptiLab T-rEX* (Wyatt Technology) que determina o índice de refração diferencial (dRI). O acoplamento deste sistema permite determinar a distribuição de massa, tamanho e composição da amostra. A cromatografia foi realizada sob um fluxo contínuo de 0,5mL/min. O estado oligomérico e a polidispersividade da amostra foram determinados pelo processamento dos dados utilizando *software ASTRA7* (Wyatt Technology), fornecido pelo próprio equipamento, sendo as leituras acompanhadas em tempo real.

#### 4.4.2 Análise do teor de nucleotídeo da quimera SEPT9G/h7C

A proteína SEPT9G/h7C foi expressa sozinha e a seguir purificada por cromatografia de afinidade, seguindo a metodologia descrita nos itens 4.2 e 4.3.1. Amostras eluídas da cromatografia de afinidade foram submetidas à SEC, seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2. As frações de interesse foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80 °C e sua integridade analisadas em SDS-PAGE 12%. A determinação da massa molecular da SEPT9G/h7C em solução foi analisada por SEC-MALS, utilizando as frações de eluição da SEC, tratadas seguindo a metodologia descrita no item 4.4.1.

Para análise do teor de nucleotídeo, SEPT9G/h7C purificada foi diluída com água Milli-Q, para que a concentração de sal fosse reduzida a 100 mM de NaCl e a concentração de de proteína a 20 µM. A amostra foi fervida por 10 min., para a desnaturação proteica e liberação do nucleotídeo. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 min, a 4 °C, 16.000 g e aplicada numa coluna *Protein Pack DEAE 5 PW*, 10 µm, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters), num sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), acoplada ao cromatógrafo *Alliance 2695*. Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão E (25 mM Tris-HCl pH 8,0) para equilibrar a coluna e tampão F (25 mM Tris-HCl pH 8,0 com NaCl 1M), com o objetivo de criar um gradiente de NaCl. O fluxo utilizado foi de 1mL/min, a 25 °C e a eluição dos nucleotídeos foi monitorada pela absorvância em 253 nm. Mais detalhes sobre este método podem ser obtidos em Hillebrand *et al*, 2005.<sup>113</sup>



#### 4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As soluções dos complexos proteicos de 0,5 a 1,0 mg/mL em tampão A, foram diluídas no mesmo tampão para concentrações de 0,02 a 0,05 mg/mL. A superfície de grades de cobre cobertas por um filme de carbono *Ultrathin* (PELCO) foram carregadas negativamente com *easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System* (PELCO, USA) para melhor interação da amostra com o carbono. Foram depositados 3 µL de amostra proteica durante 1 min., seguido por uma lavagem com 3 µL de água. Em seguida, a grade foi coberta por 3 µL de acetato de uranila 2%, uma a duas vezes, para proporcionar contraste da amostra. O excesso de cada solução aplicada foi retirado com papel filtro.

As amostras foram então analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. A aquisição dos dados foi realizada nas instalações do Instituto de Química São Carlos (IQSC), na Universidade de São Paulo, utilizando o microscópio JEOL-2100 (JEOL), operando a 200 kV, em condição próxima ao foco (~1 µm desfocado) com ampliação de 40,000 a 60,000 vezes. As imagens obtidas foram analisadas no *software ImageJ* (NIH, EUA).

#### 4.6 Modelamento da estrutura do complexo

A predição da estrutura da quimera foi realizada com o *ColabFold*, uma extensão *online* do algoritmo *AlphaFold2*, mais especificamente com o *notebook AlphaFold2\_mmseqs2*.<sup>114-115</sup> O alinhamento múltiplo de sequências (MSA, do inglês *Multiple Sequence Alignment*) foi gerado através do método de busca *MMseqs2*. As modelagens não fizeram o uso explícito de estruturas do PDB (*template\_mode=none*). O campo de força *AMBER* foi usado na relaxação dos modelos. As sequências a serem modeladas foram submetidos no *query\_sequence* com os seguintes parâmetros de entrada: *msa\_mode=MMseqs2 (UniRef+Eviromental)*, *pair\_mode=unpaired+paired*, *model\_type=automatic*, e *num\_recycles=12*. Por volta de 2000 sequências foram selecionadas no MSA, obtendo-se ao final cinco modelos. A qualidade das estruturas de proteínas tridimensionais modeladas foi avaliada pelos parâmetros de teste de diferencia de distância local (*p1DDT*)<sup>114-115</sup> e estereoquímica por *Procheck*<sup>116</sup> e *Verify3D*.<sup>117</sup>



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Construção das proteínas quiméricas

Buscando avaliar a importância da região C-terminal na seleção de parceiros para interação septina-septina na composição de heterocomplexos, a septina quimérica foi produzida de forma que o C-terminal de SEPT7 substituísse o mesmo domínio na estrutura da SEPT9G, gerando a quimera SEPT9G/7C. As septinas humanas SEPT6 e SEPT2 são proteínas parceiras de interação, mas SEPT9 não interage naturalmente com nenhuma delas. SEPT7, por sua vez, tem seu C-terminal envolvido na interação com a SEPT6. Assim, a proteína quimérica 9G/7C foi avaliada em termos de interação com SEPT6-SEPT2, para formar um novo complexo: SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C.

Para este estudo, foram produzidas duas construções diferentes da quimera, sendo que ambas foram compostas pelo domínio G de SEPT9 (9G, incluindo a hélice  $\alpha 0$ ) e pela região C-terminal da SEPT7 (7C). A diferença entre as duas construções quiméricas foi a presença de uma região de conexão (18 aa) entre os domínios 9G e 7C, chamada de *hinge*, na construção chamada de SEPT9G/h7C, conforme representado na Figura 16.

SEPT9G/h7Ch	GIDSILEQMRKAMKQGFEFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFKSKISRKSVQPTSEERIPKT	60
SEPT9G/7C	GIDSILEQMRKAMKQGFEFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFKSKISRKSVQPTSEERIPKT *****	60
SEPT9G/h7Ch	IEIKSITHDIEEKGVKMLTVIDTPGFGDHINNENCWQPIMKFINDQYKYLQEEVNINR	120
SEPT9G/7C	IEIKSITHDIEEKGVKMLTVIDTPGFGDHINNENCWQPIMKFINDQYKYLQEEVNINR *****	120
SEPT9G/h7Ch	KKRIPDTRVHCCLYFIPATGHSRLRPLDIEFMKRLSKVVNI VPIAKADTLTLEERVHFKQ	180
SEPT9G/7C	KKRIPDTRVHCCLYFIPATGHSRLRPLDIEFMKRLSKVVNI VPIAKADTLTLEERVHFKQ *****	180
SEPT9G/h7Ch	RITADLLSNGIDVYPQKEFDEDESEDLVNEKRFREMI PFAVVGSDHEYQVNGKRILGRKTK	240
SEPT9G/7C	RITADLLSNGIDVYPQKEFDEDESEDLVNEKRFREMI PFAVVGSDHEYQVNGKRILGRKTK *****	240
SEPT9G/h7Ch	WGTIEVENTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDITSSIHFEAYRVKRLNEGSSTYGVNHNKN	300
SEPT9G/7C	WGTIEVENTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDITSSIHFEAYRVKRLNEGSS----- *****	291
SEPT9G/h7C	KGQLTKSPLAQMEERREHVAKMKMEMEMEQVFEMKVKEKVQKLDSEAE LQRRHEQMK	360
SEPT9G/h7C	-----AQMEERREHVAKMKMEMEMEQVFEMKVKEKVQKLDSEAE LQRRHEQMK *****	342
SEPT9G/h7Ch	KNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRI LEQQNSSRTLEKNKKKGI F	410
SEPT9G/7C	KNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRI LEQQNSSRTLEKNKKKGI F *****	392

Figura 16 - Sequências de aminoácidos das quimeras SEPT9G/h7C e SEPT9G/7C. Alinhamento de sequências feito pelo programa Clustal Omega.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a construção da quimera sem o *hinge* (SEPT9G/7C), o DNA codificante foi desenhado com otimização de códons para *E. coli* e sintetizado comercialmente. Para a quimera com o *hinge* (SEPT9G/h7C), a partir do DNA plasmidial de construções presentes no banco de plasmídeos do grupo de pesquisa BBE-IFSC, o inserto (correspondente ao *hinge* + C-terminal de SEPT7) foi amplificado. O vetor, por sua vez, foi também amplificado por PCR a partir da construção sintética da quimera. Os produtos das PCRs foram então submetidos à análise em gel de agarose 0,8 %, confirmando a amplificação dos fragmentos de interesse. Na Figura 17, observa-se as bandas correspondentes aos tamanhos de ~400 pb e ~5000 pb, tamanhos esperados para o inserto e o vetor, respectivamente.

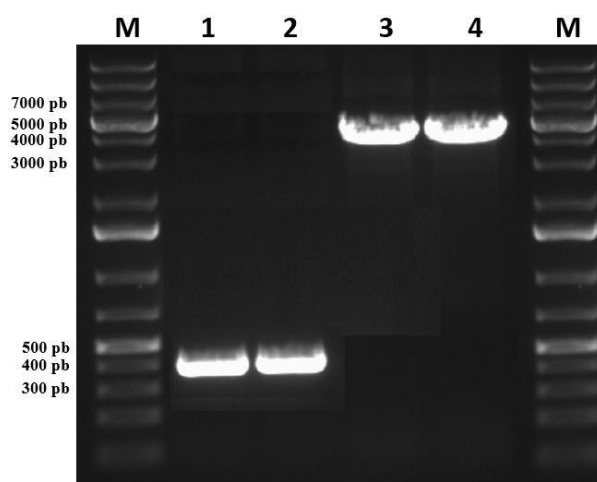


Figura 17 - Análise dos produtos da PCR do inserto e do vetor para a construção SEPT9G/h7C. (M) marcador de massa molecular *GeneRuler* 1 kb DNA *Ladder* (Promega); (1 e 2) produtos da amplificação do inserto; (3 e 4) produtos da amplificação de vetor.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Alíquotas dos produtos das amplificações foram usadas numa reação de *Gibson Assembly*, conforme descrito no item 4.1.5.1. Após a ligação dos fragmentos de interesse, o produto foi usado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Das colônias que cresceram sob seleção (50  $\mu$ g/mL de ampicilina), algumas foram escolhidas para extração de DNA plasmidial e análise de restrição. Todos os clones analisados demonstraram a presença do fragmento de interesse na construção final da SEPT9G/h7C, quando digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, conforme observado na Figura 18. As amostras positivas em relação às construções foram sequenciadas para confirmar a fidelidade da amplificação. Após a confirmação das sequências, os clones de interesse foram submetidos ao protocolo de expressão.

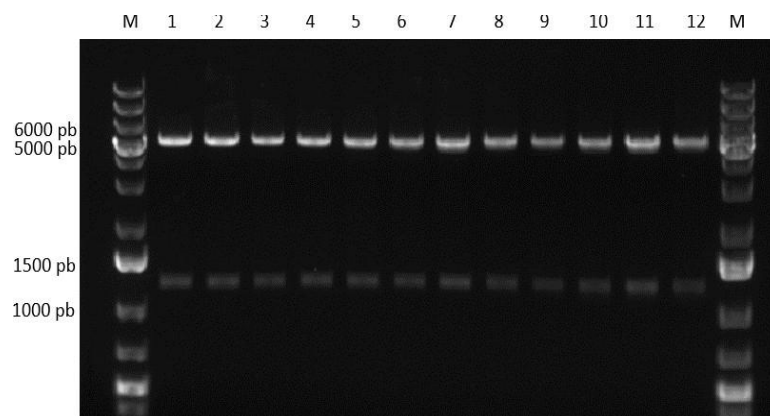


Figura 18 - Análise do padrão de restrição dos clones da SEPT9G/h7C em pETDuet-1. Na eletroforese em gel de agarose 0,8% estão representados os clones analisados: o vetor pETDuet (~5100 pb), submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas *EcoRI* e *HindIII*, liberando um fragmento de ~1200 pb. (1-12). (M) padrão de massa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Fisher Scientific*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da estrutura primária da proteína, alguns parâmetros físico-químicos, necessários para análises posteriores, foram analisados pela ferramenta *ProtParam Tool* do ExPASy (Tabela 6).

Tabela 6 - Características físico-químicas das construções das quimeras sem *hinge* e com *hinge* (SEPT9G/7C e SEPT9G/h7C, respectivamente).

Construção	Resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	Coefficiente de extinção (280 nm)	Abs <sub>280nm</sub> 0,1 %
SEPT9G/7C	392	46254,14	8,95	27180	0,582
SEPT9G/h7C	410	48213,33	9,08	28670	0,595

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 Experimento controle: copurificação de SEPT2G-SEPT6 com SEPT9GC $\alpha$ 0 (não quimérica)

Para avaliar se haveria alguma interação promíscua pré-existente entre SEPT9G e as demais septinas do complexo, foi realizado um experimento controle, para o qual foi produzida a proteína SEPT9GC $\alpha$ 0 em células de *E. coli* Rosetta (DE3). Esta construção, expressa, além do domínio G de SEPT9, seu curto domínio C-terminal (16 aminoácidos).

Paralelamente, foi expresso também o heterodímero SEPT2G-SEPT6NGC, sendo as culturas misturadas ao final da expressão. Como somente a SEPT9GC $\alpha$ 0 possui a cauda de histidinas, a purificação de um complexo na coluna de afinidade dependeria da interação de SEPT9GC $\alpha$ 0 com as SEPT2G-SEPT6.<sup>20,25,62,69</sup> Desde a indução de SEPT9GC $\alpha$ 0 observou-se que sua expressão foi muito alta (Figura 19, I<sub>1</sub>).

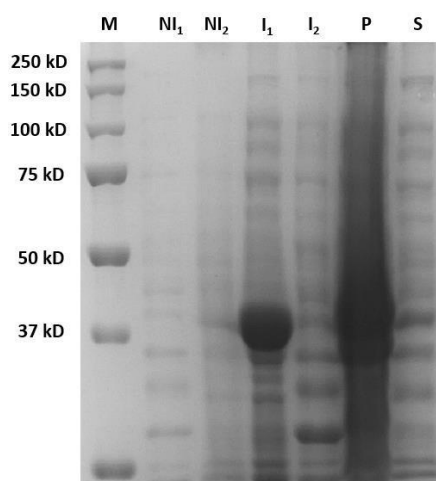


Figura 19 - Análise de expressão e solubilidade de SEPT9GC $\alpha$ 0 e SEPT2G-SEPT6NGC. SDS-PAGE 12%, mostrando: (M) marcador de massa molecular; (NI1) não induzido da SEPT9G; (NI2) não induzido das septinas SEPT2G-SEPT6NGC; (I1 e I2) alíquotas após da indução da SEPT9GC $\alpha$ 0 e as SEPT2G-SEPT6NGC, respectivamente; (P) pellet; (S) sobrenadante após a lise.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As frações eluídas da coluna foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 20A), onde observa-se uma banda intensa em ~38 kDa, massa molecular próxima do esperado para His-SEPT9GC $\alpha$ 0, sem há bandas adicionais para outras septinas.

A amostra ainda foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, da qual a eluição foi acompanhada pela medida da absorbância em 280 nm e o cromatograma está ilustrado na

Figura 20B. As eluições da cromatografia de exclusão molecular foram avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 20B), confirmando que a SEPT9GC $\alpha$ 0, sem o C-terminal de SEPT7, não interage com as SEPT2G e SEPT6NGC.

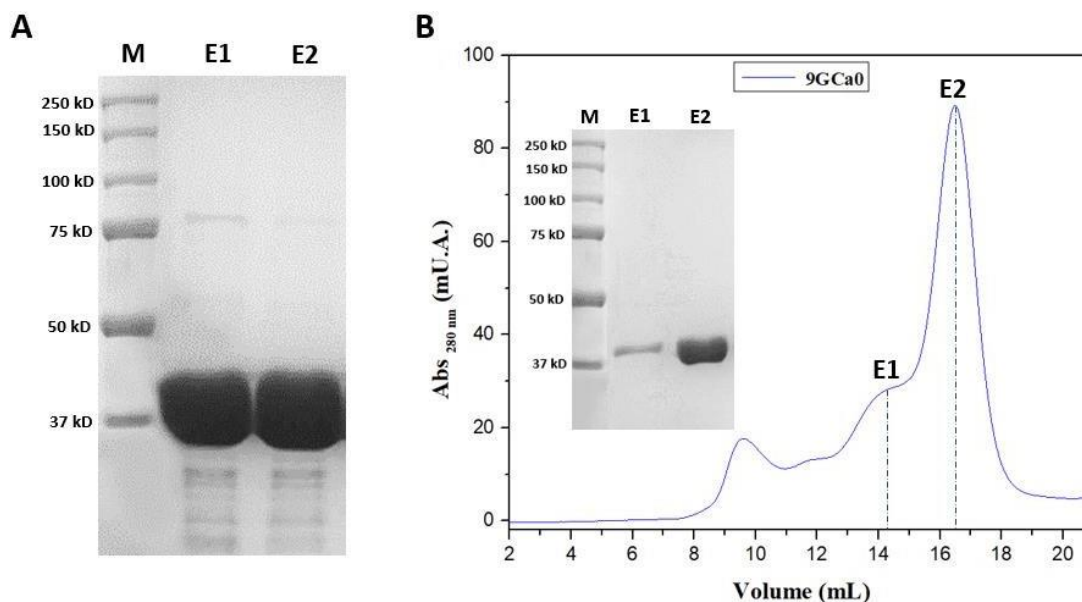


Figura 20 - Análise da purificação de SEPT9GC $\alpha$ 0 em presença de SEPT2G-SEPT6NGC. A) SDS-PAGE 12% das amostras eluídas a cromatografia de afinidade ao níquel. Estão representadas: (M) marcador de massa molecular e as alíquotas de 1 mL coletadas na eluição (E1 – E4) com 500 mM de imidazol. B) Perfil cromatográfico da exclusão molecular da SEPT9GC $\alpha$ 0. Estão representadas (M) marcador de massa molecular e as alíquotas coletadas na eluição (E1 e E2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.3 Expressão heteróloga, purificação e análise do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C

Após confirmar a não interação da SEPT9GC $\alpha$ 0 com SEPT2G-SEPT6NGC, as diferentes versões da quimera foram co-expressas com SEPT2G e SEPT6 em células de *E. coli* Rosetta (DE3). Como somente as proteínas quiméricas possuem cauda de histidinas no N-terminal, o que permite sua imobilização na coluna de afinidade, a interação com as demais septinas expressas é necessária para que o heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C seja co-purificado na cromatografia de afinidade.

A purificação de um heterocomplexo com a quimera sintética sem *hinge* (SEPT2G-6NGC-9G/7C) na cromatografia de afinidade, resultou em amostras com rendimentos variando

de 1 a 2,5 mg/mL. As frações eluídas da coluna foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 21A).

Para aumentar grau de pureza e homogeneidade das amostras para os experimentos subsequentes, foi realizada ainda uma cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma alíquota de 500 µL do complexo. As eluições foram avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 21B).

Conforme pode-se observar na Figura 21, a SEPT9G/7C interagiu com SEPT2G-SEPT6NGC, já que co-eluíram nas cromatografias. A purificação da primeira cromatografia resultou em uma amostra com quatro bandas no SDS-PAGE 12%, que se destacam sobre as demais. A primeira banda (~75kDa) refere-se a contaminantes, provavelmente chaperonas, que frequentemente co-eluem com as septinas durante a purificação.<sup>118</sup>

A segunda banda que observamos é uma banda mais intensa, correspondentes a duas septinas SEPT6 (48,87 kDa) e His-SEPT9G/7C (47,98 kDa), que pela alta intensidade e massas próximas não se consegue distinguir. Porém, após a SEC, é possível diferenciar as bandas das septinas SEPT6 e His-SEPT9G/7C.

A terceira banda, observada somente na cromatografia de afinidade, corresponde à clivagem dentro da região C-terminal da SEPT7C (~45kDa) que faz parte da quimera, amplamente descrita na literatura.<sup>20,25,119</sup> Finalmente a última banda corresponde a SEPT2G (31,57 kDa).



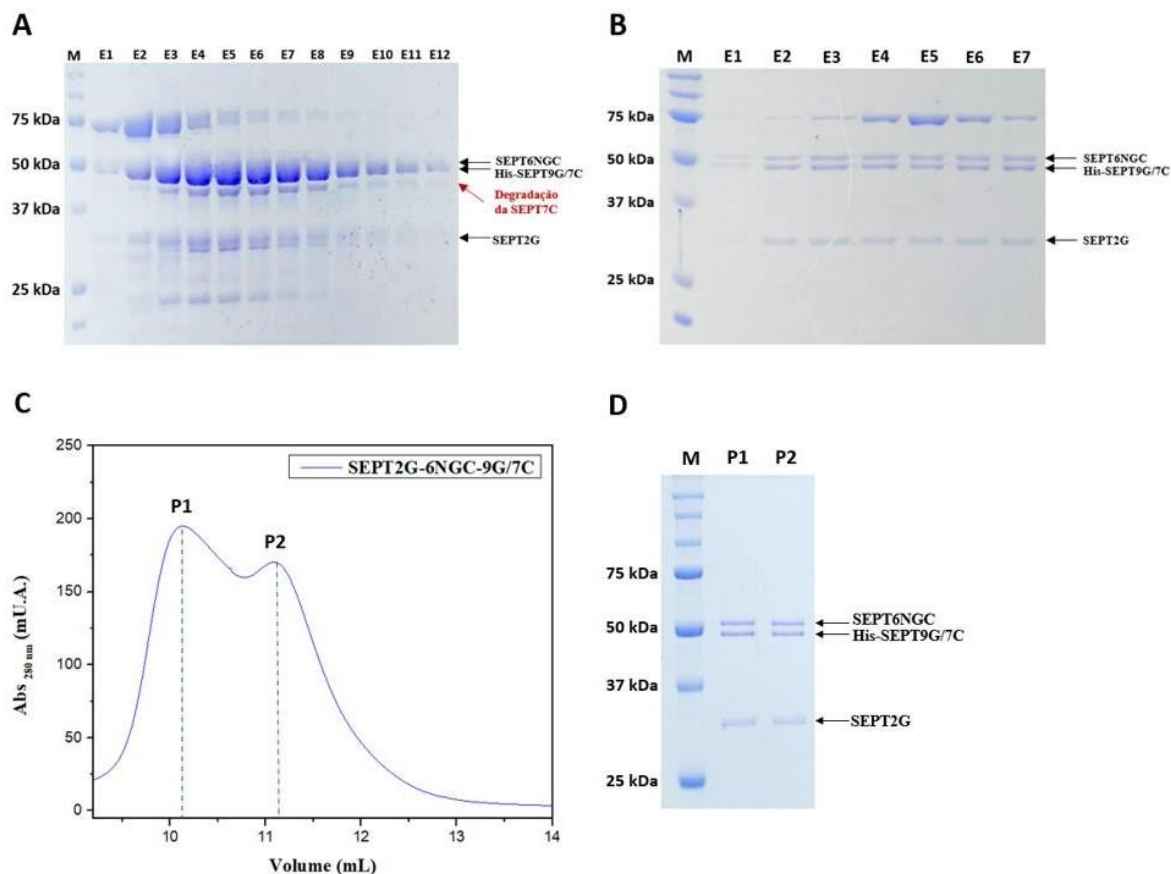


Figura 21 - Análise de purificação do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6 com a quimera SEPT9G/7C. A, B e D: SDS-PAGE 12%, sendo (M) representa o marcador de massa molecular; (A): (E1 – E12) Alíquotas de 500  $\mu$ L coletadas nas eluições com 500 mM de imidazol cromatografia de afinidade ao níquel. Em (B), (E1 – E7) correspondem a alíquotas coletadas das eluições da exclusão molecular na Supedex 200 (primeira purificação). Em (C), perfil cromatográfico do heterocomplexo quimérico em coluna de exclusão molecular Supedex 200, após a cromatografia de troca iônica (segunda purificação); em (D), (P1 e P2) correspondem a alíquotas coletadas das eluições da exclusão molecular na Supedex 200 após a de troca iônica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a purificação pela cromatografia de exclusão molecular, foi observado que as chaperonas continuavam co-eluído junto com o complexo (Figura 21B), o que poderia interferir na avaliação do estado oligomérico do complexo na análise pelo SEC-MALS.

Assim, buscando aumentar a pureza das amostras, foi incluída uma coluna de troca iônica (RESOURCE<sup>TM</sup> Q) após a cromatografia de afinidade e *desalting*. Por fim, após esta etapa foi realizada a cromatografia de exclusão molecular. As eluições foram acompanhadas pela medida da absorbância em 280 nm e o perfil de eluição mostra a presença de dois picos entre os 10 mL e 11,5 mL (Figura 21C). A análise em SDS-PAGE 12%, (Figura 21D) destes picos mostra a presença somente do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C, confirmando a interação da SEPT9G/7C com SEPT2G-SEPT6NGC.

#### 5.4 Expressão heteróloga, purificação e análise do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6NGC-SEPT9G/h7C

A purificação do heterocomplexo com a construção quimérica com *hinge* (SEPT9G/h7C) em cromatografia de afinidade resultou em amostras com rendimentos de 1,5 a 5,3 mg/mL. As frações eluídas desta cromatografia foram coletadas cada 1 mL e avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 22).

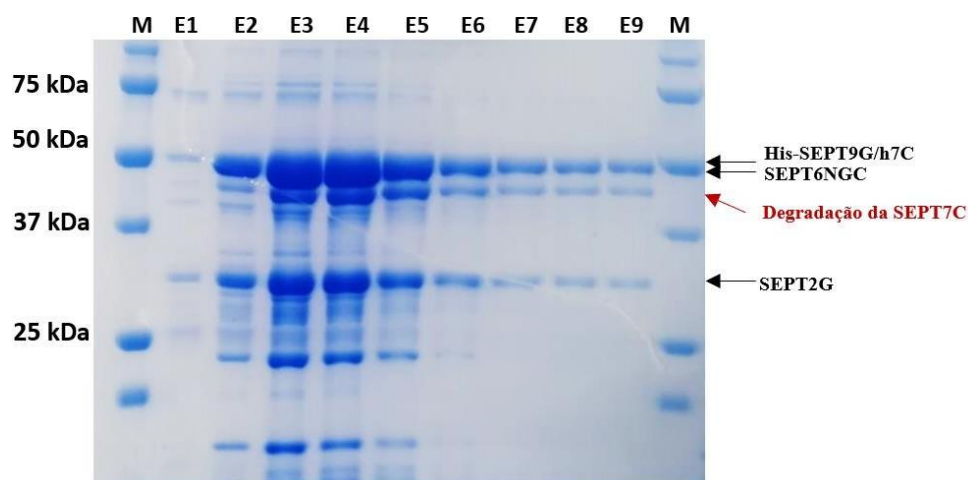


Figura 22 - Resultado da purificação em cromatografia de afinidade do heterocomplexo SEPT9G/h7C-SEPT2G-SEPT6NGC. SDS-PAGE 12% mostrando: (M) marcador de massa molecular; (E1 – E9) alíquotas das frações coletadas ao longo da eluição com 500 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A purificação do complexo com a quimera contendo o *hinge* mostrou similaridade com aquela do complexo com a quimera sem *hinge* (SEPT9G/7C), pelo menos na primeira etapa cromatográfica. Conforme observado na Figura 22, a SEPT9G/h7C interagiu com SEPT2G-SEPT6NGC, pois as proteínas co-eluíram quando aplicado o tampão com imidazol. Outra característica similar foi a presença das chaperonas contaminantes (massa de ~75 kDa), co-eluindo junto com o complexo de septinas, embora desta vez a quantidade das chaperonas tenha sido relativamente muito menor. Ainda na fig. 22, observa-se também uma banda mais intensa, correspondente a SEPT6 e SEPT9G/h7C, já que as massas são de 48,9 kDa e 49,9 kDa, respectivamente. A banda corresponde a SEPT2G ficou evidente em ~30 kDa.

Além das chaperonas, após a purificação por cromatografia de afinidade, ainda se observa a presença de outros contaminantes. Assim, para garantir uma maior pureza e

homogeneidade das amostras, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular. A eluição foi acompanhada pela medida da absorbância em 280 nm e perfil cromatográfico foi avaliado por SDS-PAGE 12% (Figura 23).

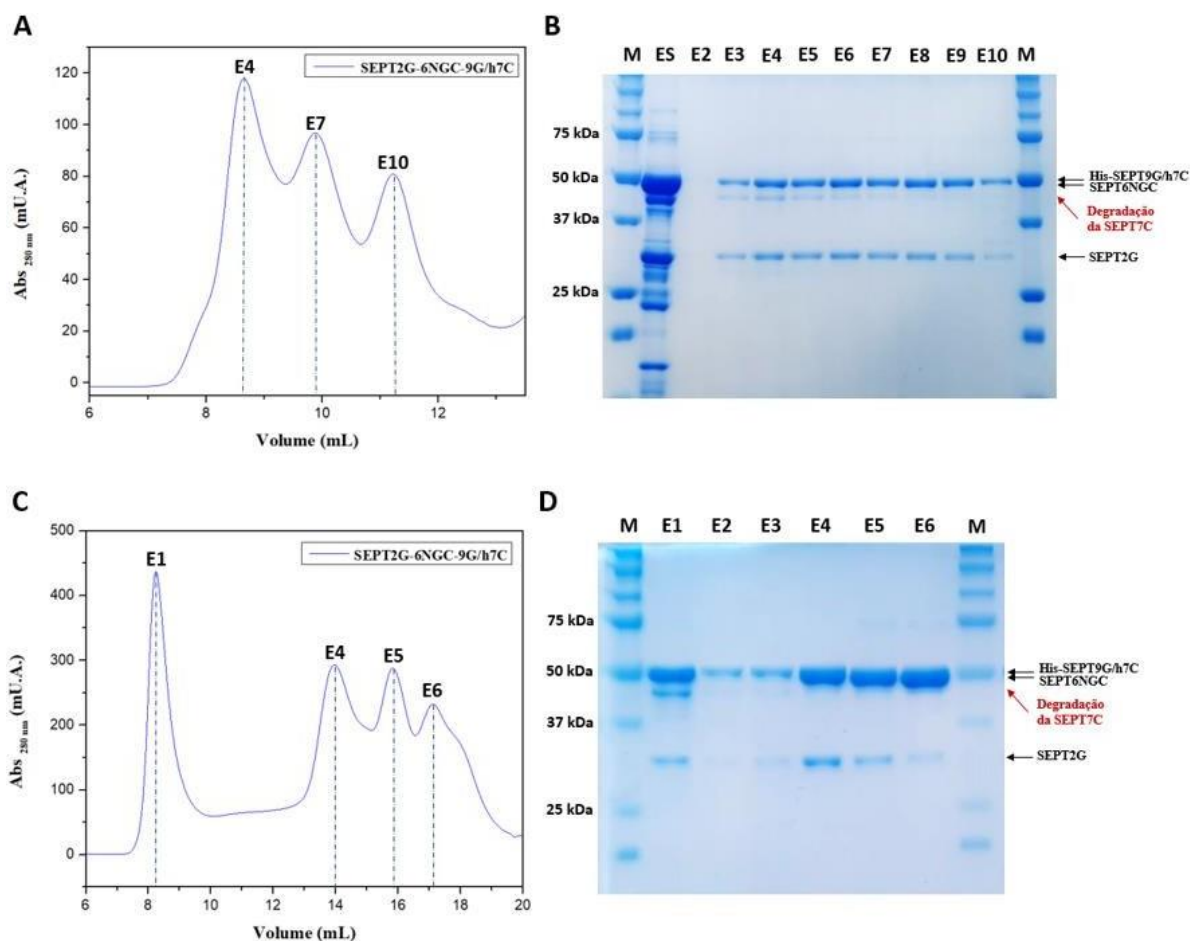


Figura 23 - Cromatografias de exclusão molecular do heterocomplexo contendo o SEPT9G/h7C. A) Perfil cromatográfico da purificação em Superdex 200. B) SDS-PAGE 12% das amostras eluídas em A: (E1 – E10) alíquotas das frações coletadas ao longo da eluição em A; C) Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular com a coluna Superose 6 *Increase*. D) SDS-PAGE 12% das amostras eluídas em C: (E1 – E6) alíquotas coletadas na eluição da exclusão molecular com a coluna Superose 6 *Increase*. (M) Marcador de massa molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Novamente, foi observado que a clivagem dentro da região C-terminal da SEPT7 (~45kDa) (Figura 23B) ocorria mesmo na construção SEPT9G/h7C. Uma diferença notável entre as cromatografias de exclusão molecular do complexo com SEPT9G/7C (Figura 21B) e SEPT9G/h7C (Figura 23B) foi que a presença da chaperona foi eliminada mais facilmente do complexo com a construção SEPT9G/h7C, não sendo necessário incluir a cromatografia de troca iônica.

Conforme observado na Figura 23A, o perfil de eluição mostrou três picos: o primeiro E4 (aos 8,5 mL) referente a agregados proteicos; o pico E7 (Figura 23A) no qual houve a eluição do heterocomplexo de interesse (confirmado na Figura 23B); e ainda o pico E10, representando outros estados oligoméricos.

Com o objetivo de separar o heterocomplexo dos agregados, testou-se a coluna de Superose 6 *Increase*, cujo perfil de eluição é mostrado na Figura 23C. Nesta, o pico E1 corresponde ao agregado; o pico E2 é do heterocomplexo de interesse (no volume de 14 mL), confirmado pela análise em SDS-PAGE 12% ilustrada na Figura 23D. Os outros picos representam outros estados oligoméricos. Uma questão interessante é que no primeiro pico (Figura 23D, fração E1), destaca-se uma banda que corresponde à clivagem dentro da região C-terminal da SEPT7NGC (~45kDa). Esta banda foi eliminada no complexo eluído na fração E4 (que tem massa correspondente ao hexâmero), o que indica que é necessário a presença do C-terminal intacto de SEPT7 para a formação do hexâmero.

## 5.5 Análise do estado oligomérico por SEC-MALS

As amostras purificadas dos heterocomplexos com as quimeras SEPT9G/7C e SEPT9G/h7C foram submetidas à análise por SEC-MALS (SEC acoplada a análise da dispersão de luz em vários ângulos). Para isso, soluções de complexos purificados foram concentrados até 1,0 mg/mL e aplicadas em uma coluna Superdex 200 analítica.

O perfil cromatográfico observado para o complexo contendo a quimera SEPT9G/7C foi heterogêneo, com uma presença de vários estados oligoméricos (um no volume de ~9,5 mL e outros quatro estados), indicando alta instabilidade na formação dos complexos.

Já o perfil observado para os complexos contendo SEPT9G/h7C, mostrou-se menos heterogêneo, com um pico de massa molecular elevada ( $2710 \pm 5,4$  kDa) e polidispersividade de 1,00 ( $\pm 0,28\%$ ), sugerindo tratar-se de um agregado. O pico 2 eluiu em ~9,5 mL, com massa molecular avaliada em  $339,6 \pm 0,6$  kDa, sugerindo tratar-se de um complexo maior que um hexâmero (massa teórica de ~261 kDa) e uma polidispersividade de 1,00 ( $\pm 0,26\%$ ), conforme observado na Figura 24. Os parâmetros obtidos estão descritos na Tabela 7.

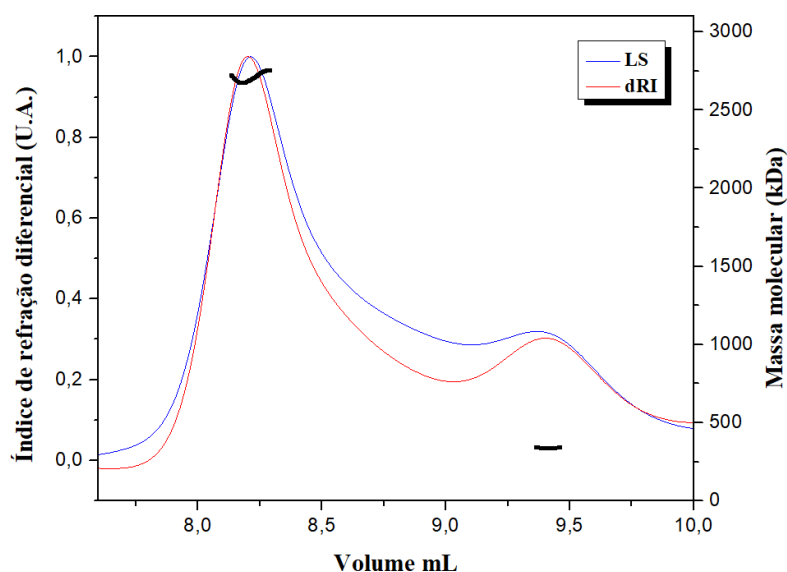


Figura 24 - Cromatograma da dispersividade da amostra do heterocomplexo com a quimera SEPT9G/h7C analisada pelo método de SEC-MALS. A curva azul corresponde à leitura do espalhamento de luz a  $90^\circ$  (LS), a linha vermelha refere-se ao sinal do índice de refração diferencial (dRI). O sinal em preto refere-se a distribuição de massa molecular para os picos obtidos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Parâmetros obtidos da análise de SEC-MALS do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C.

	<b>Pico 1</b>	<b>Pico 2</b>
<b>Mw (kDa)</b>	2710 ( $\pm 5,4$ )	339,6 ( $\pm 0,6$ )
<b>Polidispersividade</b>	1,000 ( $\pm 0,281\%$ )	1,000 ( $\pm 0,255\%$ )
<b>Massa estimada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	4,59	0,90

Fonte: Elaborada pelo autor.

Até aqui, os resultados apresentados mostraram dados interessantes sobre as quimeras e a importância do hinge, que podem ser sumarizadas a seguir.

Para ambas as construções quiméricas constatou-se interação com SEPT2G-SEPT6NGC, mostrando o papel decisivo do C-terminal para induzir esta interação. O rendimento médio das purificações dos heterocomplexos quando o *hinge* está presente (quimera SEPT9G/h7C) teve o dobro de rendimento de SEPT9G/7C e, comparativamente, uma menor interação com chaperonas (Figura 23B e D).

As chaperonas são proteínas que auxiliam no enovelamento e promovem a heteropolimerização de outras proteínas, incluindo as septinas, sendo que frequentemente estão presentes com as septinas durante a purificação.<sup>120-122</sup> A superexpressão das chaperonas foi observada em proteínas não nativas,<sup>118</sup> protegendo-as da agregação.<sup>123</sup> Neste trabalho, a maior co-purificação da chaperona com o heterocomplexo com a quimera SEPT9G/7C pode ser um indicativo da dificuldade de enovelamento e montagem dos heterocomplexos. Neste contexto, os resultados das purificações do heterocomplexo com a quimera SEPT9G/h7C, que mostram uma menor co-purificação de chaperonas, sugere que a adição do *hinge* favoreceu seu enovelamento e/ou formação dos heterocomplexos.

Outra característica importante, é que a região *hinge* presente nos C-terminais das septinas é altamente variável e bastante flexível, permitindo a movimentação dos *coiled-coil* em relação ao domínio G das septinas,<sup>20,25</sup> mas podendo conferir estabilidade aos complexos das septinas.<sup>92</sup> No caso específico de SEPT9G/h7C, a presença do *hinge* parece permitir o movimento do C-terminal em relação ao domínio G da SEPT9 para que passe a interagir com a SEPT6.

Os resultados de SEC-MALS reforçam o que foi acima discutido, pois demonstram que o heterocomplexo com SEPT9G/h7C é mais homogêneo, apresentando só dois estados oligoméricos, diferente do heterocomplexo sem *hinge* (SEPT9G/7C) que mostrou até cinco estados oligoméricos.

Desta forma, os experimentos apresentados a seguir foram conduzidos para caracterizar somente SEPT9G/h7C, bem como o complexo formado a partir desta quimera.

## **5.6 Análise do teor de nucleotídeo da quimera SEPT9G/h7C**

Septinas tipicamente são purificadas ligadas a nucleotídeos e sua presença estabiliza regiões importantes da molécula.<sup>62</sup> A primeira etapa para analisar o teor de nucleotídeos, foi a purificação de SEPT9G/h7C por cromatografia de afinidade (rendimentos de 1,5 a 3,5 mg/mL). As frações eluídas desta cromatografia foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 25).

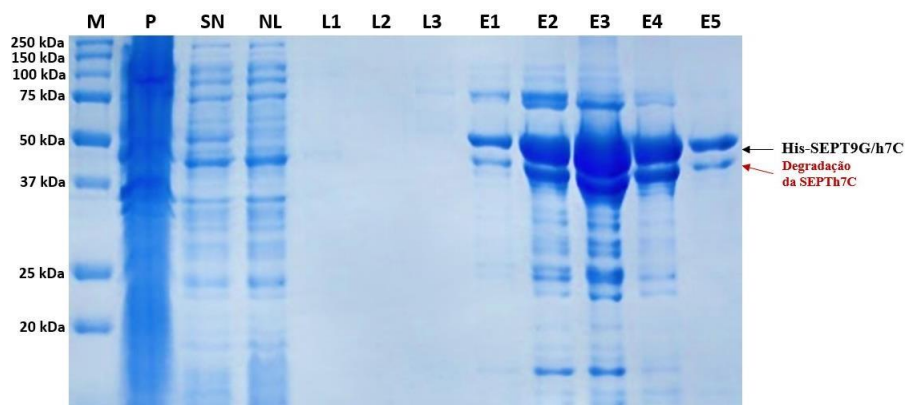


Figura 25 - Resultado da purificação em cromatografia de afinidade da quimera SEPT9G/h7C analisado em SDS-PAGE 12%. (M) marcador de massa molecular; (P) pellet; (SN) sobrenadante após a lise; (NL) não ligado na coluna da quimera; (L1) lavagem com tampão; (L2) lavagem com tampão A mais 0,1% Triton X-100; (L3) lavagem com tampão A acrescido com 10 mM de imidazol; (E1 – E5) alíquotas das frações coletadas ao longo da eluição com 500 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 25, observa-se nas eluições (E1-E5) uma primeira banda intensa, que refere-se a presença de chaperonas contaminantes (~75kDa), característica similar as anteriores purificações. A segunda banda mais intensa correspondente à quimera SEPT9G/h7C (49,9 kDa) e finalmente, a terceira banda observada, corresponde à clivagem dentro da região C-terminal da SEPT7C (~45kDa), amplamente descrita na literatura.<sup>20,25,119</sup> Após a purificação, ainda se observa a presença de outros contaminantes nas eluições. Assim, para aumentar a pureza e homogeneidade das amostras, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico e sua análise são mostrados nas Figuras 26A e 26B.

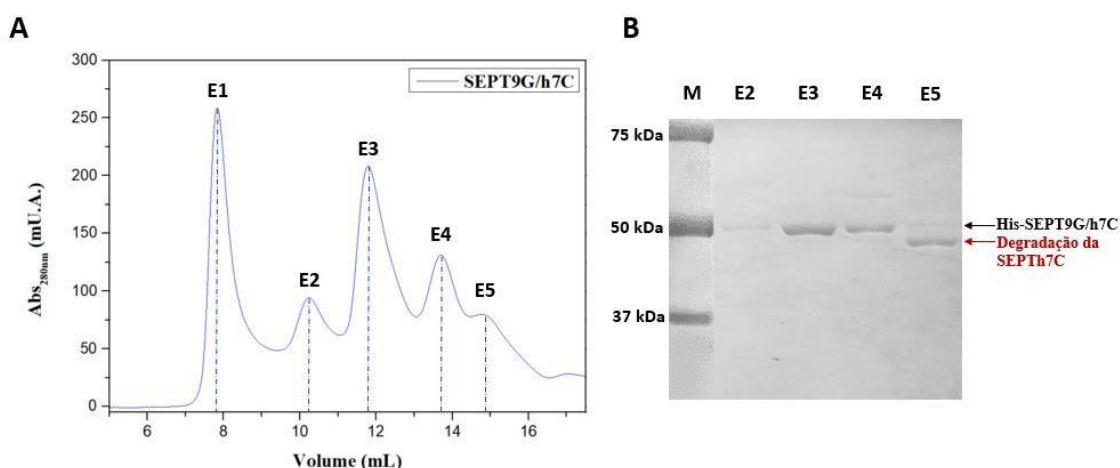


Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular da quimera SEPT9G/h7C isolada. A) Perfil cromatográfico da purificação em Superdex 200. B) SDS-PAGE 12% das amostras eluídas em A: (M) Marcador de massa molecular; (E2 – E5) alíquotas das frações coletadas ao longo da eluição em A.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme observado na Figura 26A, o perfil cromatográfico mostrou até cinco picos: o primeiro pico (E1, volume de 8,0 mL) referente a agregados proteicos; nos picos E2 – E4 houve a eluição da quimera (49,9 kDa), confirmado na Figura 26B. No pico E5 foi observada uma banda fraca correspondente à quimera intacta e uma banda mais forte corresponde à quimera clivada dentro da região C-terminal da SEPT7 (~45kDa), novamente indicando a importância deste para a participação da quimera no complexo.

A amostra purificada da quimera SEPT9G/h7C foi submetida à análise por SEC-MALS (SEC acoplada a análise da dispersão de luz em vários ângulos). Para isso, soluções da quimera purificada foram concentradas até 1,00 mg/mL e aplicadas em uma coluna Superdex 200 analítica. O perfil cromatográfico observado na Figura 27, para a quimera SEPT9G/h7C mostrou três picos, o primeiro correspondente a uma massa molecular elevada ( $577,4 \pm 4,9$  kDa) e polidispersividade de  $1,00 (\pm 1,202\%)$ , sugerindo tratar-se de um agregado. O pico 2 saiu no volume de ~12,0 mL, com massa molecular de  $93,1 \pm 0,9$  kDa, o que sugere tratar-se de um dímero (massa teórica do monômero = 49,9 kDa), o pico 3 saiu no volume de ~13,5 mL, com massa molecular de  $52,1 \pm 1,4$  kDa, o que é compatível com um monômero, conforme observado na Figura 27. Os parâmetros obtidos estão descritos na Tabela 8.

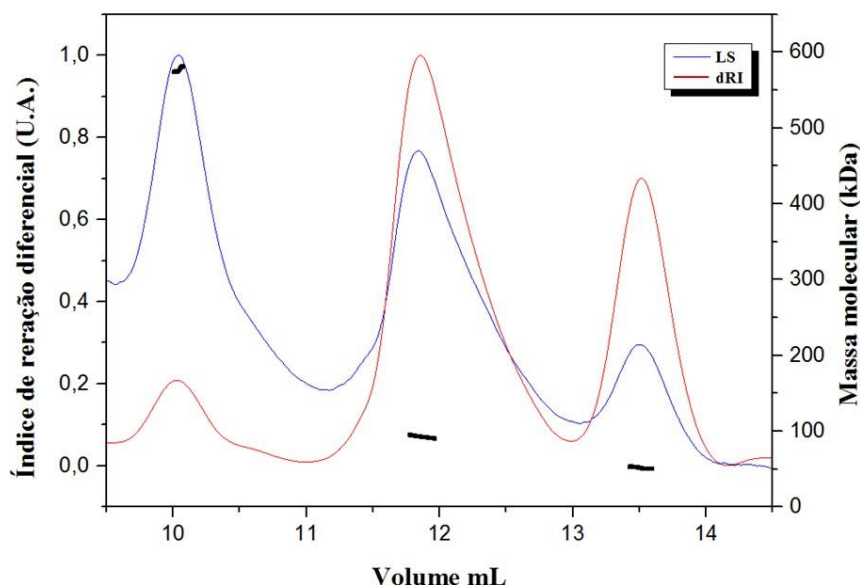


Figura 27 - Cromatograma da dispersividade da amostra da quimera SEPT9G/h7C analisada pelo método de SEC-MALS. A curva azul corresponde a leitura do espalhamento de luz a  $90^\circ$  (LS), a linha vermelha refere-se ao sinal do índice de refração diferencial (dRI). O traço em preto refere-se à distribuição de massa molecular para os picos obtidos.

Fonte: Elaborada pelo autor.



Tabela 8 - Parâmetros obtidos da análise de SEC-MALS da quimera SEPT9G/h7C.

	<b>Pico 1</b>	<b>Pico 2</b>	<b>Pico 3</b>
<b>Mw (kDa)</b>	577,4 (±4,9)	93,11 (±0,9)	52,08 (±1,4)
<b>Polidispersividade</b>	1,000 (±1,202%)	1,000 (±1,324%)	1,000 (±3,873%)
<b>Massa estimada (µg)</b>	0,74	8,30	5,23

Fonte: Elaborada pelo autor.

A amostra do pico E4 da SEC (Figura 26A) correspondente ao estado monomérico de SEPT9G/h7C foi analisado com relação ao conteúdo de nucleotídeo. Inicialmente uma coluna de troca aniônica foi calibrada com os nucleotídeos GDP e GTP e em seguida 20 µM do sobrenadante após desnaturação de SEPT9G/h7C foi analisado em HPLC, a fim de analisar se algum nucleotídeo se encontrava complexado à proteína. Os resultados mostram uma ausência de nucleotídeos correspondente ao liberado da amostra de SEPT9G/h7C (Figura 28), inferindo-se assim, que SEPT9G/h7C encontra-se na forma apo, assim como já foi visto também para SEPT3 e SEPT9 anteriormente.<sup>106</sup>

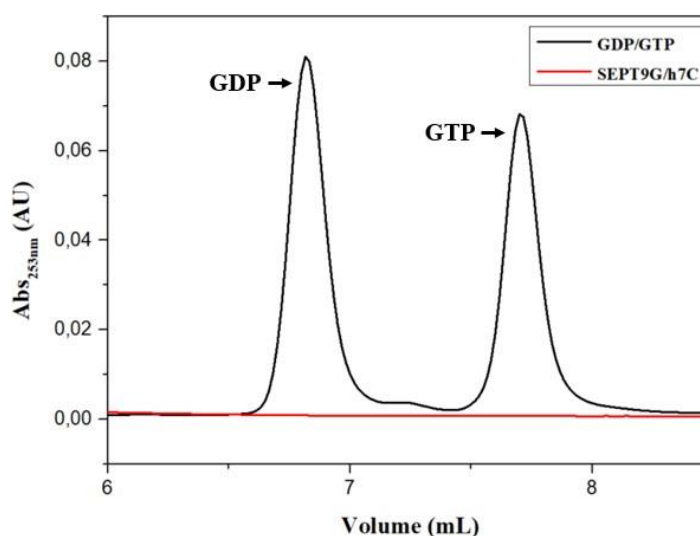


Figura 28 - Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina em coluna de troca iônica da quimera SEPT9G/h7C desnaturada. Os padrões GTP e GDP são mostrados em linha preta, enquanto, a amostra da quimera em linha vermelha. A quimera não tem nenhum nucleotídeo ligado indicando que SEPT9G/h7C é purificado em sua forma apo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados deste item associados ao perfil cromatográfico heterogêneo (Figura 26A), mostram que a quimera SEPT9G/h7C, na ausência de outras septinas, tem uma instabilidade intrínseca, podendo inclusive formar agregados proteicos.

Por outro lado, os pode-se observar que a quimera foi expressa na forma monomérica, assim como na forma dimérica (Figura 27 e Tabela 8). Embora SEPT9 seja reportada somente na forma monomérica quando expressa sozinha, a observação da forma dimérica pode ser interpretada como uma consequência da adição do C-terminal da SEPT7, o que proporcionou a formação de uma interface NC entre as duas quimeras SEPT9G/h7C estabelecida através de um *coiled-coil*.

Estudos cinéticos realizados por Zent e Wittinghofer em 2014 em SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, relatam que SEPT9 é a que apresenta uma taxa de hidrólise elevada ( $k_{cat} = 0,064 \text{ min}^{-1}$ ), característica que foi atribuída ao seu estado monomérico.<sup>124</sup> Provavelmente o estado monomérico e a falta de nucleotídeo ligado estejam relacionados.

Até agora, nenhuma estrutura cristalina que exiba uma interface G intacta foi observada na ausência de nucleotídeo.<sup>62</sup> Os resultados do teor de nucleotídeo, mostram que a quimera SEPT9G/h7C não tem o nucleotídeo ligado, como esperado. Isso reforça a ideia de que o dímero é formado pela interface NC, já que os nucleotídeos só estão presentes na interface G das septinas.<sup>125</sup>

## 5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Com o intuito de entender como o complexo com a quimera se monta e esclarecer os resultados obtidos por SEC-MALS para o complexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C, foram coletadas imagens de microscopia eletrônica (contrastação negativa). Estas imagens foram analisadas utilizando os *plugins* nativos do *software ImageJ* (NIH, USA). As micrografias com dimensões 2048 x 2048 pixels são mostrados na Figura 29.

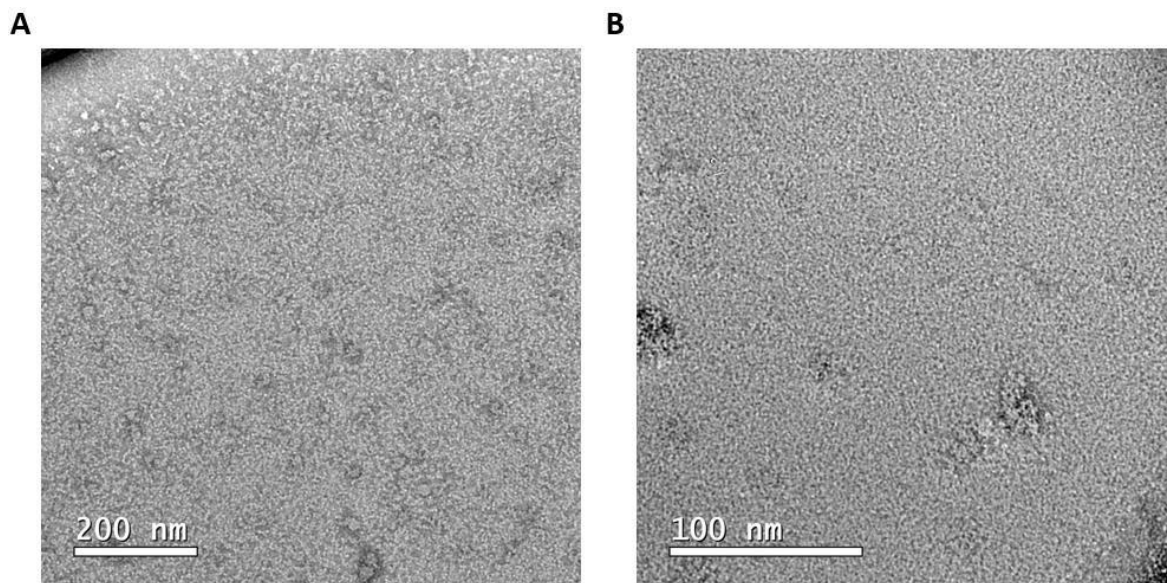


Figura 29 - Micrografias do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C com dimensões 2048 pixels. A) Micrografia com barra de escala de 200 nm. B) Micrografia com barra de escala de 100 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram analisadas quatro grades e as imagens obtidas até o momento não permitiram visualizar o heterocomplexo. Nota-se um *background* intenso das imagens, provavelmente, decorrente da instabilidade do complexo, o que será discutido mais adiante.

## 5.8 Modelamento da estrutura do complexo quimérico

Para auxiliar a entender as interações entre as potenciais interfaces geradas pela presença da septina quimérica, foi incluído um estudo de modelagem, realizado usando a ferramenta AlphaFold2. Os critérios de avaliação do modelo gerado entre SEPT6 e SEPT9G/h7C (quimera) foi por pontuação de confiança gerado pelo AlphaFold2,<sup>114-115</sup> e indicaram que a maior parte do modelo tem uma alta confiabilidade por resíduo (pIDDT > 90), com algumas regiões com uma pontuação baixa (pIDDT < 50) no início e final dos C-terminais que formam o *coiled-coil* (Figura 30).

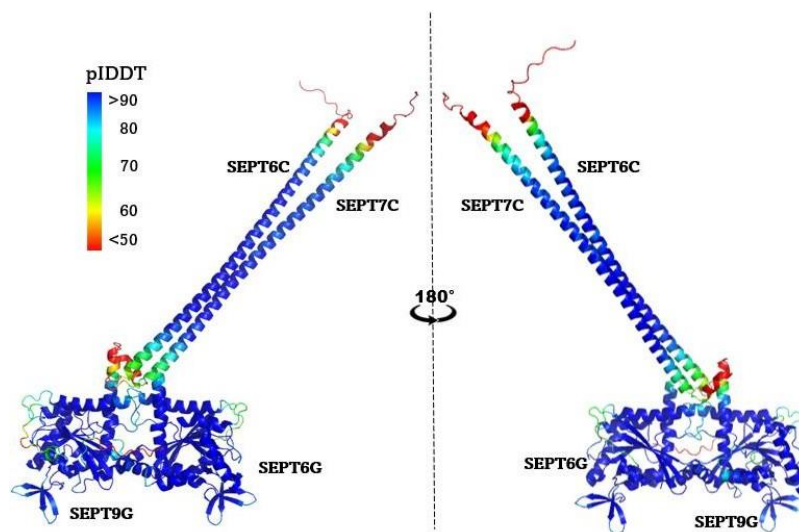


Figura 30 - Representação do modelo da SEPT6 e SEPT9G/h7C usando a técnica de *deep learning* do AlphaFold2 em duas orientações. O modelo está representado por uma escala de cores desde azul (que indica uma pontuação de confiança maior que 90) até vermelho (confiança menor que 50).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação da estereoquímica da estrutura utilizando *Procheck* e *Verify3D* mostrou um *G-factor* de 0,23 (equivalente ao esperado para estruturas com resolução de 2,0 Å). A pontuação do *Verify3D* foi de 68,58% (dentro dos valores esperados) e o valor de *Z-score* do *What\_check* foi de 1,41. Portanto, a avaliação em geral indica que o modelo está dentro dos padrões de boa qualidade. No diagrama de Ramachandran (Figura 31A), há resíduos em regiões generosamente permitidas que muito provavelmente sejam os mesmos resíduos que saem do padrão permitido dos resultados de *Verify3D* (Figura 31B e C). Esses resíduos fazem parte de *loops* que são de natureza não estruturada e muito flexível.

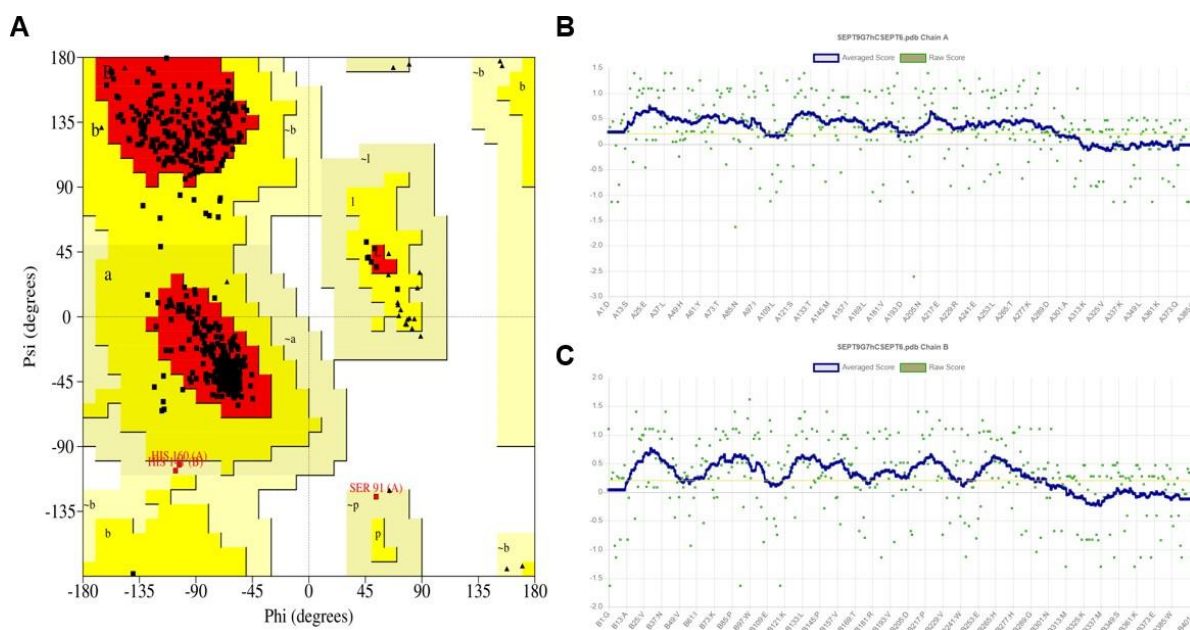


Figura 31 - Avaliação do modelo gerado entre SEPT6 e SEPT9G/h7C (quimera) usando *Procheck* e *Verify3D*. A) O diagrama de Ramachandran gerado por *Procheck* mostra que o 95,7 % dos resíduos são encontrados em regiões mais favorecidas, 3,8 % dos resíduos em regiões permitidas e 0,5 %, equivalente a só três resíduos, em regiões generosamente permitidas. A pontuação de *Verify3D* para cada resíduo das septinas é mostrado pela linha azul; B) é o resultado para SEPT6 (cadeia A no modelo) e C) é o resultado para SEPT9G/h7C (cadeia B no modelo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez confirmada a qualidade do modelo, os resíduos característicos que participam na interação de cada septina foram mapeados. As septinas, como já foi mencionado, associam-se entre si, formando complexos através de duas interfaces diferentes: uma interface NC e uma interface G. Pela adição do C-terminal da SEPT7 em SEPT9G, foram geradas duas novas interfaces NC e G, que serão analisadas a seguir.

## 5.9 Estudo da interface NC entre os *coiled-coils* da SEPT6 e SEPT7

A interface NC no hexâmero de septinas nativo é formada pela interação SEPT6-SEPT7. Num octâmero, além desta, aparece uma nova interface NC no centro do complexo, entre SEPT9-SEPT9 (Figuras 32A e B). Considerando o complexo quimérico, a interface NC será formada entre SEPT6-SEPT9G/h7C (Figura 32C). Até agora, muitas estruturas de septinas foram resolvidas, mas todas sem o domínio C-terminal, apesar deste domínio estar presente na sequência em alguns casos.<sup>20,25</sup> Provavelmente, a alta flexibilidade do C-terminal em relação

ao domínio G impediu que sua estrutura fosse determinada em conjunto. Esta interface NC, forma um *coiled-coil* heterodimérico (SEPT6-SEPT7), importante em oligômeros de septina,<sup>86</sup> por conferir maior termoestabilidade.<sup>126</sup>

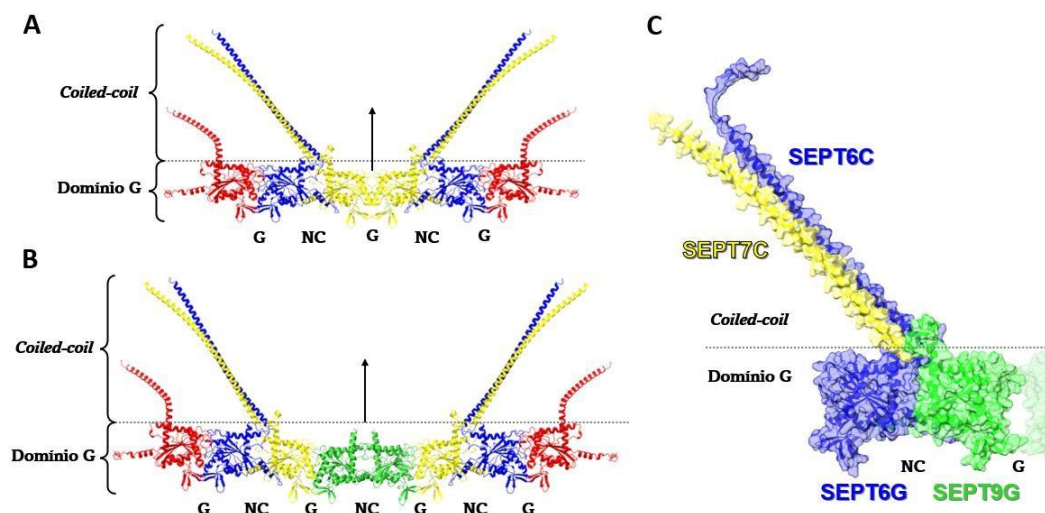


Figura 32 - Modelos estruturais de oligômeros de septinas humanas e suas interfaces. A) No hexâmero, a interface G canônica está formada por SEPT2-SEPT6 (vermelho-azul) e entre duas SEPT7 (amarelo). A interface NC canônica é formada entre SEPT6 e SEPT7 (entre azul-amarelo). B) No octâmero, a interface G e a interface NC são as mesmas que as do hexâmero, com a diferença que SEPT7-SEPT9 (amarelo-verde) formam uma nova interface G e as SEPT9-SEPT9 formam uma nova interface NC. C) A quimera formada por SEPT9G e o C-terminal da SEPT7, forma a interface NC entre a quimera e SEPT6 e, caso o hexâmero se monte, uma interface G entre SEPT9G-SEPT9G. As setas retas representam o eixo de simetria rotacional de ordem-2 e os domínios C-terminais dos filamentos foram modelados por *AlphaFold2*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Neste trabalho, as sequências apresentaram o domínio C-terminal de SEPT6 e SEPT7, portanto, esperava-se a formação de um *coiled-coil* heterodimérico paralelo,<sup>15,126-128</sup> embora, já tenha sido relatado que SEPT6 (PDB: 6WBP) e SEPT8 (PDB: 6WSM) podem se montar como *coiled-coil* homodiméricos antiparalelos.<sup>90</sup>

A estrutura cristalográfica detalhada para o *coiled-coil* heterodimérico ainda não está disponível atualmente. No entanto, nosso grupo de pesquisa conseguiu resolver a estrutura do *coiled-coil* formado entre SEPT7 e SEPT14 (mesmo grupo da SEPT6), pelo Pós-Doutor Italo Augusto Cavini. Os dados e a estrutura (ainda não publicados), foram utilizadas para avaliar a qualidade do modelo do *coiled-coil* entre SEPT6 e SEPT7 e assim mapear os resíduos que estão interagindo entre eles.



No modelo gerado (Figura 33), os *coiled-coil* são compostos por duas hélices paralelas e essa orientação já foi antecipada pela direção das hélices  $\alpha 6$  presentes no domínio G.<sup>20,25</sup>

Os *coiled-coil* podem ser de diferentes tipos mas a característica típica de um *coiled-coil* canônico são suas hélices superenroladas entre si, com giros de mão esquerda para as repetições de tipo 7/2 (repetições heptaméricas) (Figura 34A).<sup>89,131</sup> Outro tipo de *coiled-coil* reportado são hélices que interagem lado a lado (ausência de hélices superenroladas) com giros de mão direita característico de repetições de tipo 11/3 (repetições hendecaméricas) (Figura 34B).<sup>132-133</sup> O modelo da estrutura do *coiled-coil* entre SEPT6 e SEPT7 é peculiar em muitos aspectos; a estrutura está ligeiramente enrolada à direita nos dois terços do N-terminal e à esquerda no terceiro mais próximo ao C-terminal. Isso significa que as hélices interagem essencialmente lado a lado e que os *coiled-coil* das SEPT6 e SEPT7 contém as duas repetições de tipo 11/3 e 7/2 (Figura 34C).

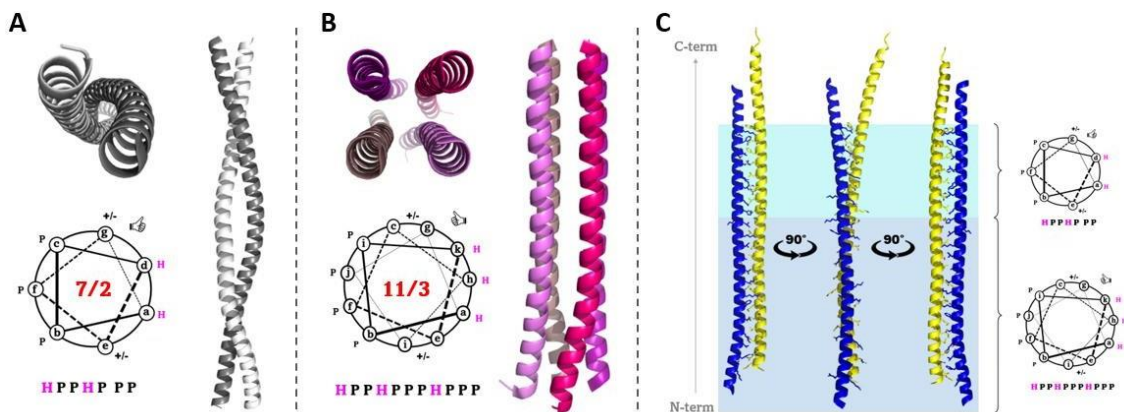


Figura 34 - Tipos de *coiled-coil* e suas periodicidades. A) *Coiled-coil* paralelo (PDB: 3Q8T) com duas hélices que se enrolam entre si e com uma periodicidade de duas voltas, deixando uma fase repetitiva a cada sete aminoácidos (*heptad repeat*). B) *Coiled-coil* paralelo (PDB: 1YBK) com quatro hélices uma a lado da outra, com uma perioricidade de três voltas, deixando uma fase repetitiva a cada 11 aminoácidos (*hendecad repeat*). C) *Coiled-coiled* heterodimérico paralelo entre SEPT6 e SEPT7 com diferentes orientações a cada 90° e com a presença de repetições hendecaméricas nos primeiros 2/3 e repetições heptaméricas na mesma hélice.

Fonte: Elaborada pelo autor.



## 5.10 Estudo da interface NC entre SEPT6G e SEPT9G

A interface NC pode ser dividida em duas regiões, uma região superior, que contém pontes salinas intermoleculares (Figura 35A e B) e um domínio C-terminal com capacidade de formar *coiled-coil*.<sup>86</sup> Na região inferior, se encontram as hélices  $\alpha 0$  (Figura 35C).<sup>20,62</sup>

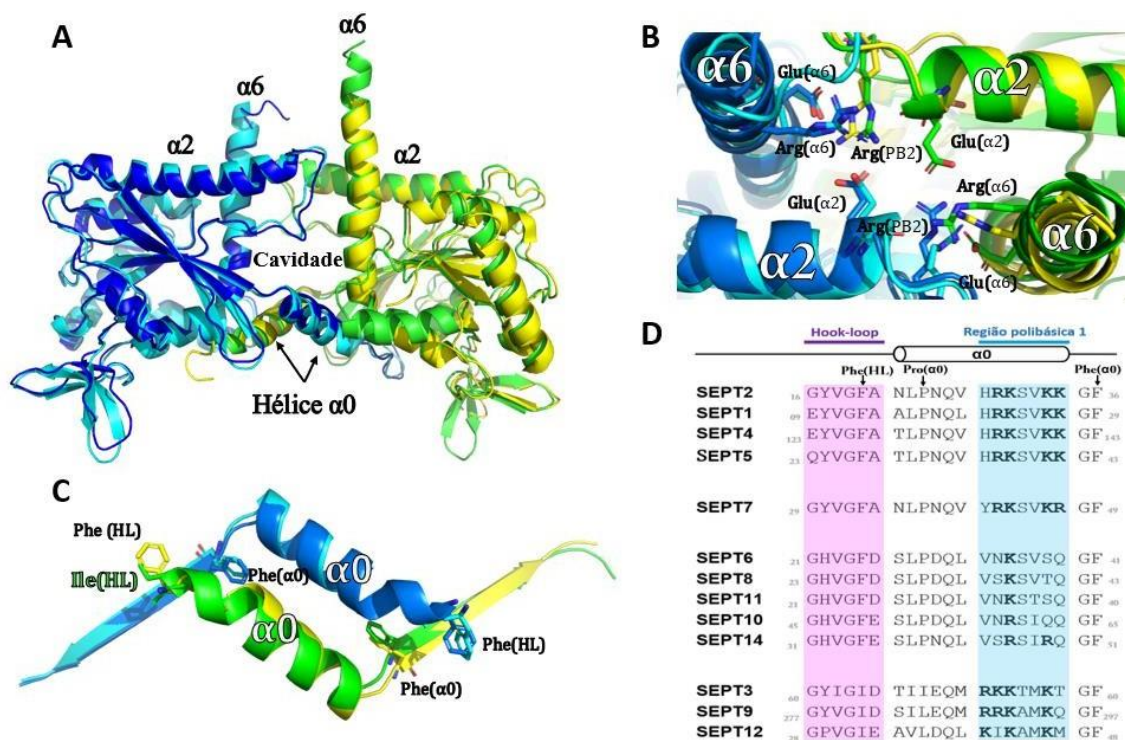


Figura 35 - Sobreposição da interface NC formada pelas SEPT6-SEPT9 e SEPT6-SEPT7. A) Interface NC e sua cavidade entre SEPT6 (azul escuro)-SEPT7 (amarelo) (código PDB: 7M6J) e SEPT6 (azul claro)-SEPT9 (verde) (modelo obtido usando *AlphaFold2*). Na parte superior se destacam as hélices  $\alpha 2$  e  $\alpha 6$ , na parte inferior se destacam as hélices  $\alpha 0$ . B) Parte superior da interface NC indicando os quatro resíduos conservados em ambas subunidades: Glu( $\alpha 2$ ), Arg(PB2), Glu( $\alpha 6$ ) e Arg( $\alpha 6$ ). C) As hélices  $\alpha 0$  e as fenilalaninas conservadas que participam na interação na parte inferior da interface NC, mas são mutadas para isoleucinas para o grupo da SEPT9. D) Alinhamento de todas as sequências N-terminais humanas mostrando os aminoácidos da região do *Hook-Loop* (roxo) e a região polibásica (azul claro) da hélice  $\alpha 0$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A parte superior da interface NC já foi descrita amplamente.<sup>62,69,83,107</sup> Os resíduos envolvidos nas interações eletrostáticas nesta região são Glu( $\alpha 2$ ), Arg(PB2), Glu( $\alpha 6$ ) e Arg( $\alpha 6$ ),<sup>25,69,106</sup> resíduos altamente conservados em todas as septinas. Na Figura 35A e B se observa a similaridade na conformação da parte superior da interface NC fisiológica entre SEPT6-SEPT7 e a interface nova formada entre a quimera e a SEPT6, mostrando que nesta parte da interface sua formação é possível, pela presença dos resíduos.

Além disso, a estrutura de Cryo-EM (PDB:7M6J),<sup>20</sup> revelou que a interface NC canônica, formada pelas SEPT6-SEPT7, apresenta uma cavidade característica, mas da qual ainda se desconhece a função exata. Na Figura 35A há também a presença da cavidade entre a quimera e SEPT6 muito semelhante com aquela de SEPT6-SEPT7. O fundo da cavidade está limitado por uma plataforma formada por hélices  $\alpha 0$ , ancoradas por duas fenilalaninas conservadas em cada extremo (Figura 35C e D); Phe(HL) do *Hook-Loop* e Phe( $\alpha 0$ ) na interface com o domínio G.<sup>62</sup>

Pelo alinhamento do N-terminal (Figura 35D), o *Hook-Loop* e a hélice  $\alpha 0$  do grupo da SEPT9 apresentam propriedades únicas, a âncora Phe (HL) é substituída por uma isoleucina. Já a SEPT7, apresenta 4 resíduos carregados positivamente, diferentemente da SEPT6, que só tem um resíduo com carga positiva. Esta característica provavelmente ajuda na interação entre suas hélices  $\alpha 0$  e, como consequência, na formação da interface NC entre elas. A SEPT9 (e as demais septinas do mesmo grupo) além de apresentarem resíduos diferentes na hélice  $\alpha 0$ , têm também 4 resíduos carregados positivamente na região polibásica, com uma distribuição diferente das outras septinas, que deve levar a outro tipo de comportamento. Assim, tais mudanças podem gerar instabilidade na parte inferior da interface de interação entre a quimera e SEPT6. A distribuição diferente dos resíduos carregados nesta região do grupo da SEPT9 pode ser também uma razão para explicar o porquê SEPT9G (não quimérica) não interage com SEPT2-SEPT6 (Figura 20).

Por outro lado, sabemos que na formação do filamento das septinas humanas uma interface NC homodimérica entre duas SEPT2 será formada,<sup>104</sup> com a interação de suas hélices  $\alpha 0$  que apresentam quatro resíduos carregados positivamente, indicando-nos que existe a possibilidade de interação de duas hélices  $\alpha 0$  com quatro resíduos positivos. Septinas do grupo da SEPT9 já demonstraram adotar diferentes conformações da interface NC, sendo que a SEPT9, dependendo do nucleotídeo, pode adotar duas conformações (aberta ou fechada).<sup>106,107</sup> Isto demonstra a plasticidade desta interface e indica que há possibilidades de reorganização da região para encaixar SEPT6 e SEPT9 na nova interface envolvendo a quimera.

### 5.11 Estudo da interface G entre SEPT9-SEPT9

O modelo atual para um heterofilamento com base em octâmeros,<sup>80,104</sup> propõe que membros do grupo da SEPT9 formem uma interface G heterotípica com SEPT7 e uma interface NC homotípica com outra subunidade da SEPT9. No entanto, a inclusão da quimera SEPT9G/h7C cria uma interface G homodimérica SEPT9-SEPT9 (Figura 36A), a qual pode ser chamada de interface "promíscua,"<sup>107</sup> por não ser uma interface presente em filamentos fisiológicos. Entretanto, essa interface já observada *in vitro*, presente na rede cristalina de SEPT9, resolvida anteriormente. Conforme detalhado abaixo, esta interface G homodimérica possui características que permitem sua formação, mas podem ter variações sutis que contribuem à sua instabilidade.

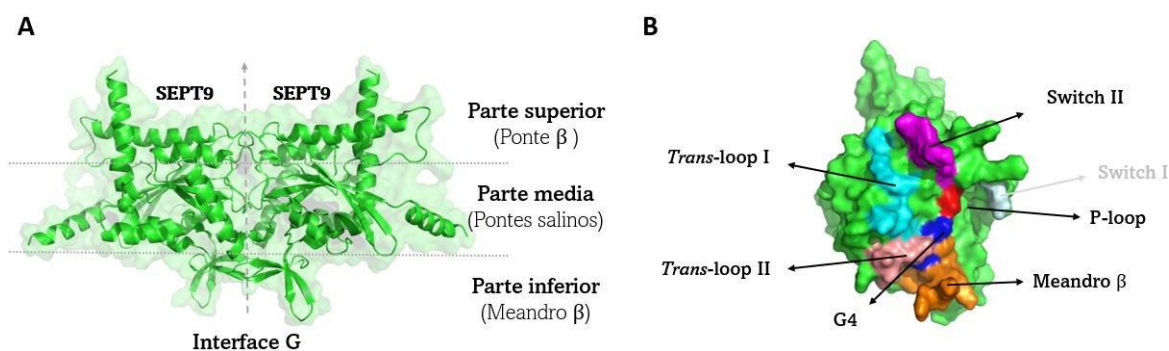


Figura 36 - Vista em superfície das subunidades e interfaces G da SEPT9. A) Interface G homodimérica formada entre SEPT9-SEPT9. O código PDB: 5CYO da estrutura utilizada para SEPT9. B) Subunidade da SEPT9 separada e girada em 90° em torno de seu eixo para expor os resíduos da interface. Seis regiões de contato principais são indicadas no lado G do monômero distribuídas em forma de diamante. A região *Switch I* é uma região desordenada na estrutura de SEPT9.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As interfaces G canônicas são formadas por sete regiões de contato, adotando a forma de um diamante e muitas dessas regiões também foram observadas em interfaces promíscuas (Rosa et al. 2020). Os principais elementos que fazem contato na interface G são essencialmente os *Switchs I e II*, *trans-loops I e II* e os meandros  $\beta$ .<sup>62,83</sup> Na Figura 36B, observa-se que SEPT9 mantém seis das sete regiões de contato, e que membros do seu grupo apresentam um *Switch I* desordenado,<sup>83</sup> o que contribuiria para a instabilidade nesta região.

Na Figura 37, é mostrado o emparelhamento de duas regiões de *Switch II* canônicas entre o heterodímero SEPT7-SEPT3 (Figura 37A) e homodímero SEPT7-SEPT7 (Figura 37D). Esta região se caracteriza pela ponte  $\beta$  intermolecular que é estabilizada por ligações de hidrogênio da cadeia principal, que colocam resíduos de asparagina ou ácido aspártico

(Asx(Sw2)) emparelhados através da interface G fisiológica. Essa região também apresenta outras características, como os giros  $\beta$  antes e depois da ponte  $\beta$  que ajudam na sua correta orientação.<sup>83,134</sup> Eles possuem uma asparagina (Asn(Sw2)) imediatamente após de Asx(Sw2), cuja cadeia lateral forma ligações de hidrogênio nos hetero- (SEPT3-SEPT7) e homodímeros (SEPT7-SEPT7), estabilizando ainda mais a estrutura (Figura 37A e D, respectivamente).

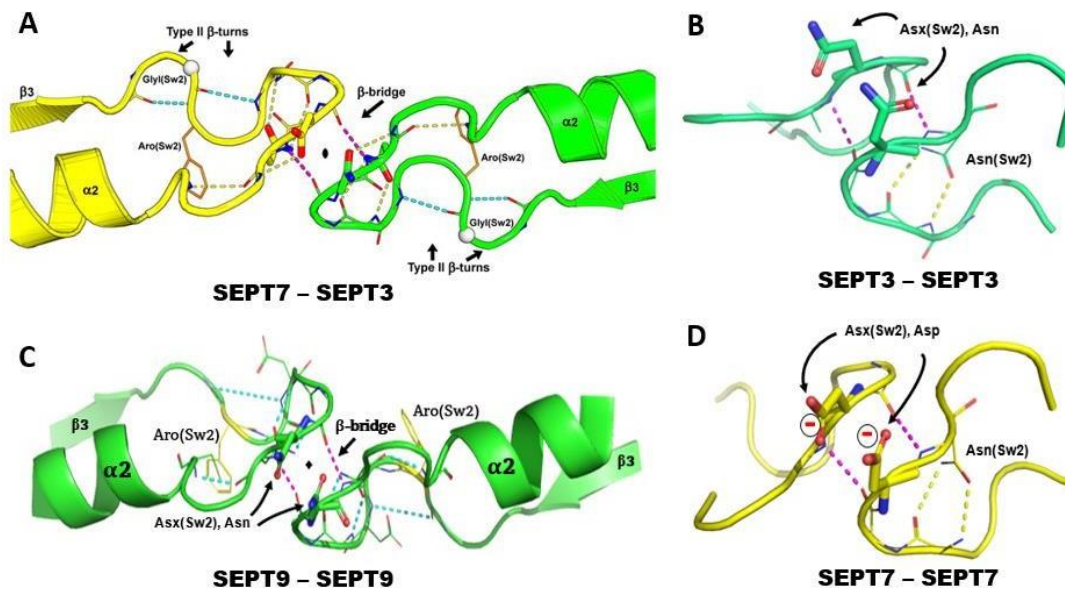


Figura 37 - Conformações da região *Switch II* na interface G. A) *Switch II* do heterodímero SEPT7-SEPT3 (PDB: 6UQQ). Sobre a ponte  $\beta$ , um ácido aspártico em SEPT7 (amarelo) e uma asparagina em SEPT3 (verde). B) *Switch II* entre SEPT3-SEPT3 (PDB: 4Z54). C) *Switch II* entre SEPT9-SEPT9 (PDB: 5CYO). D) *Switch II* entre SEPT7-SEPT7 (PDB: 6N0B). Entre as interfaces SEPT9-SEPT9 e SEPT3-SEPT3, observa-se um arranjo muito semelhante ao das interfaces G fisiológicas. A ponte  $\beta$  de tipo largo, que se encontra no eixo de simetria pseudodupla que relaciona os dois monômeros, é marcada e suas duas ligações de hidrogênio são coloridas em roxo, ou seja, as posições Asx(Sw2), são representadas como barras e são colocadas em lados opostos, lados do eixo de simetria. Abaixo da ponte  $\beta$ , cada subunidade tem um resíduo de asparagina, Asn(Sw2), cuja cadeia lateral é representada como barras, formando ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio e oxigênio da cadeia principal do resíduo três posições antes da sequência. Algumas cadeias laterais e átomos da cadeia principal foram removidos para maior clareza. Aro(Sw2) é indicado, pois pode desempenhar um papel na comunicação entre as interfaces adjacentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As septinas do Grupo I, como SEPT3 e SEPT9 possuem também essa região bem ordenada (Figura 37B e C), formando uma ponte  $\beta$  do tipo larga e conservada.<sup>107</sup> A presença da ponte  $\beta$  é uma característica consistente e necessária de uma interface G fisiológica, que impede o deslizamento da fita  $\beta 3$ . O deslizamento só ocorre em interfaces G promíscuas, o que desfavorece a formação dessas interfaces *in vivo*.<sup>134</sup> Assim, todas as características que o *Switch II* da SEPT9 apresenta, conferem estabilidade na parte superior da interface G homodimérica, mesmo sendo uma interface não canônica.

## 5.12 Estudo da região média da interface G entre SEPT9-SEPT9

Na região média da interface G, a superfície de contato é mais larga e está organizada pelos *trans-loops* I, P-loop e G4.<sup>62,83</sup> Analisando primeiramente as interfaces G nativas, na região média da interface G homodimérica formada entre SEPT7-SEPT7, mais especificamente no P-loop, há um Glu conservado que interage com a Lys vizinha da septina parceira, formando uma interface simétrica pelas pontes salinas entre Glu58 e Lys173 de ambas as subunidades (Figura 38A). No caso da interface G heterodimérica SEPT7-SEPT3, Glu58 na região central é substituído por Gln69 em SEPT3 (Figura 38B). Esta substituição elimina uma carga negativa da matriz, causando um distúrbio estrutural, porém a interface G homodimérica é mais estável.<sup>83,107</sup>

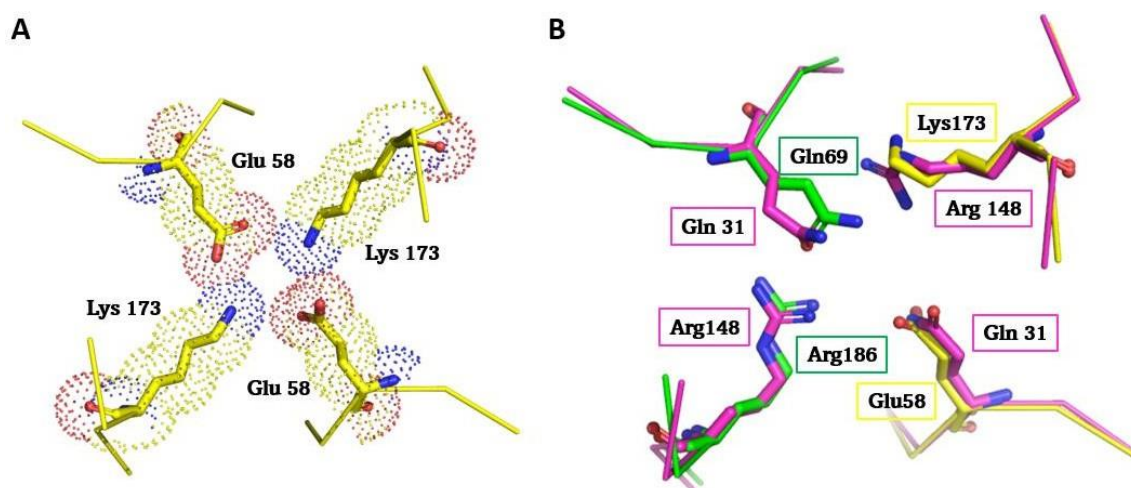


Figura 38 - Resíduos característicos na formação das pontes salinas na região média da interface G das septinas. A) Pontes salinas na interface G homodimérica da SEPT7-SEPT7 (PDB: 6N0B) formada entre Glu58 e Lys173 de cada subunidade. B) Sobreposição da interface G heterodimérica entre SEPT3-SEPT7 (PDB: 6UQQ), de cores verde e amarelo respectivamente, com a interface G homodimérica entre SEPT9 (PDB: 5CYO) de cor magenta. Os resíduos presentes na região média da interface G heterodimérica e homodimérica estão indicados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na região média da interface G homodimérica formada por duas SEPT9, o Glu conservado no P-loop das septinas foi substituído por Gln em todos os membros do grupo da SEPT9, e a Lys é substituída por Arg, igual na interface G heterodimérica SEPT7-SEPT3. Estas substituições, por eliminarem duas cargas negativas dos resíduos de ácido glutâmico, podem causar instabilidade na região média da nova interface G.

### 5.13 Estudo do SUE da interface G entre SEPT9-SEPT9

O *Septin Unique Element* (SUE), é uma região altamente conservada, essencial e exclusiva das septinas,<sup>86</sup> que forma a região C-terminal do domínio G. Nesta região está o meandro  $\beta$  (Figura 39), na parte inferior da interface G, que participa de interações com *trans*-loops II do parceiro correspondente.<sup>62</sup> O meandro  $\beta$ , tem um papel muito importante na estabilidade da interface G. No grupo da SEPT3, há uma mudança única T282Y presente (Figura 39A), que desfavorece a formação da interface G. A reversão desta mudança já se mostrou necessária e suficiente para a formação do homodímeros (SEPT3-SEPT3) e heterodímeros (SEPT3-SEPT7).<sup>83,106</sup> No caso da interface G que pode ser formada ao centro do hexâmero quimérico, os domínios 9G da quimera provavelmente tem o mesmo comportamento instável da SEPT9G nativa, podendo este ser um fator desestabilizador para um possível hexâmero constituído pela quimera.

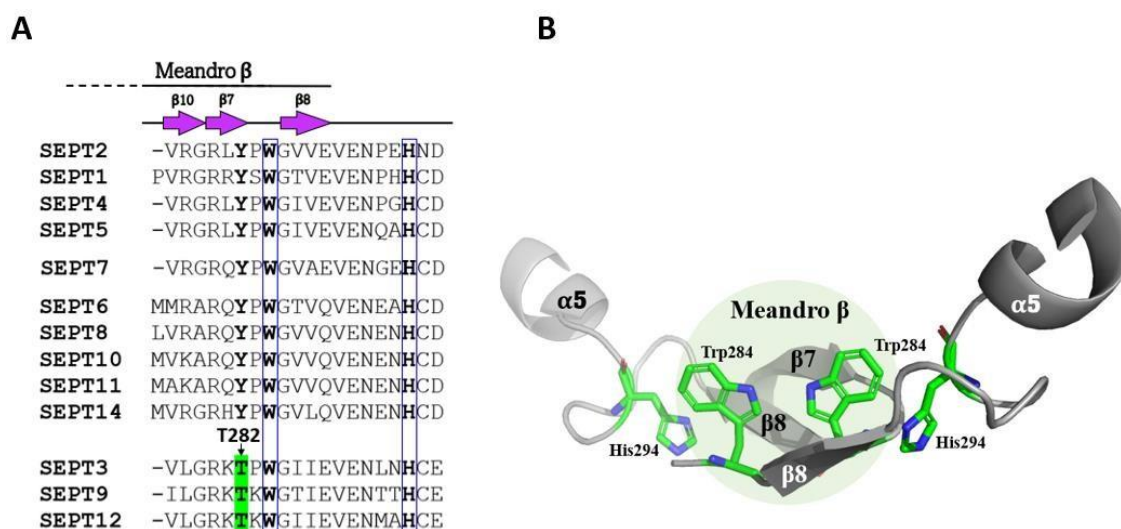


Figura 39 - Resíduos do *Septin Unique Element* (SUE) que interagem na formação da interface G entre duas SEPT9. A) Alinhamento do SUE contendo parte do meandro  $\beta$ . Destaca-se em negrito os resíduos mais importantes envolvidos na formação da interface G. A tirosina presente em todas as septinas com a exceção daquelas do grupo da SEPT3 (que apresenta uma treonina, em verde), estão no final da fita  $\beta_7$ . O triptofano está no *loop* entre as fitas  $\beta_7$  e  $\beta_8$  e a histidina está no *loop* depois da fita  $\beta_8$ . B) O SUE das SEPT9, contém o Trp284 do meandro  $\beta$  (de fundo verde) interagindo com a His294 da subunidade vizinha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.14 Avaliação da estabilidade das interfaces dos heterofilamentos das septinas

Apesar dos avanços nos estudos estruturais sobre as septinas nos últimos anos, o mecanismo de polimerização e interações entre septinas ainda não é bem compreendido. Para compreender melhor a formação das interfaces e sua estabilidade, cada interface foi avaliada utilizando o programa PDBePISA (EMBL-EBI).<sup>135-136</sup> Na Figura 40 estão representados de forma resumida os resultados das interações de interfaces nativas e promíscuas de NC e G das septinas, utilizando os melhores modelos cristalográficos disponíveis para cada tipo de interface. No caso das interfaces novas formadas pela quimera, foram utilizados os modelos gerados por *AlphaFold2*. Os resultados completos destas análises são mostrados na Tabela A1 do Apêndice.

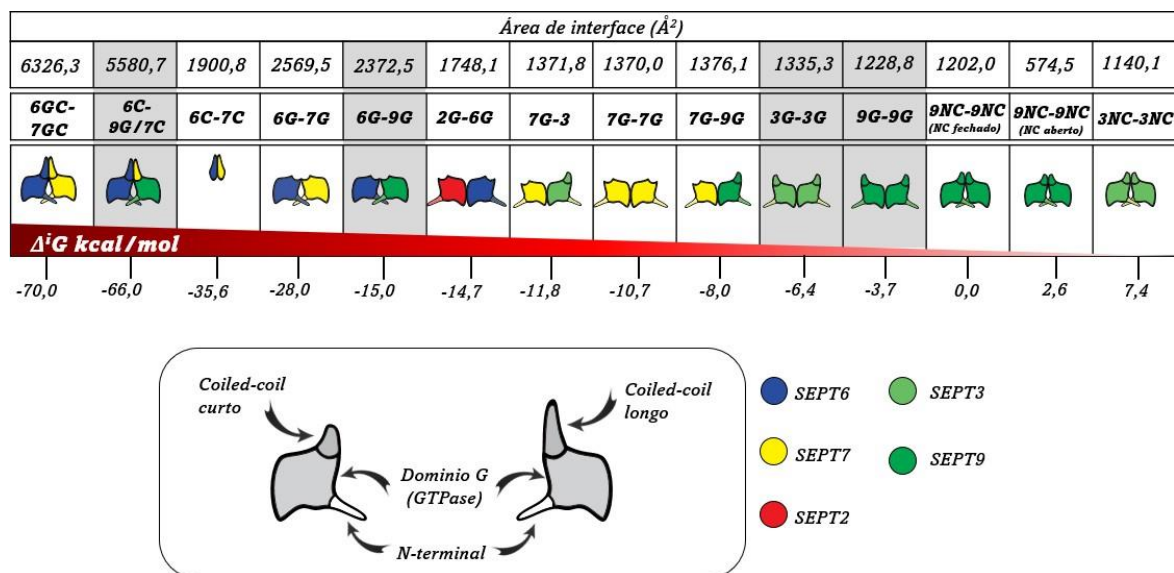


Figura 40 - Escala comparativa da energia de livre de Gibbs de interação ( $\Delta^iG$  kcal/mol) e as áreas das interfaces nativas e promíscuas das septinas. As septinas estão representadas por diferentes cores especificadas na figura. As interações de interfaces nativas estão em fundo branco e as interações de interfaces promíscuas em fundo cinza. Em cada imagem é possível observar a barra de escala vermelha de energia de interação ( $\Delta^iG$  kcal/mol) e os valores das áreas (Å<sup>2</sup>) acima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A energia de interação ( $\Delta^iG$  kcal/mol) é um valor termodinâmico que indica o ganho de energia livre de interação na formação da interface e permite prever a formação dos produtos. Nesta análise, o valor foi usado para prever se as interfaces são favoráveis em sua formação, sendo que valores mais negativos correspondem a interfaces hidrofóbicas ou afinidade proteica positiva.<sup>135-136</sup> Os dados da Figura 40 e Tabela A1 do Apêndice, mostram que o valor mais

negativo da energia de interação de todas as interfaces é para interface NC entre SEPT6-SEPT7 com os C-terminais presentes. Curiosamente, o segundo valor mais negativo é a nova interface NC formada pela SEPT6 e a quimera (SEPT9/h7C), provavelmente decorrente da inclusão do C-terminal da SEPT7. É interessante notar que na interface NC nativa (SEPT6-SEPT7), 60% da estabilidade é devida ao *coiled-coil*. De forma similar, na interface NC entre SEPT6 e a quimera, o *coiled-coil* fornece 77% da estabilidade no complexo, ajudando a SEPT9G a interagir com SEPT6G, embora esta interface não exista no filamento fisiológico.<sup>20,25,80,104</sup> Estes dados reforçam a ideia que o par de septinas cujos C-terminais interagem através de *coiled-coils* longos tenha maior força de interação.<sup>126-127</sup>

Na interface NC de SEPT3 e SEPT9, as septinas apresentam valores positivos da energia de interação, mesmo sendo interfaces nativas. Isso implica na sua localização no final da escala energética (Figura 40), onde se observam baixas afinidades na formação das interfaces. O valor da energia de interação de SEPT9 é maior que o de SEPT3, e a interface de SEPT9 fechada tem maior estabilidade que aberta, devido à maior área de contato com sua parceira (Figura 40). No caso das interfaces G nativas, os valores são mais negativos que aqueles observados para as interfaces G promíscuas (Figura 40), indicando que, em condições fisiológicas, são as interfaces mais prováveis de formar, por conferir mais estabilidade ao filamento.<sup>83</sup> É interessante observar que a interface G homodimérica da SEPT9 (Figura 40, interface promíscua formada pela adição da quimera), tem mais preferência em se formar que a interface NC da SEPT3 (interface nativa), sugerindo que terá maior estabilidade.

Os dados da Figura 40 e Tabela A1 do Apêndice, são compatíveis com os estudos das interfaces e ordem na montagem dos hexâmeros e octâmeros nativos,<sup>20,80,119</sup> e também ajudam a compreender a ordem e a preferência de formação de interfaces promíscuas, que até agora não foi muito abordada. Nota-se que os valores da energia de interação das interfaces fisiológicas são mais negativos que o das interfaces promíscuas. Isto pode justificar as interfaces nativas serem favorecidas no filamento ou mesmo as escolhas de parcerias entre as septinas na montagem dos complexos.<sup>62,83</sup> A análise também revela que o *coiled-coil* possui um papel importante na estabilidade dos dímeros de septinas, sendo decisivo na interface da quimera com SEPT6. De forma complementar, a perda do C-terminal não impede a formação da interface NC nativa,<sup>25</sup> mas no caso da interação da quimera com SEPT6, a perda obviamente é crítica.



Os valores da energia de interação das septinas com os *coiled-coil* mostrados até agora, reforça o que já foi descrito sobre os *coiled-coil* heterodiméricos como sendo estruturas termoestáveis, inclusive mais que os *coiled-coil* homodiméricos das septinas.<sup>90,126</sup> No entanto, até agora não há explicação do motivo pelo qual os *coiled-coil* são estruturas estáveis. Ao analisar o registro dos resíduos dos *coiled-coil* heterodimérico entre SEPT6 e SEPT7 (Figura 33 e 41A), observam-se até sete resíduos aromáticos (6xPhe e 1xTrp) (Figura 33, 41A e C) no núcleo da interface, sendo que no *coiled-coil* homodimérico da SEPT6 tem somente quatro resíduos aromáticos (4xPhe) (Figura 41A).

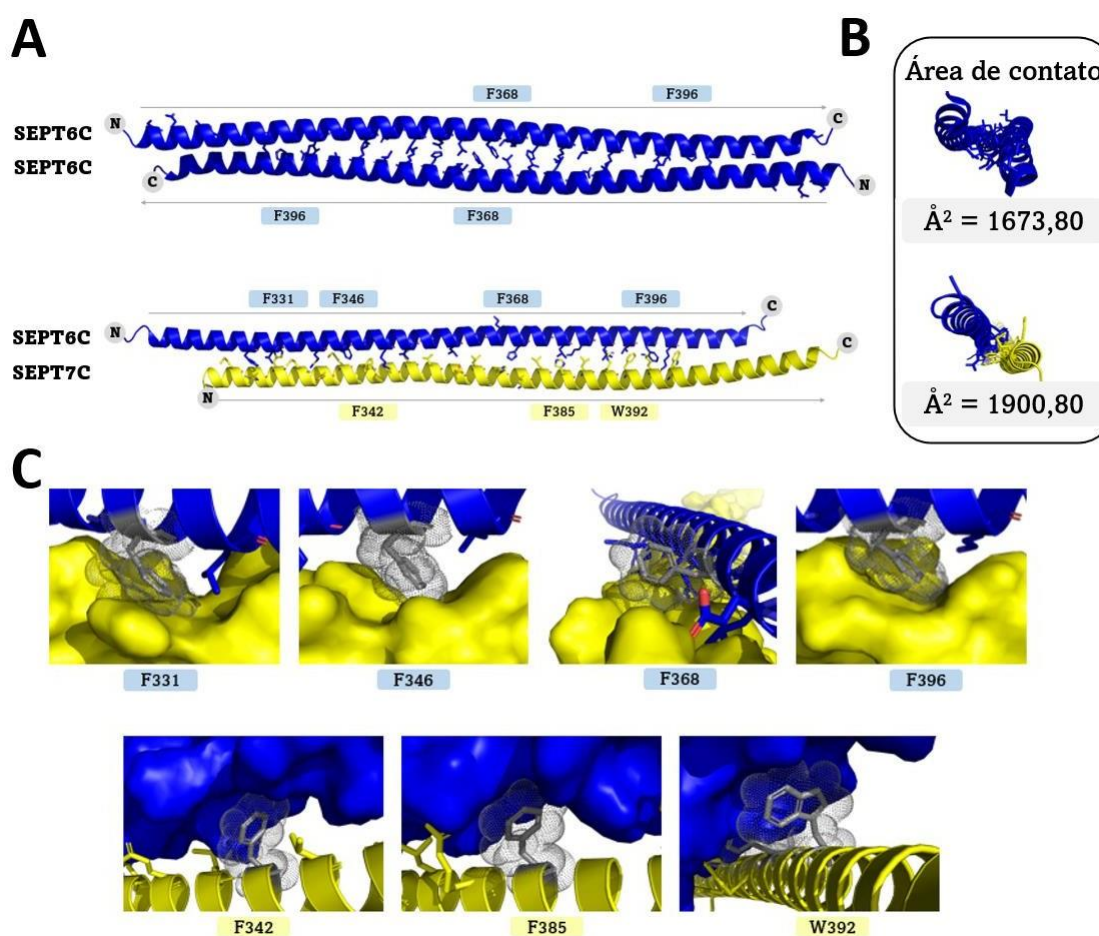


Figura 41 - Resíduos aromáticos presentes no registro dos *coiled-coil* homodiméricos e heterodiméricos. A) *Coiled-coil* homodimérico antiparalelo da SEPT6 (azul) com quatro fenilalaninas no centro de contato, e *coiled-coil* heterodimérico paralelo formado por SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarelo), contendo 4xPhe e 4xPhe/1xTrp respectivamente no centro de contato. As setas cinzas indicam a direção das hélices. B) Áreas de contato presentes nos modelos. A maior área de contato é da interface do *coiled-coil* heterodimérico ( $\text{\AA}^2 = 1900,80$ ) em comparação ao *coiled-coil* homodimérico ( $\text{\AA}^2 = 1673,80$ ), medidos com o programa PDBePISA (EMBL-EBI). C) Os resíduos aromáticos, fenilalaninas e triptofanos presentes na interfase dos *coiled-coil* são mostrados de cor cinza.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A presença de resíduos aromáticos no *coiled-coil* das septinas é uma característica peculiar. O que é comum achar na interface dos *coiled-coils* é a presença de isoleucina (Ile) e leucina (Leu), sendo que esses dois resíduos são suficientes para estabilizar as interfaces de *coiled-coils*.<sup>137,138</sup> Existem poucos trabalhos recentes que reportam resíduos aromáticos presentes na interface dos *coiled-coils*, sendo que os reportados até agora são de peptídeos sintéticos.<sup>139-141</sup> Os resíduos aromáticos (sobretudo Phe), apesar de hidrofóbicos, conferem estabilidade nos *coiled-coil*<sup>141-142</sup> e a razão seria pelo aumento da área de contato na interface (Figura 41B e C). Por isso, quando se compara a área de contato do *coiled-coiled* homodimérico ( $\text{\AA}^2 = 1673,80$ ) com o *coiled-coil* heterodimérico ( $\text{\AA}^2 = 1900,80$ ) (Figura 41B), a área de contato do *coiled-coil* heterodimérico é maior. A maior quantidade de fenilalaninas presentes na interface seria o motivo da diferença dos valores da energia de interação e do  $T_m$ , tendo o *coiled-coil* heterodimérico o valor altamente negativo da energia de interação e  $T_m$  alto.<sup>126</sup> Estas características em conjunto fazem do *coiled-coil* heterodimérico uma estrutura fundamental na montagem e na manutenção da estabilidade de uma septina com outra no filamento, permitindo inclusive a montagem de uma septina não parceira, como mostrado nestetrabalho.

A interface G homodimérica entre duas septinas do Grupo I, ainda é uma questão em aberto. No entanto, há evidências que apontam funções celulares específicas que somente os membros deste grupo poderiam realizar.<sup>143-145</sup> Um exemplo disso é que SEPT9 humana é reportada com capacidade de formar homofilamentos com função fisiológica.<sup>146</sup> Os valores da energia de interação ação mostrados reforçam esta possibilidade, pois, embora seja uma interface mais fraca entre as demais interfaces G, ainda é uma interface mais estável que a NC nativa (Figura 40 e Tabela A1 do Apêndice), como já foi discutido.

### 5.15 Proposta do modelo do heterocomplexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/7C

Na Figura 42, o modelo do hexâmero quimérico é mostrado. A inclusão da quimera SEPT9G/h7C no lugar de SEPT7 cria duas interfaces não canônicas: (1) a interface NC entre a quimera e SEPT6 e (2) uma interface G homodimérica ao centro, entre duas subunidades de SEPT9G/h7C. A interface 1 inclui a interação heterodimérica entre os C-terminais, essencial para a orientação e montagem do oligômero, destacando a função dos *coiled-coils* na montagem de filamentos de septinas.<sup>90,126-127</sup>

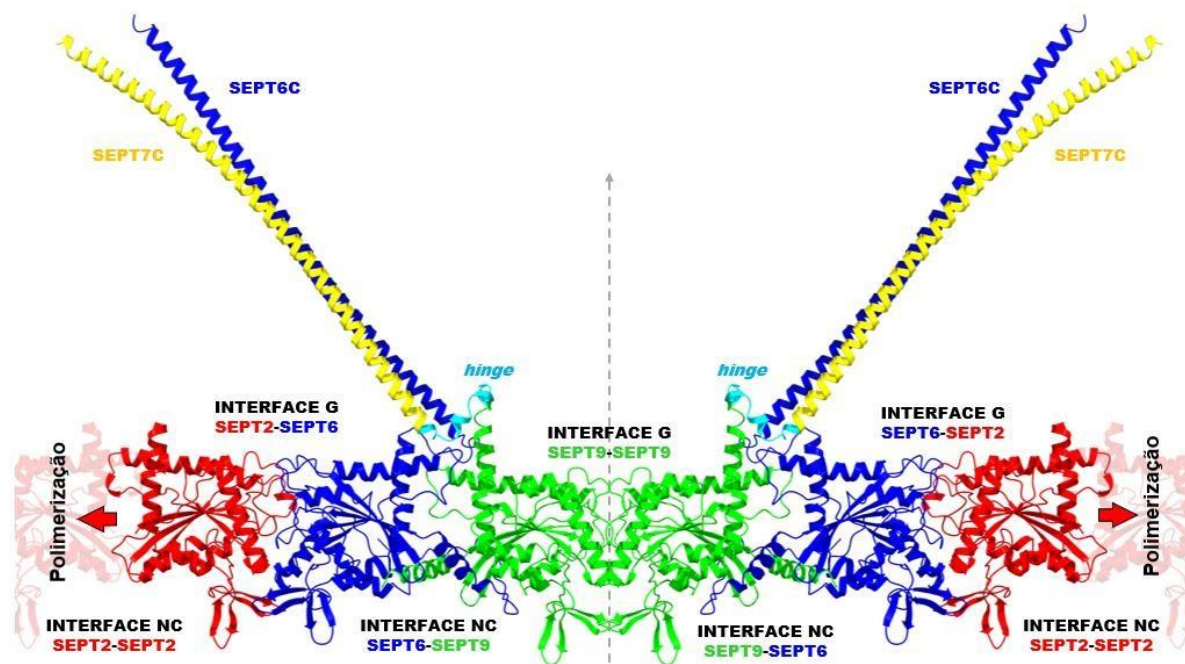


Figura 42 - Modelo do heterocomplexo hexamérico SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C-SEPT9G/h7C-SEPT6-SEPT2G. São mostradas as interfaces G e NC possíveis num hexâmero quimérico, formado a partir da interação entre SEPT2G (vermelho), SEPT6 (azul) e entre a quimera, formada pelo domínio G da SEPT9 (verde) e o domínio C-terminal da SEPT7 (amarelo), com o *hinge* em azul claro. O domínio C-terminal da SEPT6 (que não é visualizado na estrutura das septinas depositados no PDB, devido à ausência de densidade) e a quimera (SEPT9G/7C), foram modelados por AlphaFold2. A seta reta representa o eixo de simetria rotacional de ordem-2 e as setas horizontais indicam a direção de polimerização através da interface NC homodimérica da SEPT2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pela adição do C-terminal da SEPT7 em SEPT9G, foi criada uma nova interface NC entre SEPT6 e SEPT9, que não se espera ocorrer em filamentos fisiológicos (Figura 32 e 42). Baseando-se nas informações estruturais disponíveis, verificou-se que a composição dos resíduos da hélice  $\alpha 0$  em SEPT9 é diferente de outros grupos, o que poderia gerar alguma instabilidade na parte inferior desta nova interface. Porém, isto seria compensado pela alta estabilidade trazida pelo *coiled-coil* heterodimérico entre SEPT6-quimera, já descrito para SEPT6-SEPT7.<sup>126,147</sup>

Por outro lado, é possível que a interface 2 não esteja se formando corretamente ou que seja muito instável. Sabe-se que SEPT9 pode formar essa interface,<sup>146</sup> embora, *in vitro*, SEPT3 (homóloga de SEPT9), exigiu a mutação T282Y para cristalizar com o parceiro nativo, SEPT7 (PDB: 6UQQ).<sup>83,106,107</sup> Entretanto, a presença de dois resíduos do SUE (His e Trp), a His interagindo com Trp da subunidade vizinha, estariam ajudando na formação desta interface.<sup>146</sup>



## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As septinas cumprem funções fisiológicas quando formam heterofilamentos pela interação entre suas subunidades pelas interfaces G e NC do domínio G. Na literatura, há informações sobre a posição das subunidades e os tipos de interfaces, mas há poucos trabalhos sobre a troca de regiões de septinas. Este trabalho, permitiu explorar a importância da região C-terminal da septina 7 humana na seleção de parceiros de interação, através da produção de uma construção quimérica, assim como propor um modelo de um potencial hexâmero.

Inicialmente, duas versões quiméricas foram geradas, ambas utilizando o domínio 9G e 7C, mas diferindo pela presença ou não de uma região de ligação flexível, chamada *hinge*. Os resultados obtidos para ambas construções mostraram que eram capazes de interagir com SEPT2G-SEPT6, já que eram coeluídas da cromatografia de afinidade pela qual somente a quimera poderia ser capturada. Assim, foi possível determinar que SEPT9G provavelmente está ocupando a posição de SEPT7 no oligômero, em função da inclusão do C-terminal da SEPT7.

A presença do *hinge* na construção produziu um complexo SEPT2G-SEPT6-SEPT9G/h7C mais homogêneo e trouxe mais plasticidade à interface NC de SEPT9, permitindo uma reorganização para interagir com SEPT6. Porém, pelas análises de microscopia ainda não foi possível confirmar se este complexo pode se montar num hexâmero.

Buscando entender a interação entre as interfaces, foi realizada a modelagem do complexo de SEPT9G/h7C com SEPT6, o que permitiu identificar a presença de resíduos aromáticos (sobretudo Phe) na interface de contato entre o *coiled-coil* heterodimérico formado, aumentando a área de contato e proporcionando maior estabilidade nesta interface.

Além disso, a inclusão da quimera SEPT9G/h7C, uma vez se organizando num hexâmero, formará novas interfaces, as quais foram também analisadas: uma interface NC entre a SEPT9G/h7C e SEPT6 e a interface G entre SEPT9G/h7C-SEPT9G/h7C. Seria improvável uma interface NC nova se formar naturalmente sob condições fisiológicas, pois os resíduos da hélice  $\alpha 0$  em SEPT9 deveriam gerar instabilidade nesta interação. Entretanto, a formação desta interface pode passar a ocorrer se estabilizada pela adição do C-terminal da SEPT7 em SEPT9G. A segunda interface nova trazida pela quimera, a interface G SEPT9G/h7C-SEPT9G/h7C, mostra pelo modelo uma ponte  $\beta$  intermolecular, presente em todas as interfaces

G canônicas das septinas estabilizando a região superior da interface. Por outro lado, na parte média e baixa (meandro  $\beta$ ) desta interface é instável.

Em conjunto, os resultados mostraram a formação de complexos quiméricos, compatíveis com hexâmeros para a quimera contendo o *hinge*, o que reforça o quão determinante é a região C-terminal para a correta seletividade do parceiro de interação.

Como perspectiva futura, ainda é necessário melhorar a estabilidade do heterocomplexo, o que pode ser feito através de mutações específicas já discutidas, e preparar amostras mais estáveis para microscopia de transmissão eletrônica (contrastação negativa), juntamente com anticorpos específicos para localizar a posição da quimera no oligômero.

## REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 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, 1971.
- 3 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**, v. 66, n. 2, p. 352-359, 1970.
- 4 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 717-721, 1976.
- 5 HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678-3687, 1987.
- 6 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother-budneck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681-689, 2001.
- 7 FARKAŠOVSKÝ, M. Septin architecture and function in budding yeast. **Biological Chemistry**, v. 401, n. 8, p. 903-919, 2020.
- 8 MENON, M. B.; GAESTEL, M. Sep(t)arate or not – how some cells take septin-independent routes through cytokinesis. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 10, p. 1877-1886, 2015.
- 9 MEITINGER, F.; PALANI, S.; HUB, B.; PEREIRA, G. Dual function of the NDR-kinase Dbf2 in the regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 9, p. 1253-1503, 2013.
- 10 FINNIGAN, G. C.; BOOTH, E. A.; DUVALYAN, A.; LIAO, E. N.; THORNER, J. The carboxy-terminal tails of septins Cdc11 and Shs1 recruit myosin-II binding factor Bni5 to the bud neck in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 200, n. 3, p. 821-840, 2015.
- 11 MARQUARDT, J.; CHEN, X.; BI, E. Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 76, n. 1, p. 7-14, 2019.
- 12 DOLAT, L.; HUNYARA, J. L.; BOWEN, J. R.; KARASMANIS, E.P.; ELGAWLY, M.; GALKIN, V.E.; SPILIOTIS, E.T. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. **Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 2, p. 225-235, 2014.
- 13 DOLAT, L.; HU, Q.; SPILIOTIS, E.T. Septin functions in organ system physiology and pathology. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 123-141, 2014.
- 14 MOSTOWY, S.; JANEL, S.; FORESTIER, C.; RODUIT, C.; KASAS, S.; PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P.; LAFONT, F. A role for septins in the interaction between the

Listeria monocytogenes invasion protein InlB and the Met receptor. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 8, p. 1949-1959, 2011.

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

16 HALL, P.A.; RUSSELL, S.H. Mammalian septins: dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 287-299, 2012.

17 LASSEN, L.B.; FÜCHTBAUER, A.; SCHMITZ, A.; SØRENSEN, A.B.; PEDERSEN, F.S.; FÜCHTBAUER, E.M. Septin9 is involved in T-cell development and CD8+ T-cell homeostasis. **Cell and Tissue Research**, v. 352, n. 3, p. 695-705, 2013.

18 GILDEN, J.K.; PECK, S.; CHEN, Y.C.M.; KRUMMEL, M.F. The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 1, p. 103-114, 2012.

19 PHATARPEKAR, P. V.; OVERLEE, B.L.; LEEHAN, A.; WILTON, K.M.; HAM, H.; BILLADEAU, D.D. The septin cytoskeleton regulates natural killer cell lytic granule release. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 11, p. e202002145, 2020.

20 MENDONÇA, D.C.; GUIMARÃES, S.L.; PEREIRA, H.D.M.; PINTO, A.A.; DE FARIAS, M.A.; DE GODOY, A.S.; ARAUJO, A.P.U.; VAN HEEL, M.; PORTUGAL, R. V.; GARRATT, R.C. An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 15, p.16796, 2021.

21 TANAKA-TAKIGUCHI, Y.; KINOSHITA, M.; TAKIGUCHI, K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. **Current Biology**, v. 19, n. 2, p. 140-145, 2009.

22 SIMI, A.K.; ANLAŞ, A.A.; STALLINGS-MANN, M.; ZHANG, S.; HSIA, T.; CICHON, M.; RADISKY, D.C.; NELSON, C.M. A soft microenvironment protects from failure of midbody abscission and multinucleation downstream of the emt-promoting transcription factor snail. **Cancer Research**, v. 78, n. 9, p. 2277-2289, 2018.

23 PARDO-PASTOR, C.; RUBIO-MOSCARDO, F.; VOGEL-GONZÁLEZ, M.; SERRA, S.A.; AFTHINOS, A.; MRKONJIC, S.; DESTAING, O.; ABENZA, J.F.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; TREPAT, X.; ALBIGES-RIZO, C.; KONSTANTOPOULOS, K.; VALVERDE, M.A. Piezo2 channel regulates RhoA and actin cytoskeleton to promote cell mechanobiological responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 8, p. 1925-1930, 2018.

24 COSTE, B.; MATHUR, J.; SCHMIDT, M.; EARLEY, T.J.; RANADE, S.; PETRUS, M.J.; DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 55-60, 2010.

25 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KÜHLMANN, D.; MACARA, I.G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOFER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311-315, 2007.



- 26 SCHMIDT, K.; NICHOLS, B.J. Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. **BMC Cell Biology**, v. 5, p. 1-13, 2004. DOI:10.1186/1471-2121-5-43.
- 27 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.
- 28 ZERAIK, A.E.; PEREIRA, H.M.; SANTOS, Y. V.; BRANDÃO-NETO, J.; SPOERNER, M.; SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, A.P.U.; DEMARCO, R. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7799-7811, 2014.
- 29 CANNON, K.S.; WOODS, B.L.; CRUTCHLEY, J.M.; GLADFELTER, A.S. An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 4, p. 1128-1137, 2019.
- 30 WOODS, B.L.; GLADFELTER, A.S. State of the septin cytoskeleton from assembly to function. **Current Opinion Cell Biology**, v. 68, p. 105-112, 2021.
- 31 KINOSHITA, M. Insight into septin functions from mouse models. *In*: HALL, P.; RUSSELL, H.; PRINGLEY, J. R. **The Septins**, New York: John Wiley, 2008. p. 319-336.
- 32 HU, J.; BAI, X.; BOWEN, J.R.; DOLAT, L.; KOROBOVA, F.; YU, W.; BAAS, P.W.; SVITKINA, T.; GALLO, G.; SPILIOTIS, E.T. Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. **Current Biology**, v. 22, n. 12, p. 1109-1115, 2012.
- 33 FALK, J.; BOUBAKAR, L.; CASTELLANI, V. Septins functions during neuro-development, a yeast perspective. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 57, p. 102-109, 2019.
- 34 SPILIOTIS, E.T.; HUNT, S.J.; HU, Q.; KINOSHITA, M.; NELSON, W.J. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 2, p. 295-303, 2008.
- 35 BOWEN, J.R.; HWANG, D.; BAI, X.; ROY, D.; SPILIOTIS, E.T. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 187-197, 2011.
- 36 HU, Q.; MILENKOVIC, L.; JIN, H.; SCOTT, M.P.; NACHURY, M. V; SPILIOTIS, E.T.; NELSON, W.J. A Septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436-439, 2010.
- 37 GHOSSOUB, R.; HU, Q.; FAILLER, M.; ROUYEZ, M.C.; SPITZBARTH, B.; MOSTOWY, S.; WOLFRUM, U.; SAUNIER, S.; COSSART, P.; NELSON, W.J.; BENMERAH, A. Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 12, p. 2583-2594, 2013.

- 38 LOPEZ, J.A.; ANDREWS, R.K.; VAHID, A.K.; BERNDT, M.C. Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1043-1052, 1998.
- 39 CERVEIRA, N.; BIZARRO, S.; TEIXEIRA, M.R. MLL-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 713-724, 2011.
- 40 MUNTEAN, A.G.; HESS, J.L. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. **Annual Review of Pathology: mechanisms of disease**, v. 7, n. 1, p. 283-301, 2012.
- 41 PENNINGTON, K.; BEASLEY, C.L.; DICKER, P.; FAGAN, A.; ENGLISH, J.; PARIANTE, C.M.; WAIT, R.; DUNN, M.J.; COTTER, D.R. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 12, p. 1102-1117, 2008.
- 42 SITZ, J.H.; BAUMGÄRTEL, K.; HÄMMERLE, B.; PAPADOPOULOS, C.; HEKERMAN, P.; TEJEDOR, F.J.; BECKER, W.; LUTZ, B. The down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. **Neuroscience**, v. 157, n. 3, p. 596-605, 2008.
- 43 KINOSHITA, A.; KINOSHITA, M.; AKIYAMA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; KUMAR, S.; NODA, M.; KIMURA, J. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551-1560, 1998.
- 44 IHARA, M.; YAMASAKI, N.; HAGIWARA, A.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; HIKAWA, R.; TOMIMOTO, H.; NODA, M.; TAKANASHI, M.; MORI, H.; HATTORI, N.; MIYAKAWA, T.; KINOSHITA, M. Sept4, a Component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity. **Neuron**, v. 53, n. 4, p. 519-533, 2007.
- 45 KISSEL, H.; GEORGESCU, M.M.; LARISCH, S.; MANOVA, K.; HUNNICUTT, G.R.; STELLER, H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 353-364, 2005.
- 46 LIN, Y.H.; LIN, Y.M.; WANG, Y.Y.; YU, I.S.; LIN, Y.W.; WANG, Y.H.; WU, C.M.; PAN, H.A.; CHAO, S.C.; YEN, P.H.; LIN, S.W.; KUO, P.L. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1857-1868, 2009.
- 47 RUSSELL, S.E.H.; MCILHATTON, M.A.; BURROWS, J.F.; DONAGHY, P.G.; CHANDULOY, S.; PETTY, E.M.; KALIKIN, L.M.; CHURCH, S.W.; MCILROY, S.; HARKIN, D.P.; KEILTY, G.W.; CRANSTON, A.N.; WEISSENBACH, J.; HICKEY, I.; JOHNSTON, P.G. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors1. **Cancer Research**, v. 60, n. 17, p. 4729-4734, 2000.
- 48 ZIEGER, B.; TRAN, H.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; ZGAGA-GRIESZ, A.; BLASER, S.; WARE, J. Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNU TL1 and PNU TL2. **Gene**, v. 261, n. 2, p. 197-203, 2000.
- 49 TANAKA, M.; TANAKA, T.; KIJIMA, H.; ITOH, J.; MATSUDA, T.; HORI, S.; YAMAMOTO, M. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel

human septin family gene, Bradeion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 3, p. 547-553, 2001.

50 WARREN, J. D.; XIONG, W.; BUNKER, A. M.; VAUGHN, C.P.; FURTADO, L. V.; ROBERTS, W.L.; FANG, J.C.; SAMOWITZ, W.S.; HEICHMAN, K. A. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. **BMC Medicine**, v. 9, n.133, 2011. DOI:10.1186/1741-7015-9-133.

51 SIDHAYE, V.K.; CHAU, E.; BREYSSE, P.N.; KING, L.S. Septin-2 mediates airway epithelial barrier function in physiologic and pathologic conditions. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 120-126, 2011.

52 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.

53 CONNOLLY, D.; ABDESSELAM, I.; VERDIER-PINARD, P.; MONTAGNA, C. Septin roles in tumorigenesis. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 725-738, 2011.

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

55 GÖNCZI, M.; DIENES, B.; DOBROSI, N.; FODOR, J.; BALOGH, N.; OLÁH, T.; CSERNOCH, L. Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 42, n. 2, p. 251-265, 2021.

56 ONISHI, M.; PRINGLE, J.R. The nonopisthokont septins: How many there are, how little we know about them, and how we might learn more. **Methods in Cell Biology**, v. 136. p. 1-19, 2016. DOI: 10.1016/BS.MCB.2016.04.003.

57 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J.R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 681-687, 2011.

58 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

59 GARGE, R.K.; LAURENT, J.M.; KACHROO, A.H.; MARCOTTE, E.M. Systematic humanization of the yeast cytoskeleton. **Genetics**, v. 215, n. 4, p. 1153-1169, 2020.

60 KACHROO, A.H.; LAURENT, J.M.; YELLMAN, C.M.; MEYER, A.G.; WILKE, C.O.; MARCOTTE, E.M. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 921-925, 2015.

61 LAURENT, J.M.; YOUNG, J.H.; KACHROO, A.H.; MARCOTTE, E.M. Efforts to make and apply humanized yeast. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, n.2, p. 155-163. 2016.

62 CAVINI, I.A.; LEONARDO, D.A.; ROSA, H. V.D.; CASTRO, D.K.S.V.; D'MUNIZ PEREIRA, H.; VALADARES, N.F.; ARAUJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. The structural

biology of septins and their filaments: an update. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n.765085, p. 1-25, Nov.2021.

63 LEIPE, D.D.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41-72, 2002.

64 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.

65 NAKAHIRA, M.; MACEDO, J.N.A.; SERAPHIM, T.V.; CAVALCANTE, N.; SOUZA, T.A.C.B.; DAMALIO, J.C.P.; REYES, L.F.; ASSMANN, E.M.; ALBORGHETTI, M.R.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U.; ZANCHIN, N.I.T.; BARBOSA, J.A.R.G.; KOBARG, J. A Draft of the human septin interactome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p.e13799, 2010.

66 SANDROCK, K.; BARTSCH, I.; BLÄSER, S.; BUSSE, A.; BUSSE, E.; ZIEGER, B. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 751-761, 2011.

67 SELLIN, M.E.; HOLMFELDT, P.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 23, p. 4588-4601, 2011.

68 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183-194, 2012.

69 VALADARES, N.F.; D' MUNIZ PEREIRA, H.; ULIAN ARAUJO, A.P.; GARRATT, R.C. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017.

70 GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A.P.U.; OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M.R.M.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C. Dissection of a Human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry**, v. 45, n. 46, p. 13918-13931, 2006.

71 KESISOVA, I.A.; ROBINSON, B.P.; SPILIOTIS, E.T. A septin GTPase scaffold of dynein–dynactin motors triggers retrograde lysosome transport. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 2, p. e202005219, 2021.

72 NAGATA, K.I.; INAGAKI, M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. **Oncogene**, v. 24, n. 1, p. 65-76, 2005.

73 DIESENBERG, K.; BEERBAUM, M.; FINK, U.; SCHMIEDER, P.; KRAUSS, M. SEPT9 negatively regulates ubiquitin-dependent downregulation of EGFR. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 2, p. 397-407, 2015.

74 VAN DAMME, P.; LASA, M.; POLEVODA, B.; GAZQUEZ, C.; ELOSEGUI-ARTOLA, A.; KIM, D.S.; DE JUAN-PARDO, E.; DEMEYER, K.; HOLE, K.; LARREA, E.; TIMMERMAN, E.; PRIETO, J.; ARNESEN, T.; SHERMAN, F.; GEVAERT, K.; ALDABE, R. N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase

NatB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12449-12454, 2012.

75 ZHOU, H.; DI PALMA, S.; PREISINGER, C.; PENG, M.; POLAT, A.N.; HECK, A.J.R.; MOHAMMED, S. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 1, p. 260-271, 2013.

76 RIBET, D.; BOSCAINI, S.; CAUVIN, C.; SIGUIER, M.; MOSTOWY, S.; ECHARD, A.; COSSART, P. SUMOylation of human septins is critical for septin filament bundling and cytokinesis. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 12, p. 4041-4052, 2017.

77 KIM, M.S.; FROESE, C.D.; XIE, H.; TRIMBLE, W.S. Uncovering principles that control septin-septin interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30406-30413, 2012.

78 WEEMS, A.; MCMURRAY, M. The step-wise pathway of septin heterooctamer assembly in budding yeast. **eLife**, v. 6, p.e23689, 2017.

79 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.

80 SOROOR, F.; KIM, M.S.; PALANDER, O.; BALACHANDRAN, Y.; COLLINS, R.F.; BENLEKBIR, S.; RUBINSTEIN, J.L.; TRIMBLE, W.S. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 3, p. 289-300, 2021.

81 PAI, E.F.; KABSCH, W.; KRENGEL, U.; HOLMES, K.C.; JOHN, J.; WITTINGHOFER, A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. **Nature**, v. 341, n. 6239, p. 209-214, 1989.

82 PAI, E.F.; KRENGEL, U.; PETSKO, G.A.; GOODY, R.S.; KABSCH, W.; WITTINGHOFER, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: Implications for the mechanism of GTP hydrolysis. **EMBO Journal**, v. 9, n. 8, p. 2351-2359, 1990.

83 ROSA, H.V.D.; LEONARDO, D.A.; BROGNARA, G.; BRANDÃO-NETO, J.; D'MUNIZ PEREIRA, H.; ARAÚJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. Molecular Recognition at Septin Interfaces: The Switches Hold the Key. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 21, p. 5784-5801, 2020.

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

85 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**, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.

86 VERSELE, M.; GULLBRAND, B.; SHULEWITZ, M.J.; CID, V.J.; BAHMANYAR, S.; CHEN, R.E.; BARTH, P.; 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, n. 10, p. 4568-4583, 2004.

87 WALSHAW, J.; WOOLFSON, D.N. Extended knobs-into-holes packing in classical and complex coiled-coil assemblies. **Journal of Structural Biology**, v. 144, n. 3, p. 349-361, 2003.

88 LUPAS, A.N.; BASSLER, J. Coiled coils &#x2013; a model system for the 21st century. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 130-140, 2017.

89 WOOLFSON, D.N. Coiled-coil design: updated and upgraded. **Subcell Biochemistry**, v. 82, p. 35-61, 2017.

90 LEONARDO, D.A.; CAVINI, I.A.; SALA, F.A.; MENDONÇA, D.C.; ROSA, H.V.D.; KUMAGAI, P.S.; CRUSCA JR, E.; VALADARES, N.F.; MARQUES, I.A.; BRANDÃO-NETO, J.; MUNTE, C.E.; KALBITZER, H.R.; SOLER, N.; USÓN, I.; ANDRÉ, I.; ARAUJO, A.P.U.; D'MUNIZ PEREIRA, H.; GARRATT, R.C. Orientational ambiguity in septin coiled coils and its structural basis. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 9, p. 166889, 2021.

91 MELA, A.; MOMANY, M. Septin mutations and phenotypes in *S. cerevisiae*. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 1, p. 33-44, 2019.

92 TAVENEAU, C.; BLANC, R.; PÉHAU-ARNAUDET, G.; DI CICCIO, A.; BERTIN, A. Synergistic role of nucleotides and lipids for the self-assembly of Shs1 septin oligomers. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 14, p. 2697-2714, 2020.

93 WOODS, B.L.; CANNON, K.S.; VOGT, E.J.D.; CRUTCHLEY, J.M.; GLADFELTER, A.S. Interplay of septin amphipathic helices in sensing membrane-curvature and filament bundling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 20, p. 1-9, 2021.

94 JOHN, C.M.; HITE, R.K.; WEIRICH, C.S.; FITZGERALD, D.J.; JAWHARI, H.; FATY, M.; SCHLÄPFER, D.; KROSCHEWSKI, R.; WINKLER, F.K.; WALZ, T.; BARRAL, Y.; STEINMETZ, M.O. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296-3307, 2007.

95 BERTIN, A.; MCMURRAY, M.A.; GROB, P.; PARK, S.S.; GARCIA, G.; PATANWALA, I.; NG, H.L.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.

96 OEGEMA, K.; DESAI, A.; LIE WONG, M.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C.M.B.T.M. in E. Purification and assay of a septin complex from *Drosophila* embryos. *In: Methods in Enzymology*, v. 298. p. 279-295, 1998.

97 FRAZIER, J.A.; WONG, M.L.; LONGTINE, M.S.; PRINGLE, J.R.; MANN, M.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C. 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.

98 MORTENSEN, U.H.; ERDENIZ, N.; FENG, Q.; ROTHSTEIN, R. A molecular genetic

dissection of the evolutionarily conserved N terminus of yeast Rad52. **Genetics**, v. 161, n. 2, p. 549-562, 2002.

99 GARCIA, G.; BERTIN, A.; LI, Z.; SONG, Y.; MCMURRAY, M.A.; THORNER, J.; NOGALES, E. Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 6, p. 993-1004, 2011.

100 KIM, M.S.; FROESE, C.D.; ESTEY, M.P.; TRIMBLE, W.S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815-826, 2011.

101 SELLIN, M.E.; SANDBLAD, L.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 17, p. 3152-3164, 2011.

102 SHEFFIELD, P.J.; OLIVER, C.J.; KREMER, B.E.; SHENG, S.; SHAO, Z.; MACARA, I.G. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3483-3488, 2003.

103 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.

104 MENDONÇA, D.C.; MACEDO, J.N.; GUIMARÃES, S.L.; BARROSO DA SILVA, F.L.; CASSAGO, A.; GARRATT, R.C.; PORTUGAL, R. V; ARAUJO, A.P.U. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 9-10, p. 457-466, 2019.

105 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 791-797, 2011.

106 MACEDO, J.N.A.; VALADARES, N.F.; MARQUES, I.A.; FERREIRA, F.M.; DAMALIO, J.C.P.; PEREIRA, H.M.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 95-105, 2013.

107 CASTRO, D.K.S.V.; SILVA, S.M.O.; PEREIRA, H.D.; MACEDO, J.N.A.; LEONARDO, D.A.; VALADARES, N.F.; KUMAGAI, P.S.; BRANDAO-NETO, J.; ARAUJO, A.P.U.; GARRATT, R.C. A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. **IUCrJ**, v. 7, Pt. 3, p. 462-479, 2020.

108 GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A.P.U.; LARA, F.; FOGUEL, D.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the gtpase domain of human septin 4 (sept4/bradeion- $\beta$ ) forms amyloid-like filaments in vitro. **Biochemistry**, v. 46, n. 39, p. 11101-11109, 2007.

109 PISSUTI DAMALIO, J.C.; GARCIA, W.; ALVES MACÊDO, J.N.; DE ALMEIDA MARQUES, I.; ANDREU, J.M.; GIRALDO, R.; GARRATT, R.C.; ULIAN ARAÚJO, A.P. Self-assembly of human septin 2 into amyloid filaments. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 628-636, 2012.

110 AUSUBEL, F.M. **Short protocols in molecular biology**: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th ed. New York: Wiley, 2002.

111 SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring, 2001. v. 1. 116 p.

112 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.

113 HILLEBRAND, S.; GARCIA, W.; CANTÚ, M.D.; DE ARAÚJO, A.P.U.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C.; CARRILHO, E. In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 1, p. 92-97, 2005.

114 JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S.A.A.; BALLARD, A.J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A.W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

115 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.

116 LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

117 EINSENBURG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J. Verify3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997.

118 JOHNSON, C.R.; WEEMS, A.D.; BREWER, J.M.; THORNER, J.; MCMURRAY, M.A. Cytosolic chaperones mediate quality control of higher-order septin assembly in budding yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 7, p. 1323-1344, 2015.

119 IV, F.; MARTINS, C.S.; CASTRO-LINARES, G.; TAVENEAU, C.; BARBIER, P.; VERDIER-PINARD, P.; CAMOIN, L.; AUDEBERT, S.; TSAI, F.C.; RAMOND, L.; LLEWELLYN, A.; BELHABIB, M.; NAKAZAWA, K.; DI CICCIO, A.; VINCENTELLI, R.; WENGER, J.; CABANTOUS, S.; KOENDERINK, G.H.; BERTIN, A.; MAVRAKIS, M. Insights into animal septins using recombinant human septin octamers with distinct SEPT9 isoforms. **Journal of Cell Science**, v. 134, n. 15, p. 1-19, 2021.

120 HASSELL, D.; DENNEY, A.; SINGER, E.; BENSON, A.; ROTH, A.; CEGLOWSKI, J.; STEINGESSER, M.; MCMURRAY, M. Chaperone requirements for de novo folding of *Saccharomyces cerevisiae* septins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 33, n. 12, p.111, 2022.



- 121 DENNEY, A.S.; WEEMS, A.D.; MCMURRAY, M.A. Selective functional inhibition of a tumor-derived p53 mutant by cytosolic chaperones identified using split-YFP in budding yeast. **G3: genes, genomes, genetics**, v. 11, n. 9, 2021.
- 122 LUNDIN, V.F.; LEROUX, M.R.; STIRLING, P.C. Quality control of cytoskeletal proteins and human disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 288-297, 2010.
- 123 KIM, Y.E.; HIPPEL, M.S.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M.; ULRICH HARTL, F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 323-355, 2013.
- 124 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 169-180, 2014.
- 125 BRAUSEMANN, A.; GERHARDT, S.; SCHOTT, A.K.; EINSLE, O.; GROSSE-BERKENBUSCH, A.; JOHNSON, N.; GRONEMEYER, T. Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Structural Biology**, v. 193, n. 3, p. 157-161, 2016.
- 126 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.
- 127 ALMEIDA MARQUES, I.; VALADARES, N.F.; GARCIA, W.; DAMALIO, J.C.P.; MACEDO, J.N.A.; DE ARAÚJO, A.P.U.; BOTELLO, C.A.; ANDREU, J.M.; GARRATT, R.C. Septin C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 2, p. 317-328, 2012.
- 128 LOW, C.; MACARA, I.G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697-30706, 2006.
- 129 VINCENT, T.L.; GREEN, P.J.; WOOLFSON, D.N. LOGICOIL: multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2013.
- 130 SZCZEPANIAK, K.; BUKALA, A.; DA SILVA NETO, A.M.; LUDWICZAK, J.; DUNIN-HORKAWICZ, S. A library of coiled-coil domains: from regular bundles to peculiar twists. **Bioinformatics**, v. 36, n. 22-23, p. 5368-5376, 2020.
- 131 CRICK, F.H.C. The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils. **Acta Crystallographica**, v. 6, n. 8-9, p. 689-697, 1953.
- 132 DUNIN-HORKAWICZ, S.; LUPAS, A.N. Measuring the conformational space of square four-helical bundles with the program samCC. **Journal of Structural Biology**, v. 170, n. 2, p. 226-235, 2010.
- 133 KÜHNEL, K.; JARCHAU, T.; WOLF, E.; SCHLICHTING, I.; WALTER, U.; WITTINGHOFER, A.; STRELKOV, S. V. The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17027-17032, 2004.

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

135 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774-797, 2007.

136 SASIDHARAN, S.; NAG, N.; TRIPATHI, T.; SAUDAGAR, P. Experimental methods to study the thermodynamics of protein-protein interactions. *In*: TRIPATHI, T.; DUBEY, V. K. (ed.). **Advances in protein molecular and structural biology methods**. New York: Academic Press, 2022. p. 103-114.

137 HARBURY, P.; ZHANG, T.; KIM, P.; ALBER, T. A Switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in *gcn4* leucine zipper mutants. **Science**, v. 262, n.1, p. 26, 1993.

138 FLETCHER, J.M.; BOYLE, A.L.; BRUNING, M.; BARTLETT, Sg.J.; VINCENT, T.L.; ZACCAI, N.R.; ARMSTRONG, C.T.; BROMLEY, E.H.C.; BOOTH, P.J.; BRADY, R.L.; THOMSON, A.R.; WOOLFSON, D.N. A basis set of de novo coiled-Coil peptide oligomers for rational protein design and synthetic biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 1, n. 6, p. 240-250, 2012.

139 SAKURAI, Y.; MIZUNO, T.; HIROAKI, H.; GOHDA, K.; OKU, J.I.; TANAKA, T. High thermal stability imparted by a designed tandem Arg-Trp stretch in an  $\alpha$ -helical coiled coil. **Angewandte Chemie: international edition**, v. 44, n. 38, p. 6180-6183, 2005.

140 WATERS, M.L. Aromatic interactions in peptides: Impact on structure and function. **Biopolymers: peptide science section**, v. 76, n. 5, p. 435-445, 2004.

141 RHYS, G.G.; DAWSON, W.M.; BEESLEY, J.L.; MARTIN, F.J.O.; BRADY, R.L.; THOMSON, A.R.; WOOLFSON, D.N. How coiled-coil assemblies accommodate multiple aromatic residues. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 5, p. 2010-2019, 2021.

142 TRIPET, B.; WAGSCHAL, K.; LAVIGNE, P.; MANT, C.T.; HODGES, R.S. Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 Amino acid substitutions in position "d." **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 2, p. 377-402, 2000.

143 ESTEY, M.P.; DI CIANO-OLIVEIRA, C.; FROESE, C.D.; BEJIDE, M.T.; TRIMBLE, W.S. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 4, p. 741-749, 2010.

144 KUO, Y.C.; SHEN, Y.R.; CHEN, H.I.; LIN, Y.H.; WANG, Y.Y.; CHEN, Y.R.; WANG, C.Y.; KUO, P.L. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 5, p. 923-934, 2015.

145 KARASMANIS, E.P.; PHAN, C.T.; ANGELIS, D.; KESISOVA, I.A.; HOOGENRAAD, C.C.; MCKENNEY, R.J.; SPILIOTIS, E.T. Polarity of neuronal membrane traffic requires sorting of kinesin motor cargo during entry into dendrites by a microtubule-associated septin. **Developmental Cell**, v. 46, n. 2, p. 204-218.e7, 2018.

146 NAKOS, K.; ROSENBERG, M.; SPILIOTIS, E.T. Regulation of microtubule plus end dynamics by septin 9. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 1, p. 83-91, 2019.

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



## APÊNDICE

### >SEPT9G/7C (sem *hinge*)

GIDSILEQMRRKAMKQGFEFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFLKSKISRKSVQPTSEERIPKTIEIKSITH  
 DIEEKGVRMKLTVIDTPGFGDHINNENCWQPIMKFINDQYEKYLQEEVNINRKKRIPDTRVHCCLYFI  
 PATGHSRLRPLDIEFMKRLSKVVNIIVPIAKADTLTLEERVHFKQRITADLLSNGIDVYPQKEFDEDSE  
 DRLVNEKFREMI PFAVVGSDHEYQVNGKRILGRKTKWGTIEVENTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDI  
 TSSIHFEAYRVKRLNEGSSAQMEERREHVAKMKMEMEMEQVFEMKVKEKVQKLDSEAE LQRRHEQ  
 MKKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTLEKNKKKGKIF

### >SEPT9G/h7C (com *hinge*)

GIDSILEQMRRKAMKQGFEFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFLKSKISRKSVQPTSEERIPKTIEIKSITH  
 DIEEKGVRMKLTVIDTPGFGDHINNENCWQPIMKFINDQYEKYLQEEVNINRKKRIPDTRVHCCLYFI  
 PATGHSRLRPLDIEFMKRLSKVVNIIVPIAKADTLTLEERVHFKQRITADLLSNGIDVYPQKEFDEDSE  
 DRLVNEKFREMI PFAVVGSDHEYQVNGKRILGRKTKWGTIEVENTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDI  
 TSSIHFEAYRVKRLNEGSSTYGVDNKNKGQLTKSPLAQMEERREHVAKMKMEMEMEQVFEMKVKE  
 KVQKLDSEAE LQRRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTLEKNKKKGK  
 IF



Figura A1- Identificação da região  $\alpha 0$  e dos domínios G e C-terminal na sequência de aminoácidos da quimera sem *hinge* (SEPT9G/7C) e com *hinge* (SEPT9G/h7C). A quimera com *hinge* tem mais 18 aminoácidos. A definição dos domínios foi baseada nas informações presentes no *Uniprot*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

**>SEPT6 (Q14141-2)**

MAATDIARQVGEGRCTVPLAGHVGFDSLDPQLVNKSVSQGFCFNILCVGETGLGKSTLMDTLFNTKFE  
 GEPATHTQPGVQLQSNTYDLQESNVRLKLTIVSTVGFQDQINKEDSYKPIVEFIDAQFEAYLQEELKI  
 RRVLHTYHDSRIHVCLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNIIPIIAKADAISKSELTKFKIKITSE  
 LVSNGVQIYQFPTDDESVAEINGTMNAHLPPFAVIGSTEELKIGNKMMRARQYPWGTVQVENEAHCDFV  
 KLREMLIRVNMEDLREQTHTRHYELRCKLEE**MGFKDTPDPSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEE**  
**EMRQMFVQRVKEKEAELKEAEKELHEKFDRLKKLHQDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKTAELLQS**  
**QGSQAGGSQTLKRDKEKKN**

**>SEPT2G (Q15019)**

GFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLTDLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIEERGVLRLTVVDT  
 PGYGDAINCRDCFKTIISYIDEQFERYLHDESGLNRRHIIDNRVHCCFYFISPFHGHLKPLDVAFMKA  
 IHNKVNIVPVIKADTLTLKERERLKKRILDEIEEHNIKIYHLPDAESDEDEDFKEQTRLLKASIPFS  
 VVGSNQLIEAKGKKVRGRLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRTMLITHMQDLQEVTDQLHYENFRSERLKR  
 GG

**>9GC $\alpha$ 0 (Q9UHD8-2[5])**

GIDSILEQMRKAMKQGFEFNIMVVGQSGLGKSTLINTLFKSKISRKSVQPTSEERIPKTIIEIKSITH  
 DIEEKGVRMKLTVIDTPGFGDHINNENCWQPIMKFINDQYEKYLQEEVNINRKKRIPDTRVHCCLYFI  
 PATGHSRLPLDIEFMKRLSKVNIIVPVIKADTLTLLEERVHFKQRITADLLSNGIDVYPQKEFDEDSE  
 DRLVNEKPREMI PFAVVGSDHEYQVNGKRILGRKTKWGTIEVENTHCEFAYLRDLLIRTHMQNIKDI  
 TSSIHFEAYRVKRLNEGSS**AMANGMEEKEPEAPEM**

**>SEPT7NGC (Q16181)**

**MVAQQKNLEGYVGFANLPNQVYRKSVKRGFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLTDLYSPEYPGPSHRI**  
 KKTVQVEQSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPGFGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNAESRVNRRQMPD  
 NRVQCCLYFIAPSGHGLKPLDIEFMKRLHEKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKKQIMKEIQEHKIKIY  
 EFPETDDEEENKLVKIKDRLPLAVVGSNTIIEVNGKRVGRQYPWGVAEVENGEHCDFTIILRNMLIR  
 THMQDLKDVNTNVHYENYRSRKLAAVTYNGVDNNKNKG**QLTKSPLAQMEEERREHVAKMKMEMEQ**  
**VFEMKVKEKVQKLDSEAEIQRREQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTL**  
**EKNKKKGKIF**

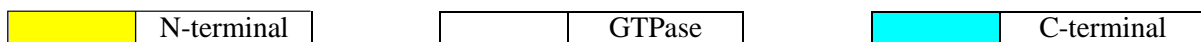


Figura A2- Identificação dos domínios N, G e C-terminal na sequência de aminoácidos das septinas. A identificação dos domínios foi baseada nas informações no *Uniprot* para cada septina estudada. Os códigos de anotações de cada septina estão ao lado de cada nome em parêntesis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela A1 - Análise da estabilidade das interações das interfaces nativas e promiscuas das septinas usando PDB e PISA (EMBL-EBI).

Parâmetros das interfaces								
Interfaces	Septinas	Área de interface (Å <sup>2</sup> )	Energia de interação (Δ <sup>i</sup> G kcal/mol)	P-valor (Δ <sup>i</sup> G)	Ligações de hidrogênio (N <sub>HB</sub> )	Pontes salinas (N <sub>SB</sub> )	Pontes de dissulfeto (N <sub>DS</sub> )	Código PDB
NC	<b>6GC-7GC*</b>	6326,3	-70,0	0,017	67	34	0	AlphaFold2**
	<b>6GC-9GC*</b>	5580,7	-66,0	0,013	54	38	0	AlphaFold2**
	<b>6C-/7C*</b>	1900,8	-35,6	0,040	8	12	0	AlphaFold2**
	<b>6-7</b>	2569,5	-28,0	0,163	21	12	0	7M6J
	<b>6-9</b>	2372,5	-15,0	0,283	39	25	0	AlphaFold2**
	<b>9-9<sup>(f)</sup></b>	1202,0	0,0	0,936	14	12	0	5CYP
	<b>9-9<sup>(a)</sup></b>	574,5	2,6	0,867	15	14	0	5CY0
	<b>3-3</b>	1140,1	7,4	0,9858	15	26	0	4Z54
G	<b>2-6</b>	1748,1	-14,7	0,3944	13	11	0	6UPA
	<b>7-3</b>	1371,8	-11,8	0,401	13	6	0	6UQQ
	<b>7-7</b>	1370,0	-10,7	0,292	16	10	0	6N0B
	<b>3-3</b>	1335,3	-6,4	0,486	24	8	0	4Z54
	<b>7-9</b>	1376,1	-8,0	0,579	18	7	0	6UQQ/ 5CY0
	<b>9-9</b>	1228,8	-3,7	0,845	12	0	0	5CYP/ 5CY0

\* A construção das septinas são com os coiled-coils.

\*\* As estruturas utilizadas para a análise foram de modelos gerados por AlphaFold2.

<sup>(f)</sup> A construção utilizada na análise são SEPT9 com o NC fechado.

<sup>(a)</sup> A construção utilizada na análise são SEPT9 com o NC aberto.

Fonte: Elaborada pelo autor.