

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DEBORAH CEZAR MENDONÇA

Estudos estruturais de complexos de septinas analisados por microscopia eletrônica
de transmissão

São Carlos

2023

DEBORAH CEZAR MENDONÇA

Estudos estruturais de complexos de septinas analisados por microscopia eletrônica
de transmissão

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Richard Charles
Garratt
Co-orientador: Dr. Rodrigo Villares
Portugal

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

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

Mendonça, Deborah Cezar

Estudos estruturais de complexos de septinas analisados por microscopia eletrônica de transmissão / Deborah Cezar Mendonça; orientador Richard Charles Garratt; co-orientador Rodrigo Villares Portugal - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

118 p.

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

1. Septinas. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Análise de partículas isoladas. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Portugal, Rodrigo Villares, co-orient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maurici Mendonça e Cristina Cezar dos Santos, por acreditarem em mim e me darem todo o apoio necessário para enfrentar os diversos desafios da vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao começar a escrever estes agradecimentos, lembrando todos os desafios e conquistas alcançadas, é impossível não reconhecer e me emocionar ao lembrar de todos familiares, amigos e professores que estiveram presentes durante este período, contribuindo não só para o desenvolvimento deste projeto, mas também com um suporte emocional e momentos de descontração, os quais foram essenciais para manter minha motivação e dedicação em extrair o máximo dessa jornada de conhecimento.

Em primeiro lugar, sou eternamente grata ao meus pais, Maurici Mendonça e Cristina Cezar dos Santos, que além do apoio e incentivo incondicionais, também são minhas principais fontes de inspiração em termos de dedicação, caráter e amor. Agradeço por serem minha base e estarem presentes quando eu sempre precisei. Nada disso seria possível sem eles.

Aos familiares, em especial ao meu irmão Augusto, minha avó Marilene e minha cunhada Pipa que sempre ocupam um lugar especial em meu coração.

Ao meu orientador, Richard Garratt, por me guiar e incentivar ao longo desses anos. Sou grata pelas oportunidades, pelos conselhos, pela paciência e pelos incontáveis ensinamentos que me moldaram como pesquisadora. Será sempre uma referência de excelente professor e cientista. Seu entusiasmo pela ciência é uma inspiração.

Aos meus coorientadores, oficiais e não-oficiais: Rodrigo Portugal, Marin van Heel, Ana Paula Araújo e Bruno Klaholz. Agradeço pela colaboração no desenvolvimento do projeto, pela troca de conhecimentos que foram essenciais para a minha carreira e pela amizade.

Aos técnicos do laboratório: Andressa, Bel, Rafael, Humberto e Susana. Agradeço não apenas pelo apoio constante nos experimentos e as discussões que possibilitaram a realização deste trabalho, mas também pela amizade, conversas e momentos de desabafo. Aos secretários: Lhais, Rejane, Claudia e Fernando que me auxiliaram em diversas burocracias.

Aos colegas e amigos que a ciência me proporcionou, em especial, meus

irmãozinhos de coração: Higor V. Dias Rosa, Marcelo A. de Farias e Alfredo Florez Ariza, que por muitas vezes me ajudaram a enfrentar os desafios tanto na ciência quanto na vida pessoal.

Aos vários companheiros de laboratório, com quem partilhei o espaço, os experimentos, a hora do bandeco, do café e a amizade: Jake, Dani, Gabs, Sinara, Samuel, Diego, Jhon, Ítalo, Rafael, Éverton, Heloisa, André Godoy, Ju Mello, Katie e a todos que de alguma forma estiveram presentes nesse período e ajudaram a tornar tudo mais leve.

Aos amigos que conheci durante o meu estágio no IGBMC (França), tanto no laboratório quanto na cidade, que me ajudaram muito e enriqueceram ainda mais essa experiência: Nadine, Otilie, Leo, Samuel, Charles, Yung-Chieh, Pierre, Roberto, Brian, Nimali, Aida, Nils, Alexandre, Daniel, Sabine, Mathilde, Laurent, Hind e Patrick.

Ao meu companheiro de vida, Truta, que acompanhou todo esse processo com muita paciência e leveza, por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma. Agradeço por me apoiar, me entender e compartilhar comigo essa vida maluca. Também sou grata ao Aguinaldo e à Lara, que vieram como bônus, pelo cuidado e carinho.

Aos meus queridos amigos de São Carlos: Raquel, Luana, Maggoo e Ana, Arioli, Thais, Tamara, Japa, Pojo, Isa, Jhow, Ju, Ed, Heitorzinho e a todos que compartilharam comigo momentos tão especiais. Agradeço por contribuírem para que eu sentisse que essa cidade é também um lar.

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, agradeço pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

Às agências de fomento FAPESP (2018/20209-5 e 2021/10247-0) e CAPES (PROEX), pelo auxílio financeiro concedido ao projeto.

A todos que participaram da minha trajetória, direta ou indiretamente, e contribuíram de alguma forma para que eu pudesse seguir em frente e concluir esta tese, expresse minha profunda gratidão.

RESUMO

MENDONÇA, D. C. **Estudos estruturais de complexos de septinas analisados por microscopia eletrônica de transmissão**. 2023.118p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Septinas são GTPases do citoesqueleto capazes de se associar na forma de heterocomplexos, geralmente hexâmeros ou octâmeros, que polimerizam em filamentos que subsequentemente se organizam em estruturas mais complexas como anéis e redes. Elas estão envolvidas em uma série de importantes processos intracelulares incluindo divisão celular, tráfego de vesículas, exocitose, entre outros. Em humanos, alterações no padrão de expressão dessas proteínas ou a presença de mutações estão relacionadas a doenças, como alguns tipos de câncer e distúrbios neurológicos como as doenças de Parkinson e Alzheimer. Entretanto, alguns aspectos mecânicos dessas proteínas ainda não são totalmente compreendidos, incluindo a forma como os heterocomplexos se agrupam corretamente. Neste trabalho, foi possível estudar os complexos de septinas humanas e do urocordado *C. intestinalis* usando microscopia eletrônica de transmissão. Para ambos, a ordem dos complexos hexaméricos (compostos pelas septinas 2, 6 e 7) foi determinada, concluindo que a SEPT2 dos dois organismos está localizada na extremidade do complexo (2-6-7-7-6-2). Especificamente para o complexo humano, esse resultado comprova que a ordem do hexâmero anteriormente aceita na literatura estava invertida, e a correção dessa informação possibilitou a correlação do complexo humano com complexos de outros organismos, além de explicar como os hexâmeros e octâmeros podem compor o mesmo filamento. Para obter detalhes estruturais dos complexos, as estruturas dos dois hexâmeros foram resolvidas por Crio-ME, com resolução de 3.6 Å para o complexo humano e 3.3 Å para o complexo de *C. intestinalis*. A análise da estrutura do complexo humano permitiu a compreensão dos detalhes moleculares da interface formada entre SEPT6 e SEPT7 com uma maior resolução comparada à estrutura cristalográfica precedente. A interface NC apresenta uma cavidade que é fechada em sua base através das hélices $\alpha 0$ das duas subunidades, que incluem uma região polibásica. Elas são mantidas enterradas no interior da interface através da interação desses resíduos básicos com o cotovelo formado entre as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ da subunidade vizinha. A observação do espaço deixado pela cavidade e dos resíduos importantes para estabilizar a hélice $\alpha 0$ em sua posição auxiliam na compreensão de como a interface NC é capaz de sofrer uma mudança conformacional. Adicionalmente, foi possível observar uma flexibilidade do complexo como um todo em uma direção específica, que pode estar relacionada com a maneira que os complexos de septinas interagem com membrana. No caso de *C. intestinalis*, a informação estrutural das três septinas presentes no complexo são inéditas e mostra que a estrutura das septinas e a maneira com que elas interagem a nível molecular são evolutivamente conservadas.

Palavras-chave: Septinas. Microscopia eletrônica de transmissão. Análise de partículas isoladas.

ABSTRACT

MENDONÇA, D. C. **Structural studies of septin complexes analyzed by transmission electron microscopy.** 2023. 118 p. Thesis (Doctor in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Septins are cytoskeletal GTPases capable of associating to form heterocomplexes, usually hexamers or octamers, which polymerize into filaments that subsequently organize into more complex structures such as rings and networks. They are involved in a number of important intracellular processes including cell division, vesicle trafficking, exocytosis, among others. In humans, changes in the expression pattern of these proteins or the presence of mutations are related to diseases, such as some types of cancer and neurological disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. However, some mechanical aspects of these proteins are still not fully understood, including how heterocomplexes assemble correctly. In this work, the complexes of human and urochordate *C. intestinalis* septins were studied using transmission electron microscopy. For both, the order of the hexameric complexes (composed of septins 2, 6 and 7) was determined, concluding that the SEPT2 of both organisms is located at the end of the complex (2-6-7-7-6-2). Specifically for the human complex, this result proves that the order of the hexamer previously accepted in the literature was inverted, and the correction of this information made it possible to correlate the human complex with complexes from other organisms, in addition to explaining how hexamers and octamers can be part of the same filament. To obtain structural details of the complexes, the structures of the two hexamers were solved by Cryo-EM, with a resolution of 3.6 Å for the human complex and 3.3 Å for the *C. intestinalis* complex. The structural analysis of the human complex allowed the understanding of the molecular details of the interface formed between SEPT6 and SEPT7 with a higher resolution compared to the previous crystallographic structure. The NC interface features a cavity that is closed at its base by the $\alpha 0$ helices of the two subunits, which include a polybasic region. They are kept buried within the interface through the interaction of these basic residues with the elbow formed between the $\alpha 5$ and $\alpha 6$ helices of the neighboring subunit. Observing the space left by the cavity and the important residues to stabilize the $\alpha 0$ helix in its position help to understand how the NC interface is capable of undergoing a conformational change. Additionally, it was possible to observe a flexibility of the complex as a whole in a specific direction, which may be related to the way that the septin complexes interact with membranes. In the case of *C. intestinalis*, the structural information of the three septins present in the complex is unprecedented and shows that the structure of the septins and the way they interact at the molecular level are evolutionarily conserved.

Keywords: Septins. Transmission electron microscopy. Single particle analysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– IDENTIFICAÇÃO DAS SEPTINAS NO PROCESSO DE BROTEAMENTO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . _____	21
FIGURA 2– FUNÇÕES CELULARES DAS SEPTINAS. _____	22
FIGURA 3– FUNÇÕES DAS SEPTINAS EM DIFERENTES ÓRGÃOS E RELAÇÕES COM PATOLOGIAS HUMANAS. _____	23
FIGURA 4– ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS SEPTINAS. _____	25
FIGURA 5– REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS DIFERENTES INTERFACES DE INTERAÇÃO QUE PERMITE A POLIMERIZAÇÃO DAS SEPTINAS. _____	28
FIGURA 6– CLASSIFICAÇÃO DAS SEPTINAS ATRAVÉS DA SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS. _____	30
FIGURA 7– ESTRUTURA DO COMPLEXO HEXAMÉRICO HUMANO SEPT2-SEPT6-SEPT7. _____	32
FIGURA 8– ORDEM DOS COMPLEXOS HEXAMÉRICO E OCTAMÉRICO HUMANOS A PARTIR DO MODELO SUGERIDO POR SIRAJUDDIN <i>ET AL.</i> _____	34
FIGURA 9– LOCALIZAÇÃO DA MBP-SEPT5 E MARCAÇÃO COM ANTICORPO. _____	35
FIGURA 10– REPRESENTAÇÃO DAS DIVERSAS FORMAS DE INTERAÇÃO ENTRE FILAMENTOS DE SEPTINAS, COMO <i>BUNDLES</i> E ANÉIS. ____	37
FIGURA 11– REPRESENTAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE SEPTINAS DE DIFERENTES ORGANISMOS E MICROGRAFIAS REALIZADAS POR TEM, DEMONSTRANDO SEUS RESPECTIVOS FILAMENTOS. _____	38
FIGURA 12 – PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HEXAMÉRICO HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT. _____	57
FIGURA 13 – TEM POR CONTRASTAÇÃO NEGATIVA DO COMPLEXO HEXAMÉRICO HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7. _____	58
FIGURA 14 – MODELO ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO ACIMA O MODELO PROPOSTO POR SIRAJUDDIN <i>ET AL</i> E ACEITO ANTERIORMENTE NA LITERATURA, POSICIONANDO A SEPT2 NO CENTRO DO COMPLEXO HEXAMÉRICO E, ABAIXO, O MODELO CORRIGIDO E COMPROVADO PARA OS COMPLEXOS HEXAMÉRICOS QUE CONTÉM TANTO A SEPT2, QUANTO A SEPT5, POSICIONADOS NA EXTREMIDADE. _____	59
FIGURA 15 – MODELO ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO A INTERAÇÃO ENTRE COMPLEXOS HEXAMÉRICOS E OCTAMÉRICOS NA FORMAÇÃO DE FILAMENTOS. _____	61
FIGURA 16 – PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HEXAMÉRICO HsSEPT2G-SEPT6-SEPT 7. _____	63
FIGURA 17 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DOS PASSOS DE PROCESSAMENTO REALIZADOS POR ANÁLISE DE PARTÍCULAS ISOLADAS COM OS DADOS COLETADOS POR CRIO-ME DO COMPLEXO HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. _____	64
FIGURA 18 – FOURIER SHELL CORRELATION (FSC) DO MAPA OBTIDO POR CRIO-ME DO COMPLEXO HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7, PARA ANÁLISE DE RESOLUÇÃO GLOBAL. _____	65
FIGURA 19 – ANÁLISE DE RESOLUÇÃO LOCAL E MODELO ESTRUTURAL OBTIDO COM O MAPA DE HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. ____	66
FIGURA 20 – REGIÕES DO MAPA DE POTENCIAL OBTIDO POR CRIO-ME. _____	69
FIGURA 21 – ANÁLISE DE FLEXIBILIDADE DO COMPLEXO HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. _____	71
FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORIENTAÇÃO DO COMPLEXO DE SEPTINAS AO INTERAGIR COM MEMBRANAS COM BASE NO DOBRAMENTO DO TIPO <i>SIDE-TO-SIDE</i> , DEIXANDO AS HÉLICES A6 PARALELAS À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA. _	72
FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES NA INTERFACE-G ENTRE SEPT7-SEPT7. _____	73
FIGURA 24 – INTERAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS NA INTERFACE-NC ENTRE SEPT6 E SEPT7. _____	75
FIGURA 25 – INTERAÇÕES IMPORTANTES DA REGIÃO SUPERIOR DA INTERFACE NC ENTRE SEPT6 E SEPT7. _____	76

FIGURA 26 – MUDANÇA CONFORMACIONAL DA INTERFACE-NC DAS SEPTINAS DO GRUPO DA SEPT3 (GRUPO I) DEPENDENTE DO NUCLEOTÍDEO LIGADO. _____	77
FIGURA 27 – CAVIDADE NC ENTRE SEPT6 E SEPT7. _____	79
FIGURA 28 – DETALHES MOLECULARES DA HÉLICE A0. _____	81
FIGURA 29 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO EM FORMA DE RODAS HELICOIDAIS PARA AS REGIÕES QUE CORRESPONDEM À HÉLICE A0 DOS QUATRO DIFERENTES GRUPOS. _____	82
FIGURA 30 – POSICIONAMENTO DA PHE(HL) EM RELAÇÃO À SEPTINA PARCEIRA. _____	83
FIGURA 31 – PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HEXAMÉRICO CISEPT2_MBP-SEPT6-SEPT _____	86
FIGURA 32 – TEM POR CONTRASTAÇÃO NEGATIVA DO COMPLEXO HEXAMÉRICO CISEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 _____	87
FIGURA 33 – PRODUÇÃO DO COMPLEXO OCTAMÉRICO CISEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 E SUA HETEROGENEIDADE. _____	89
FIGURA 34 – MAPAS TRIDIMENSIONAIS OBTIDOS POR CRIO-ME. _____	91
FIGURA 35 – MAPA TRIDIMENSIONAL OBTIDO POR CRIO-ME DESTACANDO A DENSIDADE EXTRA QUE CORRESPONDE À PROTEÍNA SUMO FUSIONADA À SEPT7, CONFIRMANDO A ORDEM ESPERADA PARA O TETRÂMERO SEPT7-SEPT9-SEPT9-SEPT7 DE <i>CIONA INTESTINALIS</i> . _____	92
FIGURA 36 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORDEM DOS COMPLEXOS DE SEPTINAS DE <i>C. INTESTINALIS</i> E SEPTINAS HUMANAS OBTIDOS POR CONTRASTAÇÃO NEGATIVA E CRIO-ME NESTE TRABALHO. _____	92
FIGURA 37 – PRODUÇÃO DO COMPLEXO OCTAMÉRICO CISEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 COM SUMO PROTEASE. _____	94
FIGURA 38 – ANÁLISE DE RESOLUÇÃO LOCAL E MODELO ESTRUTURAL OBTIDO COM O MAPA DO HEXÂMERO CISEPT2-SEPT6-SEPT7. _____	95
FIGURA 39 – ANÁLISE DE FLEXIBILIDADE DO COMPLEXO CISEPT2G-SEPT6-SEPT7 EM COMPARAÇÃO COM HEXÂMERO HUMANO. _____	98
FIGURA 40 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DÍMEROS DE SEPT7-SEPT7 HUMANO E DE <i>CIONA INTESTINALIS</i> . _____	100
FIGURA 41 – COMPARAÇÃO DA HÉLICE A0 DE AMBOS ORGANISMOS. _____	101
FIGURA 42 – ANÁLISE DA GLN(A0) NA SEPT6 E SEPT7 DE <i>C. INTESTINALIS</i> . _____	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONSTRUÇÕES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS COMPLEXOS DE SEPTINAS.....	44
TABELA 2 – ESTATÍSTICAS E INFORMAÇÕES SOBRE A COLETA DE DADOS DE CRIO-ME DO COMPLEXO HEXAMÉRICO HUMANO SEPT6- SEPT7-SEPT9, REFINAMENTO DO MODELO E VALIDAÇÃO.....	67
TABELA 3 – ESTATÍSTICAS E INFORMAÇÕES SOBRE A COLETA DE DADOS DE CRIO-ME DO COMPLEXO HEXAMÉRICO DE <i>CIONA</i> <i>INTESTINALIS</i> SEPT6-SEPT7-SEPT9, REFINAMENTO DO MODELO E VALIDAÇÃO.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC	<i>Coiled coil</i>
Cdc	<i>Cell Division Cycle</i>
Crio-ME	Criomicroscopia Eletrônica
GTP	Guanosina Trifosfato (do inglês, <i>guanosine triphosphate</i>)
GDP	Guanosina Difosfato (do inglês, <i>guanosine diphosphate</i>)
HL	<i>Hook-loop</i>
MBP	Proteína de ligação à maltose (do inglês, <i>Maltose Binding Protein</i>)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PAR	Região poliácida (do inglês, <i>polyacid region</i>)
PB1	Região polibásica 1
PB2	Região polibásica 2
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
rmsd	Raiz quadrada do desvio quadrático médio (do inglês, <i>root mean square deviation</i>)
SEPT	Septina
SUE	Elemento único de septinas
Sw1	<i>Switch 1</i>
Sw2	<i>Switch 2</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	FUNÇÕES DAS SEPTINAS E PATOLOGIAS ASSOCIADAS	22
1.2	ESTRUTURA DAS SEPTINAS	24
1.2.1	<i>Domínio N</i>	25
1.2.2	<i>Domínio G</i>	26
1.2.3	<i>Domínio C</i>	27
1.2.4	<i>Interfaces -G e -NC</i>	28
1.3	HETERO-COMPLEXOS DE SEPTINAS	29
1.4	FORMAÇÃO DE FILAMENTOS	36
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS COMPLEXOS DE SEPTINAS	43
3.1.1	<i>Plasmídeos e expressão heteróloga</i>	43
3.1.2	<i>Purificação do complexo HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7</i>	45
3.1.3	<i>Purificação do complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7</i>	46
3.1.4	<i>Purificações dos complexos C. intestinalis</i>	46
3.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	46
3.2.1	<i>Preparo de amostra por contrastação negativa</i>	46
3.2.2	<i>Preparo de amostra por vitrificação</i>	47
3.2.3	<i>Coleta de dados</i>	48
3.2.4	<i>Processamento por análise de partículas isoladas das amostras preparadas por contrastação negativa</i>	49
3.3	PÓS-PROCESSAMENTO	52
3.3.1	<i>Análise de flexibilidade</i>	52
3.3.2	<i>Construção do modelo estrutural e refinamento</i>	53
3.3.3	<i>Processamento por análise de partículas isoladas das amostras preparadas por vitrificação (Crio-ME)</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	SEPTINAS HUMANAS	55
4.1.1	<i>Ordem do hexâmero HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7</i>	55
4.1.2	<i>Crio-ME do hexâmero HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7, construção e validação do modelo estrutural</i>	61

4.1.3 Flexibilidade e análise de interações do hexâmero	69
4.1.4 A interface-NC SEPT6-SEPT7 e sua cavidade.....	74
4.1.5 A hélice $\alpha 0$ na interface-NC.....	79
4.2 SEPTINAS DE <i>CIONA INTESTINALIS</i>	83
4.2.1 Ordem do hexâmero CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7.....	84
4.2.2 Heterogeneidade na produção de octâmeros CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9	87
4.2.3 Ordem do tetrâmero CiSEPT7-SEPT9.....	91
4.2.4 Modelo estrutural do hexâmero CiSEPT2-SEPT6_SEPT7.....	93
4.2.5 Comparação com modelo do hexâmero humano	97
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	105
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

As septinas são proteínas globulares que se ligam a nucleotídeos e possuem a capacidade de interagir entre si, formando heterocomplexos que, por sua vez, se unem para formar filamentos envolvidos em diversos processos celulares.

Elas foram inicialmente identificadas em 1970, por meio de um estudo que buscava encontrar genes críticos para o processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fase de brotamento.¹ Foi descoberto que mutações em 4 genes (*cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12*; do inglês *Cell Division Cycle: cdc*) causavam defeitos na citocinese. Observou-se que as linhagens mutantes desenvolviam múltiplos brotos alongados que não completavam o processo de separação da célula-mãe. Na mesma década, um estudo utilizando a técnica de microscopia eletrônica, também em leveduras, identificou a presença de anéis filamentosos de 10 nm de espessura localizados na região que separa a célula-mãe da célula-filha (Figura 1).² Posteriormente, utilizando a técnica de microscopia de fluorescência, os componentes desses filamentos foram identificados como produtos dos genes *cdc* mencionados anteriormente. Devido à localização desses filamentos no septo de separação entre as células, essas proteínas foram nomeadas “septinas”.³⁻

4

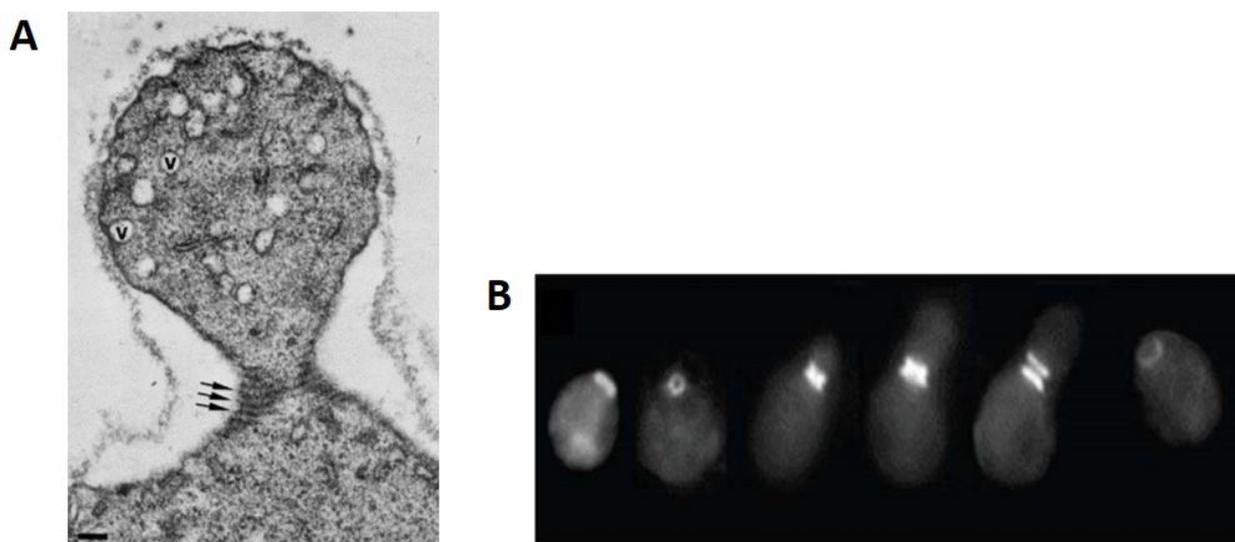


Figura 1– Identificação das septinas no processo de brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (A) Por microscopia eletrônica, evidenciando múltiplos filamentos localizados na região de brotamento. Barra de escala de 0.1 μm (B) Por microscopia de fluorescência, monitorando a localização dos filamentos em diferentes etapas do ciclo celular.

Fonte: Adaptada de BYERS;¹ GOETSCH;² GLADFELTER.⁵

Após a descoberta das septinas, foram encontradas proteínas homólogas em quase todos os organismos eucariotos e, atualmente, são reconhecidas como um dos componentes do citoesqueleto, devido à sua morfologia filamentosa e à sua capacidade de interação com membranas celulares, microtúbulos e filamentos de actina.⁶ Apesar de sua importância em diversos processos celulares e do número crescente de estudos nessa área, ainda há muito a ser descoberto em termos de mecanismos moleculares dessas proteínas. Existem diversas septinas e suas diferentes isoformas em cada organismo, além da distribuição tecido-específica de cada uma em diferentes células. A complexidade se estende consideravelmente ao analisar as interações entre cada uma delas no processo de polimerização, assim como suas interações com diferentes proteínas e como isso está relacionado com a variedade de funções celulares nas quais elas estão envolvidas.

1.1 Funções das septinas e patologias associadas

A divisão celular é geralmente o processo mais associado às funções das septinas; entretanto, elas também estão relacionadas a diversos outros mecanismos, como a migração celular, a regulação do formato e polaridade celular, a adesão entre células, o tráfego intracelular de vesículas, entre outros (Figura 2).⁷ Comumente, elas atuam de duas maneiras não-catalíticas: Uma das formas é agir como recrutadoras de outras proteínas em uma localização específica, ou seja, promovendo uma interação funcional com diversas enzimas e proteínas regulatórias. Sua outra forma de atuação ocorre como barreira de difusão, auxiliando na compartimentalização de domínios celulares, restringindo os movimentos de proteínas de membrana sem necessariamente interagir diretamente com elas.^{6,8-9}

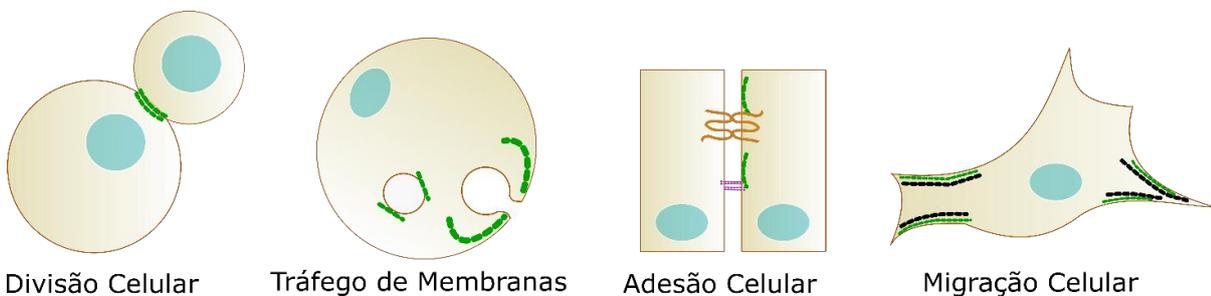


Figura 2– Funções celulares das septinas. Os processos mais caracterizados em que as septinas desempenham um papel importante incluem a divisão celular, o tráfego intracelular de vesículas, a adesão e a migração celular. Os complexos e filamentos de septinas estão representados em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em humanos, as funções das septinas em diversos processos celulares têm sido extensivamente estudadas. Em geral, elas podem ser expressas de forma ubíqua ou tecido-específica, atuando em diferentes processos em cada região do corpo humano, como está esquematizado na Figura 3. Alguns estudos resultaram na descoberta de que o comportamento anormal dessas proteínas, por meio de alterações do nível de expressão ou mutações em alguns resíduos, pode estar relacionado ao desenvolvimento de diferentes patologias, como doenças neurodegenerativas, alguns tipos de câncer, infertilidade masculina e desordens inflamatórias.^{6-7,10}

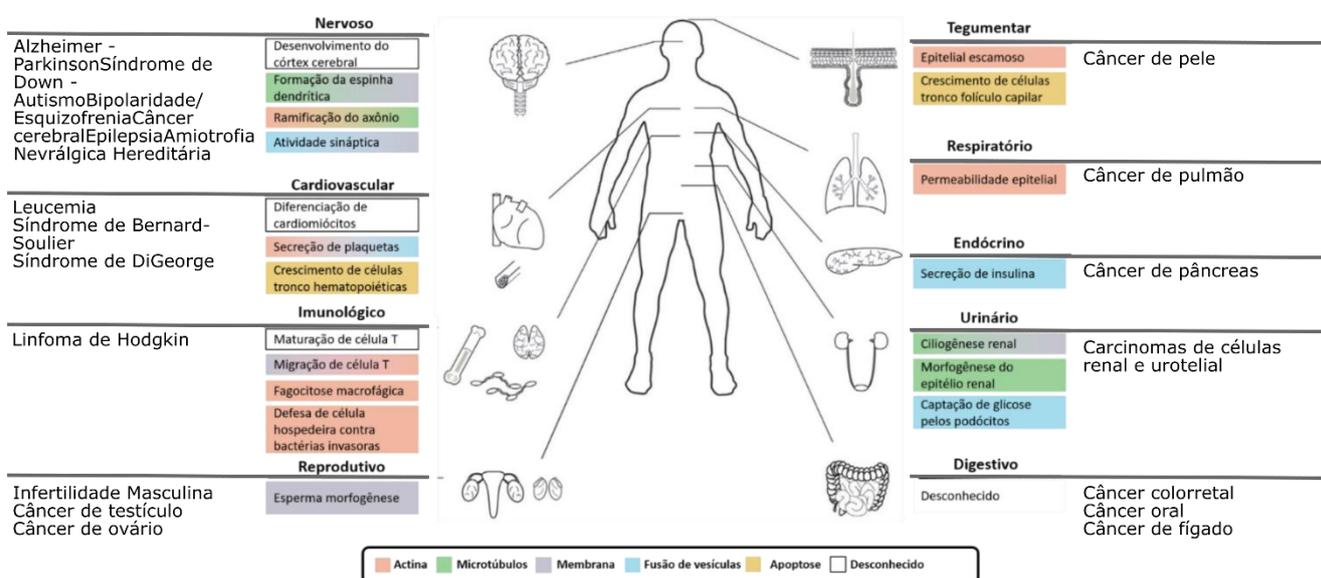


Figura 3 – Funções das septinas em diferentes órgãos e relações com patologias humanas. O diagrama destaca os principais sistemas e órgãos do corpo humano, assim como o tipo celular específico em que as septinas possuem um papel na organização de: actina (rosa), microtúbulos (verde), membranas (cinza), fusão de vesículas (azul) e apoptose (amarelo). As doenças relacionadas estão listadas nas extremidades laterais da imagem.

Fonte: Adaptada de DOLAT *et al.*¹¹

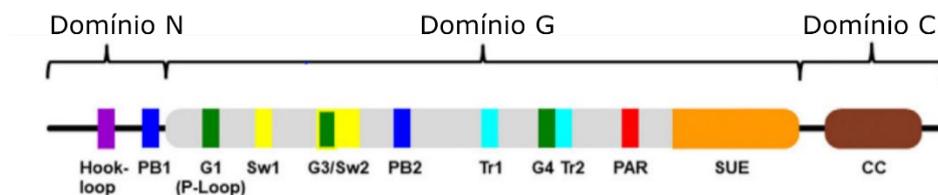
Alguns estudos também têm investigado a influência das septinas em processos infecciosos de alguns patógenos. Elas possuem um papel essencial em infecções causadas por diferentes bactérias, fungos ou vírus em células de mamíferos, tanto no processo de controle da invasão do patógeno quanto na disseminação do organismo nas células hospedeiras.⁶⁻⁷ Um dos exemplos da atuação das septinas no controle da disseminação do patógeno foi mostrado no caso de infecção da bactéria *Shigella flexneri*. Um estudo evidenciou que as células infectadas por *Shigella* podem prevenir a motilidade mediada por actina através da formação de estruturas de

septinas em formato de gaiola ao redor das bactérias, restringindo a movimentação e a disseminação do patógeno nas células hospedeiras.¹²⁻¹³

1.2 Estrutura das septinas

As septinas estão classificadas na família das *P-loop* GTPases, com massas moleculares que variam de 30 à 65 kDa, possuindo a capacidade de ligar o nucleotídeo GTP (guanosina trifosfato) e, com algumas exceções, catalisando sua hidrólise para GDP (guanosina difosfato).¹⁴ Além do domínio de ligação ao nucleotídeo com estrutura α - β - α altamente conservado (também conhecido como domínio G), as septinas possuem outros dois principais domínios distintos (Figura 4A). Esses domínios incluem extensões N-terminal e C-terminal variáveis (chamadas de domínio N e domínio C, respectivamente), diferente de outras pequenas GTPases.¹⁵⁻¹⁶ Em relação ao domínio G, há um consenso em relação aos limites estruturais das outras duas regiões. O domínio N está situado antes da primeira fita β característica do domínio G (β_1), enquanto o domínio C está localizado após a última hélice α (α_6) (Figura 4B).¹⁶

(a)



(b)

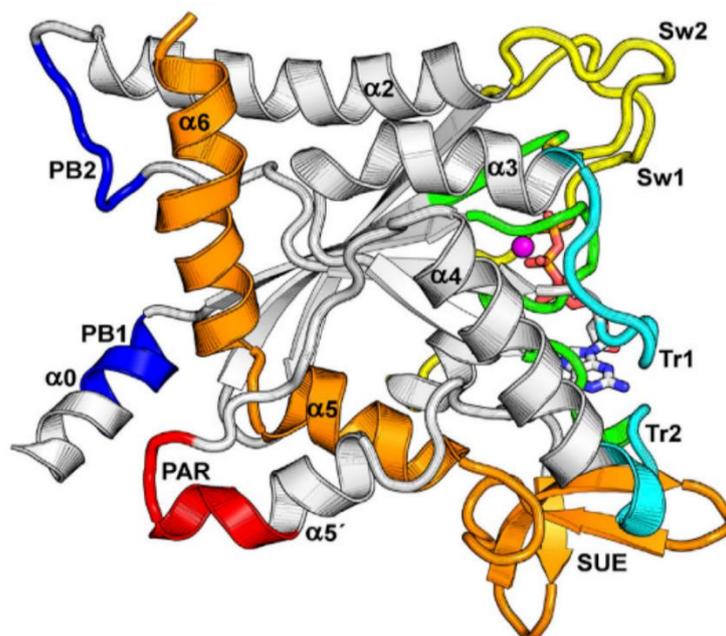


Figura 4– Aspectos estruturais das septinas. (A) Representação dos domínios principais das septinas e características importantes. O domínio N se destaca pela presença da hélice $\alpha 0$, que contém a região polibásica 1 (PB1). O domínio G contém as regiões responsáveis para a ligação de nucleotídeo, assim como as regiões importantes para a atividade hidrolítica (G1, Sw1, G3/ Sw2 e G4). Outros elementos funcionais estão também representados, como a região polibásica 2 (PB2), a região poliácida (PAR), os *trans-loops* 1 e 2 (Tr1 e Tr2) e o elemento único de septinas (SUE) encerrando o domínio G. A principal característica do domínio C é a presença de uma repetição de resíduos a cada 7 aminoácidos, característica da formação de *coiled coils*. (B) Representação tridimensional do domínio G destacando as mesmas estruturas, correspondente ao mesmo esquema de cores do item (A).

Fonte: Adaptada de CAVINI *et al.*¹⁶

1.2.1 Domínio N

A região N-terminal possui uma alta variabilidade entre as septinas, tanto em termos de similaridade de sequência de aminoácidos como em quantidade de resíduos. Algumas partes desse domínio têm sido associadas à interação das septinas com outras proteínas do citoesqueleto, como actinas e microtúbulos, bem como proteínas que possuem outros tipos de funções.¹⁶

Na maior parte das septinas, esse domínio contém uma sequência rica em resíduos básicos (carregados positivamente), conhecida como região polibásica 1 (PB1), que está contida na hélice $\alpha 0$ (Figura 4B). Alguns estudos demonstram que a PB1 é responsável pela interação com membranas: Um deles mostra que essa interação, em SEPT4 de ratos, ocorre através do componente PIP₂ (fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato) das membranas. Outro estudo também demonstrou que, em leveduras, o domínio N-terminal da Cdc10 participa da interação com monocamadas de lipídeos contendo também PIP₂.¹⁷⁻¹⁸

Uma segunda região estruturada do domínio N é chamada *Hook-loop*, sendo importante para a estabilização de interações septina-septina, como a interface-NC que será explicada posteriormente.¹⁶⁻¹⁹

1.2.2 Domínio G

O domínio G é responsável pela ligação ao nucleotídeo GTP e garante a integridade estrutural das septinas. A ligação ao GTP ocorre por meio dos motivos G1, *switch I* (Sw1), G3 e G4. O motivo G1 contém a sequência consenso GxxGxGKS/T, formando o *P-loop*, que permite a interação com os grupos fosfatos do nucleotídeo, além de coordenar o íon Mg²⁺, necessário para a atividade catalítica ou apenas para a ligação do nucleotídeo.^{16,20-21} O Sw1 contém o resíduo de treonina essencial para a atividade catalítica, que se liga tanto ao fosfato γ quanto ao íon Mg²⁺.¹⁶⁻²¹ Nas septinas que não possuem atividade catalítica, a treonina catalítica não está presente e, além disso, o Sw1 é desordenado.¹⁷ O motivo G3 é uma parte do *switch II* (Sw2), também importante no processo de hidrólise do nucleotídeo. Já o motivo G4 atua na seletividade da ligação ao nucleotídeo, interagindo com o açúcar e a base de guanina.¹⁶⁻²⁰

A função da ligação ao nucleotídeo ainda está em debate, embora têm sido associado com o processo de montagem dos complexos, fornecendo uma alteração conformacional propícia para a interação entre septinas.²¹ Recentemente, também foi verificado que a hidrólise de GTP provoca uma mudança conformacional em algumas septinas, resultando na expulsão da hélice $\alpha 0$ de dentro do complexo, possivelmente facilitando sua interação com membranas.²²

Com uma similaridade de 75% entre as septinas da mesma espécie, o domínio G é o mais conservado e possui um enovelamento similar ao das proteínas Ras (pequenas GTPases), com características adicionais únicas relacionadas às suas

funções.²³ Entre essas características, na parte superior das septinas (em relação à orientação apresentada na Figura 4) se destacam: a presença da região Sw2 (importante também na dimerização de septinas através da interface-G, que será explicada posteriormente), a hélice $\alpha 2$ (que se posiciona entre as duas interfaces possíveis de interação entre septinas) e um *loop* que contém a região polibásica 2 (PB2) (também importante na formação da interface-NC). Na parte inferior, seguido pela hélice $\alpha 5'$, há a presença de um *loop* que contém a região poliácida (PAR), que também desempenha a função de estabilizar a interface-NC.

Por fim, outra característica que diferencia as septinas de outras pequenas GTPases é a presença do chamado elemento único das septinas (SUE, do inglês *septin unique element*). Essa região possui 60 resíduos e compreende três fitas β (β_a , β_b e β_c) que formam o chamado β -*meander*, juntamente com as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$. A primeira região desempenha um papel importante na estabilização da interface-G, enquanto a segunda está envolvida na interface-NC. A SUE, de forma geral, considerando sua participação em ambas as interfaces, é a região principal que favorece a polimerização das septinas e as distingue de outras pequenas GTPases.¹⁶⁻

17

1.2.3 Domínio C

Assim como o domínio N, a região C-terminal também exibe uma alta variabilidade de composição de aminoácidos e tamanho. Com algumas exceções, essa região é prevista para a formação de *coiled coils* (CC). O domínio C-terminal desempenha um papel crucial na estabilização dos complexos de septinas, no processo de polimerização, assim como na interação entre filamentos, possibilitando a formação de estruturas maiores e mais complexas.²⁴⁻²⁵

A região anterior ao CC é altamente variável e acredita-se que seja flexível, o que permite certo grau de movimento ao CC em relação ao domínio G.¹⁶⁻¹⁹ Embora possa ser importante para sua função, sua alta flexibilidade impossibilita a visualização dessa região nos estudos estruturais realizados com septinas.²⁶ Recentemente, avanços na compreensão dos detalhes moleculares dessa estrutura foram possíveis graças à utilização de construções isoladas dos *coiled coils* em técnicas como cristalografia e ressonância nuclear magnética. Além disso, a região posterior ao CC, em alguns casos, apresenta uma sequência polibásica que tem sido

associada à interação das septinas com membranas em alguns estudos. No entanto, essa hipótese ainda está em debate e requer uma investigação adicional.^{16,27-28}

Fisiologicamente, foi demonstrada a importância do domínio C na correta polimerização das septinas por meio de um estudo que investigou a influência da infecção pelo vírus Zika em células neurais progenitoras. Nesse estudo, constatou-se que a protease NS2B-NS3 produzida pelo vírus é capaz de degradar a região C-terminal de SEPT2 humana, resultando na redução da formação de filamentos. Esse efeito compromete o processo de mitose das células e pode estar associado ao desenvolvimento de microcefalia.²⁹

1.2.4 Interfaces -G e -NC

O processo de polimerização das septinas ocorre através de duas diferentes regiões do domínio G. A primeira região, conhecida como interface-G, envolve componentes do sítio de ligação ao nucleotídeo, incluindo o próprio nucleotídeo. A segunda região, denominada interface-NC, é formada pelas regiões N e C terminais do domínio G, especificamente por meio dos contatos das hélices α_0 , α_2 e α_6 . Essas interfaces alternam-se entre as subunidades de septinas, conferindo-lhes a capacidade de polimerização, o que as diferencia de outras pequenas GTPases (Figura 5).¹⁷⁻¹⁹ Os dois tipos de interação podem ocorrer tanto entre subunidades idênticas (homotípicas) quanto entre subunidades diferentes (heterotípicas).

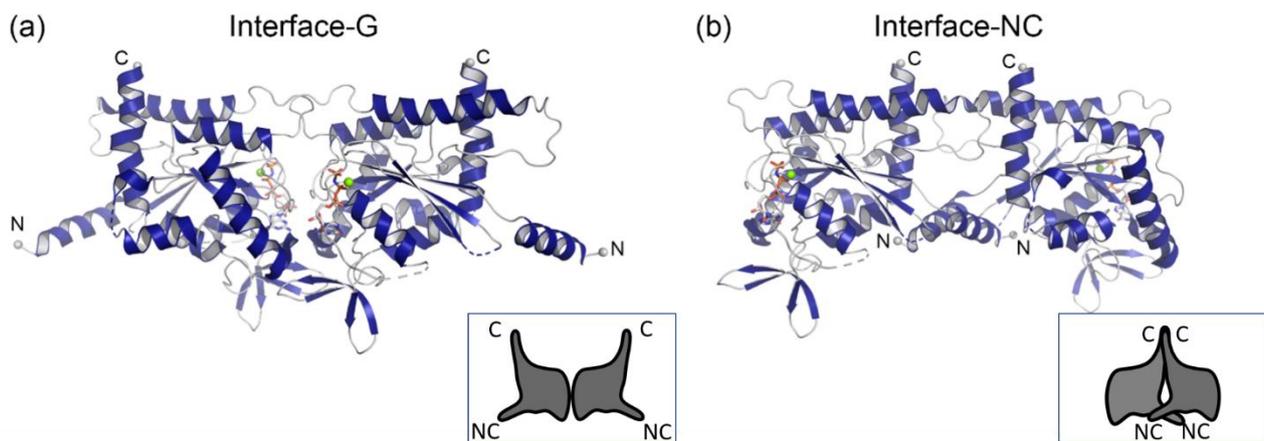


Figura 5– Representação estrutural das diferentes interfaces de interação que permite a polimerização das septinas. (A) Interface-G, que envolve os sítios ativos de cada subunidade. (B) Interface-NC, realizada por meio de contatos das regiões N e C terminais do domínio G de cada subunidade.

Fonte: Adaptada de BROGNARA *et al.*³⁰

A interface-G é altamente conservada entre as diferentes estruturas de septinas na literatura. Além disso, nenhuma delas foi obtida na ausência de nucleotídeo, sugerindo que esse componente é essencial na dimerização das subunidades.^{16-21,31} A estabilidade dessa interface é garantida por interações entre *P-loop*, Sw1, Sw2, G4, Tr1 e Tr2 (Figura 4).²⁰ Além disso, as interações hidrofóbicas entre as fitas β_a , β_b e β_c do SUE de ambas as subunidades contribuem significativamente para a estabilidade dessa interface.²⁰ Vale ressaltar que essa interface desempenha um papel crucial no reconhecimento molecular correto entre as septinas parceiras.^{16,32}

A interface-NC tem sido pouco explorada na literatura, visto que componentes importantes dessa interface, como a hélice α_0 , não estavam presentes na maioria das estruturas cristalográficas resolvidas devido a construções truncadas, ou, quando presentes, não foi completamente descrita devido à baixa resolução da estrutura.¹⁶ No entanto, durante o desenvolvimento deste projeto, foram obtidos resultados que contribuíram para um melhor entendimento dessa interface, como será descrito posteriormente neste documento. Uma das características conservadas dessa interface é a presença de pontes salinas que envolvem resíduos da hélice α_6 e o *loop* após a hélice α_2 da septina parceira.¹⁶

Diferentes conformações da interface-NC foram descritas para as septinas do Grupo I (mencionadas na sessão seguinte), sendo essa plasticidade uma propriedade única deste grupo. Os estados conformacionais podem ser classificados como: aberto, fechado ou deslocado. A conformação aberta é considerada canônica, uma vez que é a única observada nas septinas de outros grupos. No caso da SEPT9 humana, a mudança conformacional depende do nucleotídeo presente, adotando a conformação aberta quando ligada ao GDP e a conformação fechada quando ligada ao GTP γ S.¹⁶⁻²² Essa movimentação, embora ainda não comprovada diretamente, pode levar ao fechamento da interface, resultando na exposição da hélice α_0 para fora do complexo e permitindo que a região PB1 esteja livre para a interação com membranas.¹⁶⁻²²⁻³³

1.3 Hetero-complexos de septinas

As septinas são encontradas em uma ampla variedade de organismos eucarióticos, com exceção das plantas. O número de genes de septinas pode variar significativamente entre os organismos, refletindo a diversidade funcional e estrutural

dessas proteínas em diferentes espécies.³⁴ Por exemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, um organismo unicelular verde, é um exemplo de uma espécie que possui um número mínimo de genes de septina, com apenas um gene codificante para septinas em seu genoma. Por outro lado, a espécie humana apresenta uma maior complexidade genética nesse aspecto, com 13 genes de septina (SEPT1-SEPT12 e SEPT14), além de suas isoformas.³⁵⁻³⁶ Neste trabalho, além dos complexos humanos, o complexo de *Ciona intestinalis* também foi estudado. Este organismo é um urocordado que possui apenas quatro genes que codificam septinas (SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9).³⁷

Algumas classificações foram propostas para agrupar as septinas com base em sua similaridade de sequência de aminoácidos. Uma dessas classificações, como representado na Figura 6, divide as septinas em quatro grupos distintos, que são consistentes tanto para septinas humanas quanto para a espécie *C. intestinalis*: Grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), Grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14), Grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5) e Grupo IV (SEPT7).³⁷⁻³⁸

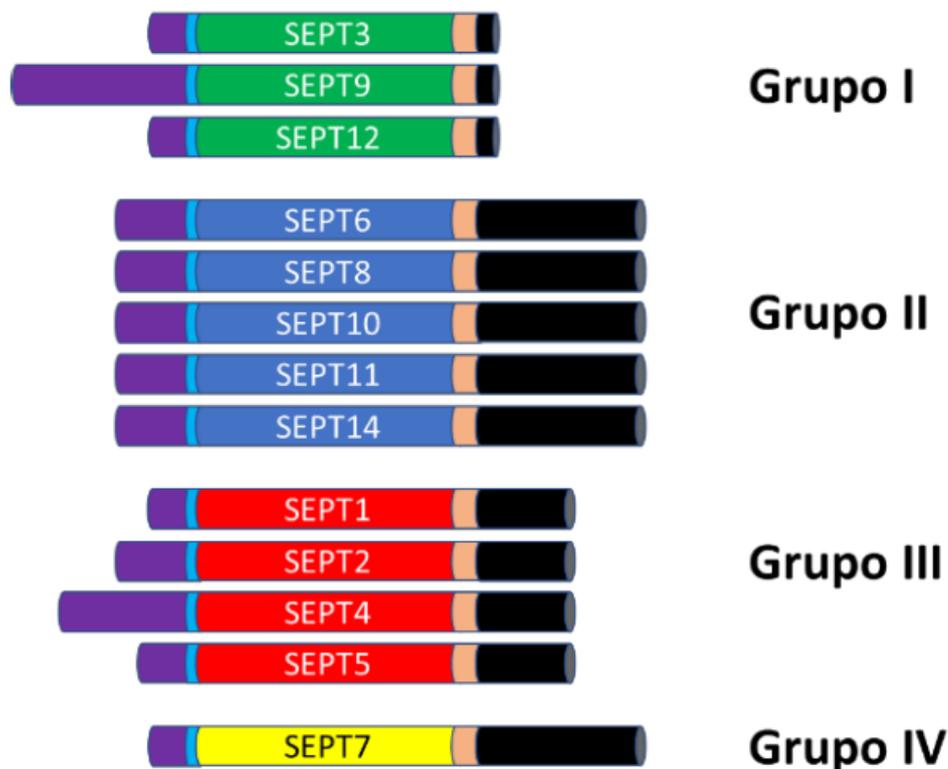


Figura 6– Classificação das septinas através da similaridade de sequências de aminoácidos. A região C-terminal se destaca pela correspondência de tamanho dentro de cada grupo. As cores utilizadas para representar cada grupo será mantida ao longo do texto para facilitar a compreensão.

Fonte: CABREJOS *et al.*³⁹

Duas características se destacam ao analisar as diferenças entre os grupos de septinas. A primeira corresponde ao tamanho da região C-terminal das septinas pertencentes ao Grupo I, na qual não há predição para formação de *coiled coils*. A segunda característica é a ausência de atividade catalítica responsável pela hidrólise de GTP no Grupo II, devido à falta da treonina catalítica presente no Sw1.

As septinas possuem a capacidade de polimerização, por meio da interação entre os diferentes grupos. Seus filamentos são importantes para desempenharem corretamente o seu papel em processos celulares, e são compostos de hetero-complexos menores que se repetem para a construção desses filamentos. Observa-se em vários organismos que esses complexos são lineares e apolares, contendo septinas de diferentes grupos. Em um estudo realizado em 2003, foi proposto que cada grupo possui uma localização específica nos complexos, o que ficou conhecido como “Regra de Kinoshita”.³⁸ No caso das septinas humanas, os filamentos podem ser compostos por hexâmeros e octâmeros, o que prediz, em teoria, 20 e 60 combinações de hexâmeros e octâmeros respectivamente. No entanto, apesar da alta diversidade dessas combinações, a existência de grande parte desses complexos ainda não foi confirmada fisiologicamente.

A primeira estrutura tridimensional de um complexo de septinas foi resolvida por cristalografia de raios-X em 2007, por Sirajuddin e colaboradores.¹⁹ Apesar da baixa resolução (4Å), muitos aspectos moleculares sobre como as septinas de diferentes grupos se organizam para a formação do complexo foram revelados. Uma das descobertas significativas refere-se aos contatos entre as subunidades, que ocorrem através das interfaces -G e -NC que se alternam ao longo dos filamentos, como explicado anteriormente (Figura 7A).

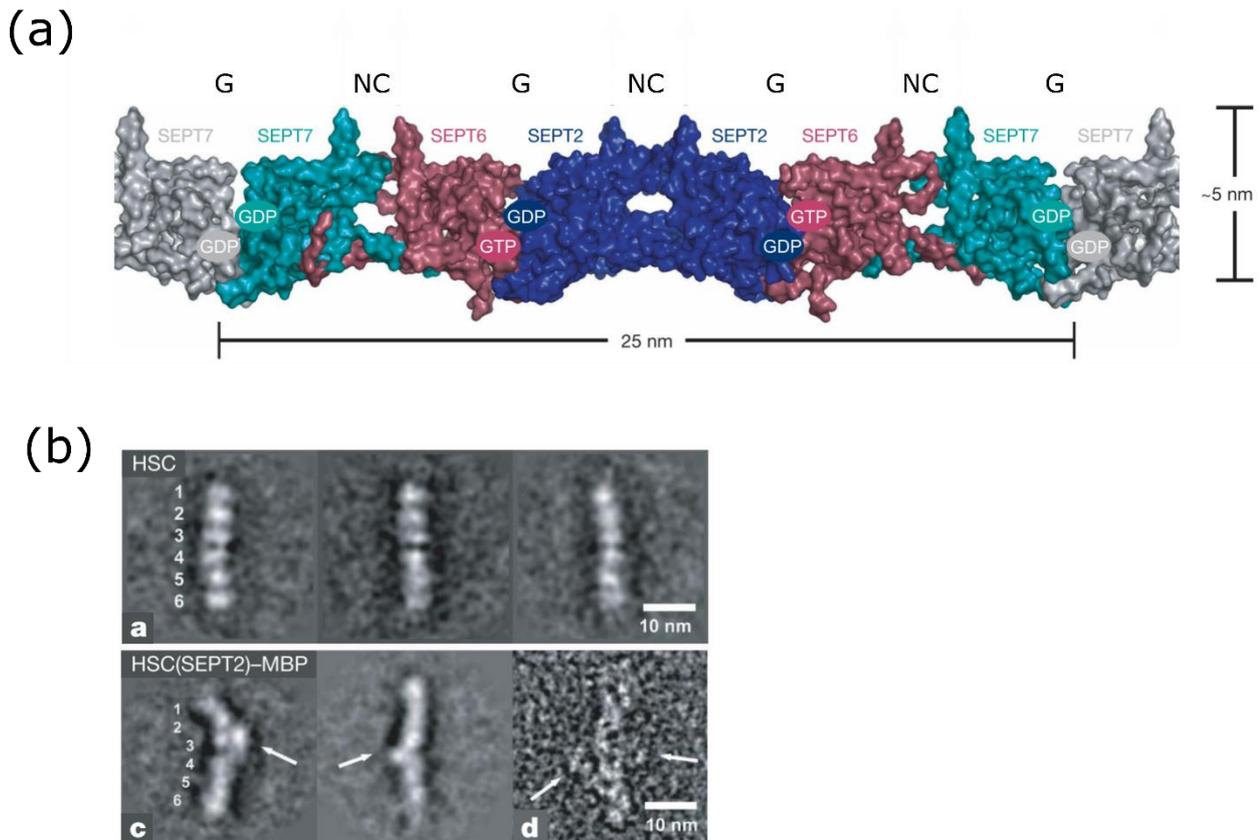


Figura 7– Estrutura do complexo hexamérico humano SEPT2-SEPT6-SEPT7. (A) Representação da superfície de um hexâmero gerado através da aplicação de simetria cristalográfica de ordem 2 no trîmero resultante, segundo os resultados de TEM. (B) Classes resultantes do processamento de micrografias obtidas por TEM, evidenciando a presença de hexâmeros *in vitro* e experimento para a determinação da ordem do hexâmero utilizando fusão da SEPT2 à MBP.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN *et al.*¹⁹

A estrutura foi resolvida como um trîmero de septinas humanas, composto por SEPT2-SEPT6-SEPT7. Por meio da aplicação de simetria cristalográfica de ordem 2 nas extremidades do complexo, foi possível gerar um filamento contínuo. Ao analisar as interfaces de dimerização, é observada a presença de duas interações homotípicas: uma através da interface NC de SEPT2-SEPT2 e outra através da interface G de SEPT7-SEPT7. Além disso, são identificadas duas interações heterotípicas: uma através da interface NC de SEPT6-SEPT7 e outra através da interface G de SEPT2-SEPT6. A estrutura também confirmou a natureza de cada nucleotídeo ligado, revelando que SEPT2 e SEPT7 estão ligadas a GDP, enquanto SEPT6 está ligada a GTP. Isso confirma que SEPT6 não possui atividade catalítica.¹⁹

Adicionalmente, no mesmo estudo, o complexo em solução foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão. Nesse experimento, foi utilizado um tampão em alta concentração salina (500 mM), o que impediu a formação de filamentos e

resultou na observação de apenas complexos hexaméricos. Na Figura 7B, é possível observar os bastões lineares característicos dos complexos de septinas nas classes bidimensionais obtidas após o processamento das micrografias por análise de partículas isoladas. Com uma melhor relação sinal ruído, é possível observar as densidades correspondentes às 6 proteínas que compõe o complexo. Porém, a resolução da técnica não permite a identificação de cada septina no complexo para a determinação da ordem.

Segundo a composição da estrutura cristalográfica, haviam apenas duas possibilidades para a ordem desse hexâmero: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 ou SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2. Com o objetivo de determinar qual dessas duas sequências representavam os hexâmeros observados na amostra, a SEPT2 foi fusionada à proteína MBP (do inglês, *maltose binding protein*), para que a última gerasse uma densidade extra nas micrografias, marcando a SEPT2 para que ela pudesse ser localizada em relação ao restante do complexo (Figura 7B). Com base na análise do processamento dos dados, os autores do estudo propuseram que a SEPT2 está localizada no centro do hexâmero, o que, por sua vez, posiciona a SEPT7 na extremidade do complexo, expondo uma interface-G disponível para polimerização (Figura 8).

Estudos adicionais demonstraram a existência de octâmeros humanos, os quais incluem as septinas do Grupo I, que estão ausentes no hexâmero mencionado anteriormente. Septinas humanas nativas foram isoladas de células tanto na forma de hexâmeros, como octâmeros, indicando que ambos estados oligoméricos possuem relevância fisiológica.⁴⁰⁻⁴² Levando em consideração a organização do modelo hexamérico proposto por Sirajuddin *et al.*, assumiu-se que os octâmeros são formados simplesmente adicionando a septina do grupo faltante na extremidade do complexo (Figura 8).

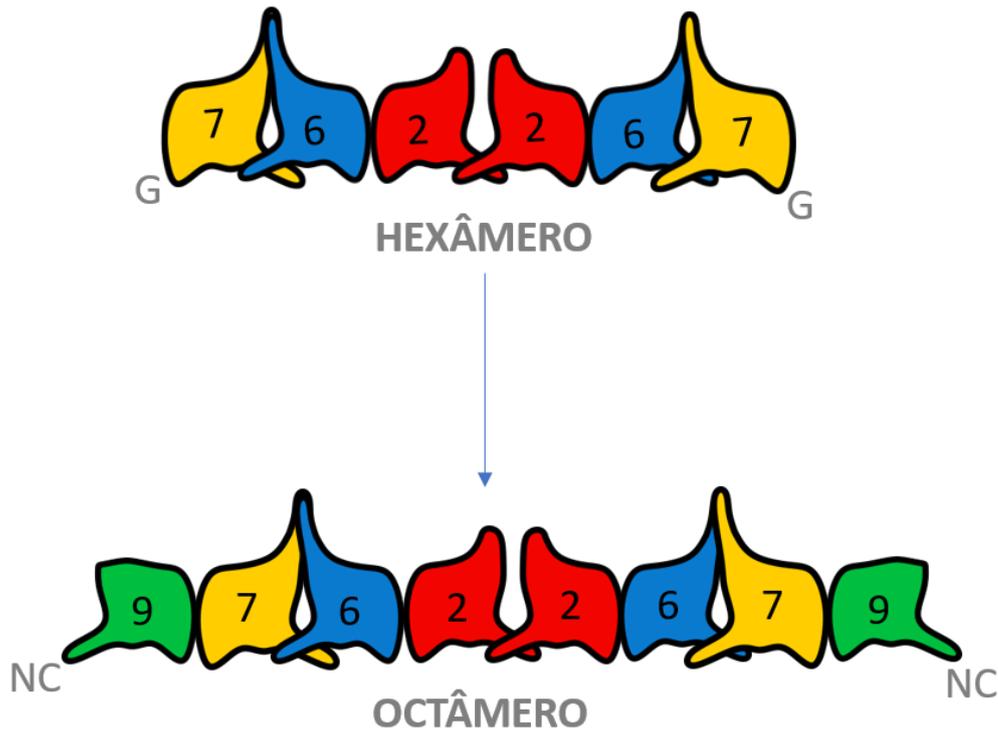


Figura 8– Ordem dos complexos hexamérico e octamérico humanos a partir do modelo sugerido por Sirajuddin *et al.* Nesse modelo, o hexâmero expõe uma interface-G da SEPT7 na extremidade do complexo, enquanto o octâmero expõe uma interface-NC da SEPT9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma década após o estudo mencionado, um novo complexo hexamérico de septinas humanas foi investigado durante o projeto de mestrado da autora. O objetivo do trabalho era analisar a formação do complexo ao substituir uma septina por outra pertencente ao mesmo grupo, a fim de confirmar a regra de Kinoshita. Nesse caso, a SEPT5 foi utilizada no lugar da SEPT2, resultando na obtenção de um complexo hexamérico. Adicionalmente, para localizar a SEPT5 no complexo, a mesma estratégia de fusão à MBP foi utilizada, o que resultou em algo inesperado: o experimento revelou que a SEPT5 está posicionada na extremidade do complexo, contrariando a ideia inicial de que esta poderia apenas substituir a SEPT2 em sua posição central no hexâmero (Figura 9).⁴³⁻⁴⁴

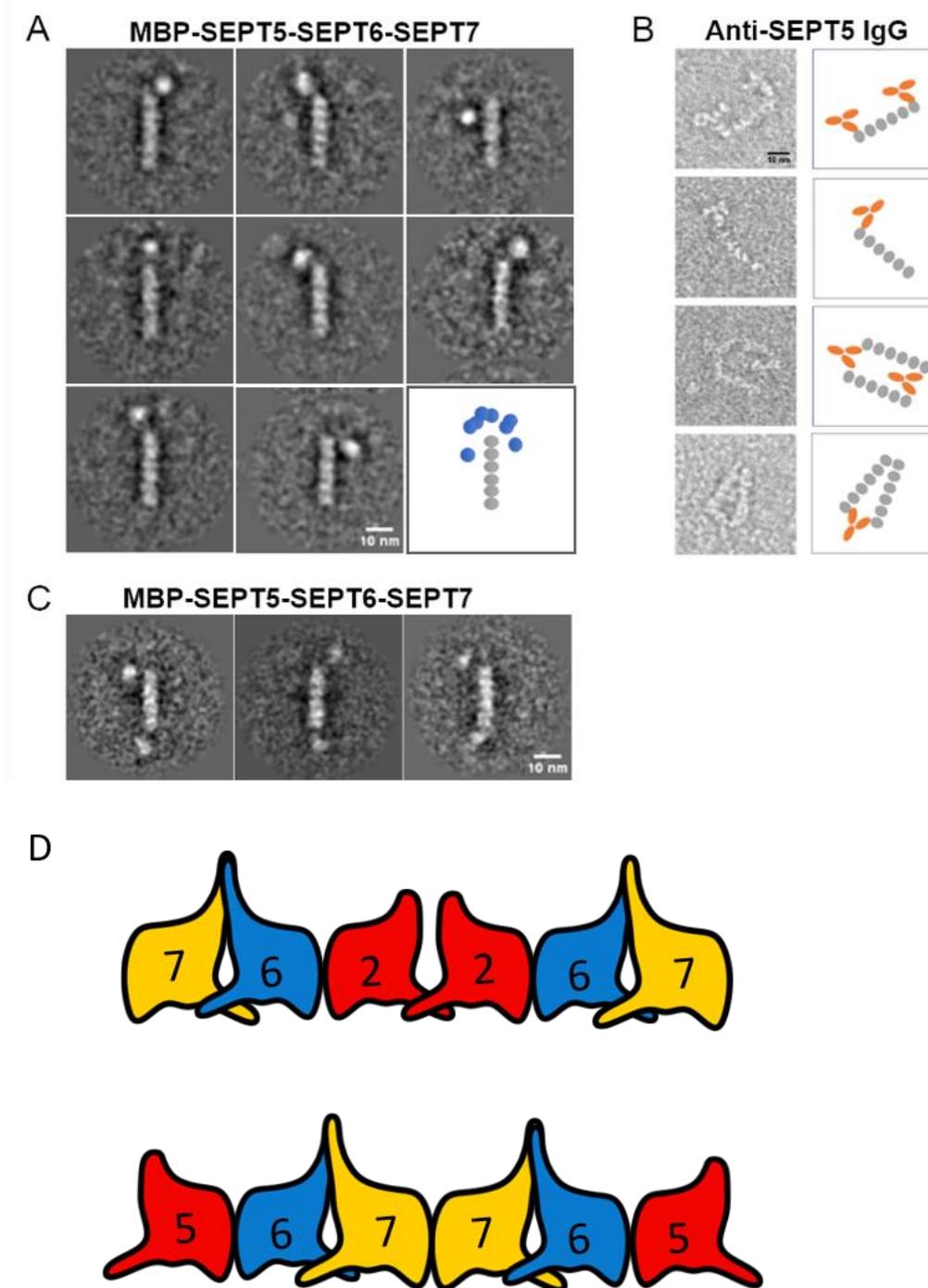


Figura 9– Localização da MBP-SEPT5 e marcação com anticorpo. (A) Classes representativas do complexo MBP-SEPT5-SEPT6-SEPT7 em alta concentração salina. A densidade extra corresponde à MBP, posicionada na extremidade do complexo. No canto inferior direito há uma representação esquemática das classes. (B) Imagens não processadas dos complexos incubados com anticorpo anti-SEPT5 e o diagrama esquemáticos dos complexos, onde as esferas em cinza representam as septinas e em laranja, o anticorpo. (C) Três exemplos que mostra a MBP ligada às duas extremidades do complexo. (D) Diferença entre os modelos de hexâmeros humanos proposto por Sirajuddin *et al* e Mendonça *et al*.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁴⁴

Mesmo que o resultado do processamento dessas imagens indicasse que a MBP realizava uma volta ao redor da extremidade, essa flexibilidade gerada pelo

tamanho do linker entre a MBP e o domínio N-terminal da SEPT5 poderia gerar uma incerteza. Portanto, um experimento adicional foi feito utilizando um anticorpo específico anti-SEPT5, com o qual a posição terminal dessa septina foi confirmada Figura 9B. A contradição da ordem revelada para esse complexo em relação ao modelo de Sirajuddin *et al.* e a regra de Kinoshita foi a razão da verificação do experimento contendo a SEPT2 no início desse projeto de doutorado e foi discutido posteriormente nesse documento (Sessão 4.1).

1.4 Formação de filamentos

Fisiologicamente, os complexos de septina se polimerizam para a formação de filamentos, que podem interagir entre si para a formação de *bundles* (ou feixes), anéis e redes mais complexas (Figura 10). A sequência palindrômica das subunidades nos complexos, ao interagirem no processo de polimerização, resulta em filamentos apolares, uma vez que suas extremidades são indistinguíveis.^{6,19} Outros componentes do citoesqueleto, como a actina e microtúbulo, são considerados polares por possuírem uma terminação positiva e outra negativa, relacionadas com a direção de polimerização de seus filamentos. Portanto, dentre os componentes do citoesqueleto, os filamentos de septinas são mais comparáveis aos filamentos intermediários, devido à natureza também apolar.⁶

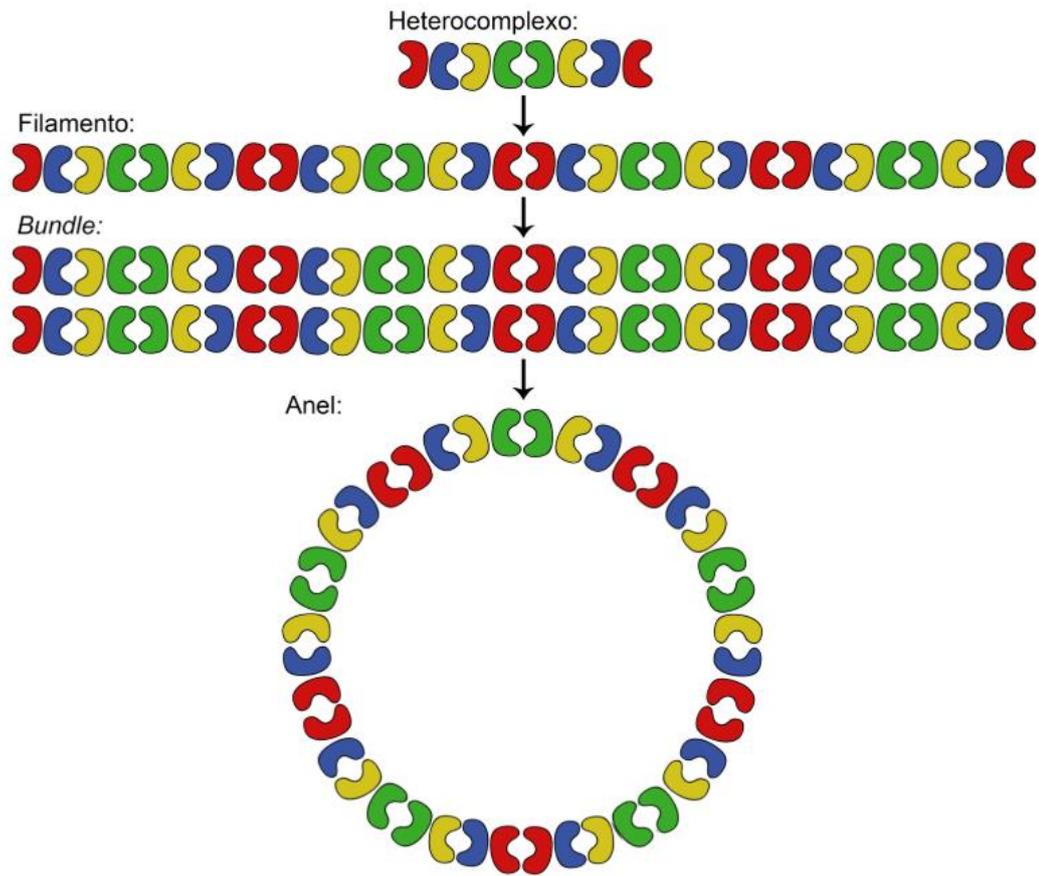


Figura 10– Representação das diversas formas de interação entre filamentos de septinas, como *bundles* e anéis.
 Fonte: BROGNARA *et al.*³⁰

Diversos estudos analisaram a formação de filamentos de septinas de diferentes organismos utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.¹⁹⁻²⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁸ No entanto, o processo de polimerização das septinas ainda não é completamente compreendido. A Figura 11 apresenta exemplos de filamentos de septinas em diferentes organismos, bem como os oligômeros que os compõem. Especificamente para o caso das septinas de *Drosophila melanogaster*, os hexâmeros foram observados isoladamente, mas ainda não há comprovação da ordem do complexo. Portanto, a figura contém apenas o modelo proposto para o arranjo desse oligômero, que tem como base a comparação com as septinas de outros organismos cuja ordem é conhecida.⁴⁶

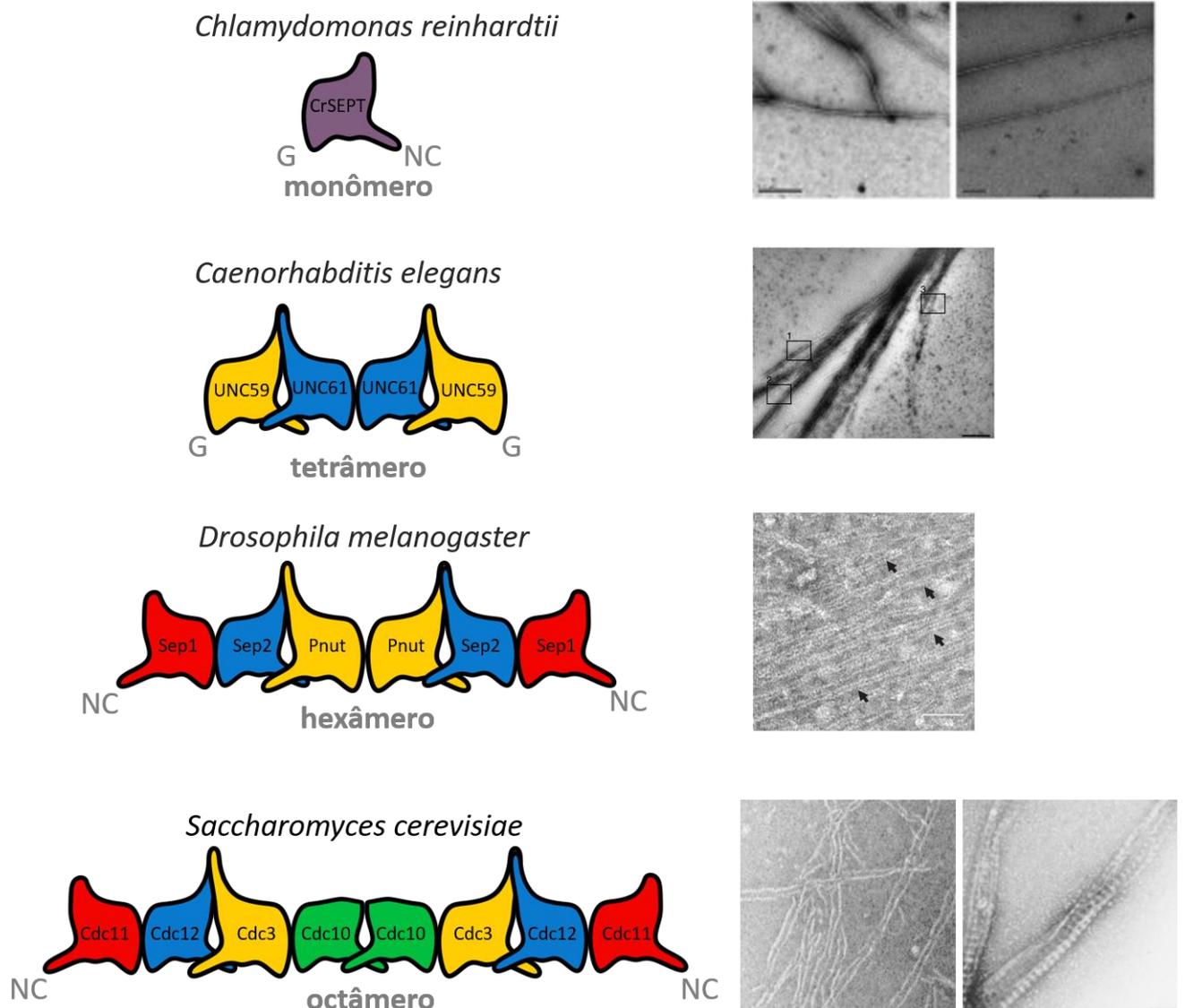


Figura 11– Representação dos oligômeros de septinas de diferentes organismos e micrografias realizadas por TEM, demonstrando seus respectivos filamentos. Cada subunidade está colorida por sua correspondência aos grupos (I, II, III e IV), com exceção da septina CrSEPT de *Chlamydomonas reinhardtii* que não é caracterizada por nenhum desses grupos e está representada pela cor violeta. As barras de escala representam, de cima para baixo, 5000 nm, 250 nm, 50 nm e 100 nm.

Fonte: Adaptada de PINTO; JOHN; SZUBA; FRAZIER. ^{45,47-49}

Uma abordagem comum para estudar a formação de filamentos de septinas é através da produção dos oligômeros *in vitro*, expressando seus genes de forma recombinante. O controle da polimerização desses oligômeros pode ser alcançado variando a concentração salina da amostra. Foi demonstrado em diversos estudos que, em concentrações salinas elevadas (geralmente acima de 300 mM), a polimerização das septinas é reduzida. Em vez de formar filamentos, predominam os oligômeros em forma de bastões, cujo tamanho depende da composição de septinas

envolvidas. A formação de filamentos, por outro lado, pode ser induzida pela redução da concentração salina, geralmente abaixo de 100 mM. Esse processo é comumente realizado através de dialise nas amostras preparadas, diminuindo a força iônica da solução.^{20,45}

Outros fatores têm sido associados ao controle da polimerização das septinas *in vitro* e *in vivo*, como a ligação e hidrólise de nucleotídeos,⁵⁰ a composição dos complexos,⁵¹ a associação das septinas com outras proteínas, como Borgs e Cdc42 em humanos,⁵² ou Gic1 e Cdc42 em leveduras,⁵³ bem como a interação das septinas com membranas.^{49,54} No entanto, os detalhes moleculares de como esses fatores afetam a polimerização ainda precisam ser elucidados.

De maneira geral, um dos pontos críticos do estudo das septinas e seu processo de polimerização é a falta de estruturas de alta resolução dos complexos. O presente estudo teve como objetivo contribuir com o aspecto estrutural de septinas humanas para melhor compreender detalhes moleculares da interação entre essas proteínas na formação de complexos, utilizando a criomicroscopia eletrônica (Crio-ME) como ferramenta. Na literatura, a maioria dos estudos estruturais de septinas foi realizada utilizando a cristalografia de raios-X de monômeros e dímeros, que foi essencial para a compreensão das dinâmicas moleculares dessas proteínas a nível atômico. Entretanto, há uma dificuldade intrínseca em obter cristais de septinas, principalmente no caso de grandes complexos, provavelmente devido ao tamanho dos oligômeros que são a base para a formação de filamentos (geralmente hexâmeros e octâmeros). Além disso, esses complexos apresentam uma flexibilidade inerente que pode dificultar o processo de cristalização. A Crio-ME tem sido uma grande aliada na resolução de complexos de proteínas em geral e mostrou-se muito eficiente no estudo de complexos de septinas estudados nesse trabalho. A possibilidade de estudar os complexos fora das restrições impostas por uma rede cristalina representa uma das principais vantagens da técnica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter informações moleculares dos heterocomplexos de septinas e compreender melhor seu processo de automontagem por meio da utilização da microscopia eletrônica de transmissão e análise de partícula isoladas.

2.2 Objetivos Específicos

- Expressão e purificação dos complexos de septinas humanas e de *Ciona intestinalis*.
- Caracterização de complexos e análise de qualidade das amostras por microscopia eletrônica de transmissão e preparo de amostras por contrastação negativa.
- Identificação da ordem de heterocomplexos através da coleta e processamento de dados de micrografias por análise de partículas isoladas:
 - Complexo HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 para comparação com o complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 que demonstrou uma contradição em relação à ordem publicada na literatura e sua relação com a regra de Kinoshita.
 - Complexo de CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 para determinação de ordem e comparação com complexo humano
- Otimização do preparo de grades de complexos de septinas por vitrificação.

- Coleta de micrografias de alta resolução de heterocomplexos de septinas através do método da criomicroscopia eletrônica e reconstrução tridimensional para a obtenção de informações moleculares através do processamento de dados por análise de partículas isoladas.
- Construção e interpretação dos modelos estruturais obtidos, analisando a influência dos detalhes moleculares na automontagem dos complexos e funções biológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção *in vitro* dos complexos de septinas

Todas as septinas que compõem os complexos de interesse foram produzidas por meio do método de expressão heteróloga em bactérias. As proteínas foram expressas individualmente ou co-expressas em dímeros, de acordo com a composição necessária de cada complexo para cada experimento. Os complexos foram reconstituídos *in vitro* pela mistura das suspensões celulares correspondentes antes da ruptura das células. Para isolar os complexos formados, foram realizadas uma ou duas etapas de purificação por cromatografia de afinidade, dependendo da presença de caudas específicas nos plasmídeos utilizados, seguidas por uma etapa de cromatografia de exclusão molecular. Os procedimentos experimentais são descritos com mais detalhes nos tópicos a seguir.

3.1.1 Plasmídeos e expressão heteróloga

Os plasmídeos utilizados neste projeto foram planejados e preparados por outros projetos em nosso grupo de pesquisa, e suas informações estão resumidas na Tabela 1. Todas as combinações de septinas para a formação de complexos possuem pelo menos uma cauda de histidina, o que permite a posterior purificação dos complexos por cromatografia de afinidade.

Para marcar uma das proteínas e analisar a ordem dos complexos hexaméricos de septinas humanas e de *Ciona intestinalis*, foram utilizadas construções nas quais a SEPT2 de ambos os organismos foi fusionada à proteína MBP (*maltose binding protein*). Essa fusão proporciona uma densidade adicional que pode ser visualizada após o processamento de imagens obtidas por MET.

No preparo do complexo hexamérico humano para Crio-ME, foi necessária a utilização de uma construção de SEPT2 truncada (SEPT2G), que expressa apenas o domínio G da proteína (aminoácidos 35-308). Essa abordagem foi adotada com o intuito de evitar a polimerização dos complexos e obter uma amostra mais homogênea.

O complexo octamérico de septinas de *C. intestinalis* possui uma cauda adicional (*streptag*). Essa cauda foi adicionada com o objetivo de isolar o octâmero de possíveis complexos alternativos, como hexâmero e tetrâmeros.

Tabela 1 – Construções e plasmídeos utilizados para a expressão heteróloga dos complexos de septinas.

	Plasmídeo	Código NCBI	Peso Molecular (KDa)
Septinas Humanas			
HsSEPT2_MBP HsSEPT6	pRSFDuet	NM_004404 NM_145799.3	49,8
HsSEPT2G HsSEPT6	pRSFDuet	NM_004404 NM_145799.3	49,8
HsSEPT7_histag	pETDuet	NM_001788.4	50,4
Septinas de <i>Ciona intestinalis</i>			
CiSEPT2_MBP	pMBPtDuet	XM_002125416.2	92,3
CiSEPT2_histag	pET28a	XM_002125416.2	47,1
CiSEPT6	pETDuet	XM_002123318.1	49,6
CiSEPT7_sumo	pETSUMO	XM_002131313.2	60,9
CiSEPT9_streptag	pETDuet	XM_002129160.2	36,7

Fonte: Elaborada pela autora

Para iniciar o processo, as células de *E. coli* Rosetta DE3 (Novagem) foram transformadas com 100 ug de cada plasmídeo para 200 ug de células por meio de choque térmico. As células que incorporaram os plasmídeos foram selecionadas devido à resistência aos antibióticos presentes. Para o experimento de determinação da ordem dos hexâmeros humanos, foram realizadas duas preparações distintas. Na primeira, os plasmídeos contendo SEPT2-MBP+SEPT6 e SEPT7-His foram co-transformados nas células. Na segunda preparação, a SEPT7-His foi expressa separadamente. Para o experimento de Crio-ME, SEPT2G+SEPT6 e SEPT7-His também foram expressas separadamente.

Para os plasmídeos de *C. intestinalis*, foi realizada uma co-transformação para a produção de dímeros na expressão heteróloga, utilizando os plasmídeos correspondentes para SEPT2 e SEPT6, assim como SEPT7 e SEPT9 (no caso dos octâmeros).

Inicialmente, um pré-inóculo de 25 mL foi preparado a partir de colônias isoladas de *E. coli*, contendo os plasmídeos de interesse, em meio LB suplementado com antibióticos de seleção. Esse pré-inóculo foi incubado por 14 horas a 37 °C e agitação de 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para 1L de meio LB contendo os mesmos antibióticos de seleção e incubado a 37 °C sob agitação de 250

rpm até que a densidade óptica (DO) atingisse um valor entre 0.5-0.8 a 600 nm. Uma vez alcançado esse valor de DO, a expressão das proteínas foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG, seguido de incubação a 18 °C e agitação a 250 rpm por 18 horas. As células foram então coletadas por centrifugação a 6000 x g por 30 min, a 4°C, e a suspensão celular resultante foi armazenada a -80 °C até o momento da purificação.

Para simplificação, os complexos de septinas humanas serão abreviados como HsSEPT2-SEPT6-SEPT7, e os complexos de *C. intestinalis* serão abreviados para CiSEPT2-SEPT6-SEPT7 (-SEPT9, para o octâmero), indicando a fusão com MBP ou a utilização do domínio G quando necessário.

3.1.2 Purificação do complexo HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7

A suspensão celular foi solubilizada em 50 mL de tampão A (25 mM HEPES, pH 7.8, 800 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol, 5% [v/v] glicerol) adicionado de um comprimido de coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich). No caso da expressão independente de SEPT7, as suspensões celulares foram misturadas antes do rompimento das células para garantir a formação do complexo desde o início do processo.

As células foram rompidas por sonicação a fração solúvel foi separada da insolúvel por centrifugação à 10000 x g por 60 minutos a 4°C. Para a purificação por cromatografia de afinidade, a fração solúvel foi aplicada em uma coluna de níquel HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare) pré-equilibrada com o tampão A e foi submetida à lavagem com o mesmo tampão contendo 30 mM de imidazol. O complexo foi então eluído durante um gradiente linear do tampão com uma concentração crescente de imidazol, variando de 30 a 500 mM.

O complexo passou por uma segunda cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de amilose (New England Biolabs), e a eluição foi realizada com o tampão A contendo 10 mM de maltose. As frações de eluição foram concentradas e aplicadas em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), que foi pré-equilibrada com tampão A. A pureza e integridade do complexo foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

3.1.3 Purificação do complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7

Devido à observação de uma expressão mais lenta do dímero SEPT2G-SEPT6 em comparação com SEPT7, foi utilizada uma proporção de 3:1 em volume de SEPT2G-SEPT6 para SEPT7, a fim de obter uma maior de complexos hexaméricos. As suspensões celulares foram solubilizadas em conjunto, adicionando 50 mL de tampão A para cada litro de expressão, contendo 0,1 mg/ml de lisozima, e mantidas em gelo por 30 minutos. O rompimento celular e a purificação seguiram o mesmo procedimento descrito para o complexo anterior, no entanto, utilizando o tampão B (25 mM Tris-HCL, pH 7,8, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 5% glicerol). Foi adicionada também uma etapa de lavagem com Triton X-100 0,1%. Após a cromatografia de afinidade, as frações contendo o complexo foram submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular, utilizando um tampão agora com 300 mM de NaCl e sem glicerol. O complexo eluído foi mantido em gelo até a preparação das grades para Crio-ME.

3.1.4 Purificações dos complexos *C. intestinalis*

A purificação do complexo hexamérico contendo MBP para o experimento de determinação da ordem do complexo seguiu o mesmo procedimento mencionado anteriormente para o complexo humano. No entanto, o complexo octamérico, que inclui uma cauda de histidina na SEPT2 e uma cauda strep na CiSEPT9, passou por uma purificação por cromatografia de afinidade adicional utilizando uma coluna StrepTrap HP (Cytiva), utilizando um tampão acrescido de 2.5 mM de destiobiotina.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

3.2.1 Preparo de amostra por contrastação negativa

Após a purificação das proteínas, os complexos utilizados para determinar a ordem das septinas utilizando uma proteína de fusão foram preparados por contrastação negativa. Esse método é comumente utilizado para obter informações preliminares, em baixa resolução (10-20 Å), sobre a qualidade da amostra e o formato da proteína de forma geral. A presença da densidade adicional das proteínas de fusão pode ser observada no limite de resolução da técnica após o processamento das

imagens. Essa abordagem foi escolhida por ser mais rápida e não exigir uma alta concentração de proteína (geralmente inferior a 0,1 mg/mL).

O método consiste na substituição do tampão da proteína por uma solução contendo sais de metais pesados em uma grade com suporte de carbono contínuo. Os sais de metais pesados formam um envoltório ao redor das moléculas biológicas, proporcionando contraste e uma alta relação sinal-ruído. Isso ocorre porque o espalhamento dos elétrons é mais intenso ao interagir com os átomos pesados do que com a amostra biológica.⁵⁵

O procedimento foi iniciado com a diluição dos complexos proteicos com o tampão de purificação correspondente, a fim de obter concentrações de 0,02 a 0,05 mg/mL. Para permitir a interação da amostra com uma superfície hidrofílica, as grades de cobre cobertas por um filme fino de carbono (PELCO) foram submetidas a uma carga negativa utilizando o easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System (PELCO). Após esse procedimento, foram depositados 3 µL da amostra na grade e aguardou-se por 1 minuto, seguido de uma lavagem com 3 µL de água ultrapura. Em seguida, foi realizada uma ou duas aplicações de 3 µL de solução de acetato de uranila a 2%, aguardando-se 30 segundos entre cada aplicação. Após a aplicação de cada solução na grade, o excesso de líquido foi removido com papel filtro. As grades foram então armazenadas em temperatura ambiente até a realização da análise e coleta de dados.

3.2.2 Preparo de amostra por vitrificação

No método de vitrificação, o contraste na amostra biológica é obtido através da própria amostra, ao contrário do método de contrastação negativa. Devido à menor relação sinal-ruído nesse método, é necessária uma coleta de dados maior para posterior processamento, em comparação com o método de contrastação negativa. Na vitrificação, a amostra é congelada em uma fina camada de gelo amorfo não-cristalino, preservando-a em seu estado nativo ao mantê-la hidratada e protegendo-a dos danos causados pela irradiação dos elétrons.⁵⁵ Para isso, a amostra em solução aquosa é aplicada na grade e rapidamente congelada em etano líquido, de forma suficientemente rápida para evitar a formação de gelo cristalino.⁵⁶

As amostras preparadas para o método de vitrificação não continham glicerol em seu tampão final, pois o uso de glicerol pode afetar a obtenção de mapas de alta resolução em Crio-ME. Portanto, as grades foram preparadas com amostras recém purificadas. Os complexos proteicos foram diluídos para uma concentração de 0,2 a

0,5 mg/mL. Em seguida, 3 μ L da solução foram aplicados nas grades do tipo Quantifoil (PELCO), que foram previamente carregadas negativamente utilizando o easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System (PELCO). O congelamento das grades em etano líquido foi realizado de forma automatizada utilizando o Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific), com as configurações de 100% de umidade e 4°C na câmara de preparo.

3.2.3 Coleta de dados

As micrografias das amostras preparadas para a análise da ordem do complexo HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 foram coletadas manualmente no microscópio de 200 kV Talos Arctica, equipado com uma câmera Ceta e tamanho de pixel 2,51 Å. Já as micrografias do complexo CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 foram coletadas no microscópio de 200 kV Talos F200c, equipado com uma câmera Ceta e tamanho de pixel 2,02 Å. Ambos os microscópios utilizados são da marca Thermo Fisher Scientific.

As grades do complexo hexamérico HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7, preparadas por vitrificação para a obtenção de uma estrutura em alta resolução, foram analisadas e os filmes foram coletados automaticamente no LNNano – CNPEM (Laboratório Nacional de Nanotecnologia / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brasil) utilizando o microscópio Titan Krios, equipado com corretor Cs e câmera Falcon 3EC, ambos da marca Thermo Fisher Scientific. Foram coletados um total de 8915 filmes, com tamanho de pixel 0,86 Å e desfocagem de -1,5 e -2,0 μ m. A dose total de exposição foi de 30 $e^-/\text{Å}^2$, dividida em 20 *frames*.

O complexo octamérico CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 foi analisado nas instalações do LNNano – CNPEM, e posteriormente, foi otimizado e coletado durante o estágio no exterior da autora no CBI/IGBMC (Centre for Integrative Biology / Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch Graffenstaden, França). A coleta de dados foi realizada utilizando o microscópio Titan Krios (Thermo Fisher Scientific), equipado com corretor Cs e câmera K3 (Gatan). Foram coletados um total de 11549 filmes, com tamanho de pixel 0,86 Å e desfocagem variando de -0,8 a -2,5 μ m. A dose total de exposição foi de 50 $e^-/\text{Å}^2$, dividida em 50 *frames*.

3.2.4 Processamento por análise de partículas isoladas das amostras preparadas por contrastação negativa

As micrografias para determinação da ordem dos complexos de septinas HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 e CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7, preparados por contrastação negativa, foram processadas utilizando o software IMAGIC-V (Image Science Software GmbH). O primeiro passo foi a identificação e seleção das partículas por modulação, informando apenas os valores aproximados das dimensões das partículas de interesse. Em seguida, as partículas foram então extraídas em imagens individuais e passaram por um processo de classificação com o objetivo de obter uma classe que é obtida por meio da média de imagens de partículas similares. Essa classe obtida foi utilizada como referência para um segundo passo de identificação e seleção de partículas. Esse procedimento é feito com base no cálculo da correlação cruzada entre a referência e as micrografias, o que permitiu identificar mais partículas de interesse de forma mais específica.

Na classificação das partículas por MSA (do inglês *Multivariate Statistical Analysis*), o objetivo é identificar as diferentes projeções das partículas presentes nos dados. Essas diferentes projeções são visualizadas por meio das classes, que são construídas somando as imagens das partículas que possuem características e orientações semelhantes. Essas classes têm uma relação sinal-ruído maior em relação com as imagens não processadas.

Para realizar essa classificação, foi utilizada uma estratégia de aplicação de diferentes máscaras, descrita anteriormente na dissertação de mestrado da autora⁴³ e no artigo publicado⁵⁷. Essa estratégia permite localizar a densidade da proteína de fusão e sua localização, revelando onde a septina fusionada está posicionada em relação ao complexo.

3.2.5 Processamento por análise de partículas isoladas das amostras preparadas por vitrificação (Crio-ME)

A análise de partículas isoladas é um processo dinâmico e que requer um alto poder computacional devido à grande quantidade de dados coletados. É importante ressaltar que essas etapas podem variar dependendo do software e dos algoritmos utilizados, bem como da complexidade da amostra e das perguntas de pesquisa

específicas. Além disso, o processo de análise de partículas isoladas é altamente iterativo, exigindo ajustes e refinamentos ao longo do caminho para obter resultados confiáveis e interpretáveis. As principais etapas do processamento são mencionadas a seguir.

Um dos elementos que desempenhou um papel crucial no avanço da técnica de Crio-ME foi o advento de novos detectores diretos de elétrons, o que permitiu a aquisição de filmes em vez de exposições individuais integradas. Por isso, o primeiro passo no processamento dos dados consiste em converter esses filmes em micrografias, corrigindo o movimento das partículas que ocorre quando a amostra é exposta ao feixe de elétrons, por meio de alinhamento e soma dos *frames* coletados.

As imagens coletadas apresentam erros sistemáticos, uma vez que a informação real do objeto analisado não é totalmente transferida para os dados, o que pode ser expresso matematicamente pela Função de Transferência de Contraste (CTF, do inglês *Contrast Transfer Function*). A estimativa dessa função é importante para que as imagens sejam posteriormente corrigidas, com o intuito de recuperar as informações perdidas.⁵⁵ Além disso, a estimativa do CTF é utilizada para avaliar a qualidade das micrografias e selecionar aquelas de melhor qualidade para o processamento de dados.

O próximo passo envolve a seleção das partículas de interesse presentes nas micrografias e sua extração como imagens individuais. Existem diversas abordagens para essa seleção, que podem variar desde métodos manuais até abordagens totalmente automatizadas. As partículas são comparadas umas com as outras e agrupadas com base em sua similaridade, por meio de um processo conhecido como classificação 2D. A média das partículas resultantes é denominada classe e apresenta uma relação sinal-ruído melhor em comparação com as imagens não processadas. Essa etapa permite a avaliação das partículas obtidas em termos de composição e conformação, além da remoção das partículas indesejadas.

A partir de um conjunto de imagens contendo as partículas de interesse em diversas orientações, os próximos passos envolvem a reconstrução tridimensional da molécula analisada para a obtenção de um mapa de potencial final. A orientação relativa dessas partículas é desconhecida e, devido ao número limitado de partículas presentes nas micrografias, a informação completa não pode ser totalmente recuperada, sendo então obtida por aproximação.⁵⁵ Em geral, o processo de reconstrução 3D é iterativo, em que cada nova reconstrução é utilizada como

referência para o próximo ciclo, resultando em uma melhoria na precisão da atribuição dos ângulos e na geração de mapas de maior resolução. Diferentes algoritmos podem ser utilizados nessa etapa, dependendo do software utilizado, e foram descritos por Penczek em um artigo de revisão.⁵⁸

Complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7:

Os filmes obtidos para a obtenção de uma estrutura de alta resolução foram processados inicialmente com o software IMAGIC para realizar a correção da câmera e a correção da anisotropia de magnificação. Em seguida, os filmes foram alinhados e somados usando o software MotionCor2. As micrografias resultantes foram importadas para o software cryoSPARC2, onde a estimativa do CTF foi realizada por meio da função Patch CTF. Foram selecionadas apenas as micrografias com estimativa de CTF melhor que 5Å de resolução.

Inicialmente, aproximadamente 200 partículas foram selecionadas manualmente e utilizadas em uma classificação 2D, visando obter uma referência. Essa referência foi então utilizada em uma nova etapa de seleção de partículas por meio de correlação cruzada. Após vários ciclos de classificação 2D, as melhores classes obtidas foram separadas.

Em seguida, foram selecionadas 100 micrografias que continham a maior quantidade das partículas pertencentes às melhores classes obtidas anteriormente. Essas micrografias foram submetidas a uma nova seleção de partículas usando o software Topaz. Essa ferramenta utiliza redes neurais para um reconhecimento mais preciso das partículas de interesse nos dados coletados.

Após novos ciclos de classificação 2D com as partículas selecionadas, um total de 328.801 partículas foram utilizadas nos próximos passos de processamento. A reconstrução 3D *ab initio* foi realizada, gerando dois mapas iniciais como uma forma de refinar ainda mais o conjunto de partículas. Ambos os mapas passaram por refinamentos e as partículas pertencentes ao melhor mapa 3D foram utilizadas em um ciclo adicional de classificação 2D e refinamento 3D. Isso resultou em um mapa final, onde foram utilizadas 108.262 partículas.

A qualidade do mapa final foi estimada por meio da Fourier Shell Correlation (FSC), comparando dois mapas independentes gerados a partir de metade das

partículas cada. Esse cálculo da FSC fornece uma medida da resolução do mapa, indicando até que ponto os detalhes estruturais podem ser confiáveis.

Complexo CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 :

Os filmes coletados foram processados inicialmente com o software WARP, para alinhamento e soma dos *frames*. Em seguida, as micrografias foram importadas no software cryoSPARC2, onde foi realizada a estimativa do CTF utilizando a função Patch CTF. Foram selecionadas apenas as micrografias com estimativa de CTF com resolução melhor que 5Å.

Após uma seleção manual de partículas e a obtenção de referências por classificação 2D, foi realizada uma etapa seleção de partículas automatizada por correlação cruzada. Seguindo um procedimento similar ao mencionado anteriormente para o complexo humano, foram utilizadas 304.316 partículas nas etapas seguintes do processamento. Foi realizado um refinamento local de CTF nas partículas finais, as quais foram novamente utilizadas para um refinamento local do mapa tridimensional. Esse refinamento utilizou uma máscara gerada no software Relion 4.0. A qualidade do mapa obtido foi estimada por meio da FSC e da análise de resolução local no software cryoSPARC2.

3.3 Pós-processamento

3.3.1 Análise de flexibilidade

A análise de flexibilidade do mapa de alta resolução obtido por Crio-ME foi realizada utilizando a ferramenta 3DVA (do inglês, *3D Variability Analysis*) presente no software cryoSPARC2. Essa ferramenta utiliza um algoritmo probabilístico de análise de componentes principais para produzir diferentes mapas 3D, permitindo revelar a heterogeneidade conformacional da partícula de interesse e analisar seu movimento contínuo. Os resultados dessa análise foram visualizados utilizando o software Chimera, que permite a visualização e análise interativa de estruturas moleculares.

3.3.2 Construção do modelo estrutural e refinamento

O modelo estrutural baseado no mapa de potencial gerado por Crio-ME e o refinamento foram realizados utilizando os softwares Coot e Phenix. Como modelo inicial, foram utilizadas estruturas cristalográficas de septinas humanas previamente publicadas contendo apenas o domínio G de SEPT2-SEPT6 (PDB 6UPA) e SEPT7 (PDB 6N0B). Para o complexo de *Ciona intestinalis*, foram gerados modelos estruturais preditos com o software AlphaFold.

Inicialmente, as estruturas foram encaixadas individualmente como corpos rígidos no mapa de Crio-ME utilizando a ferramenta Dock in Map do Phenix. Em seguida, foi realizado um refinamento em espaço real e uma inspeção manual do modelo para aprimorar sua qualidade e concordância com o mapa.

No caso do complexo humano, a região da hélice $\alpha 0$ e HL que antecede foram construídas manualmente com base no mapa de potencial eletrônico, uma vez que estão ausentes nas estruturas cristalográficas utilizadas como modelo inicial. Para avaliar a qualidade dos resultados, os principais parâmetros utilizados foram: CC(mask) durante o refinamento, que avalia a correlação do modelo com o mapa, o MolProbity, que valida geometricamente modelo final, e o EMRinger, que analisa o encaixe das cadeias laterais no mapa de potencial.

Os resíduos de aminoácidos importantes para a interface-NC do complexo foram determinados utilizando o software DIMPLOT. Além disso, em colaboração com o pesquisador Paulo Sérgio Lopes de Oliveira (LNBio/CNPEM), foi realizada uma análise da cavidade interna presente no complexo utilizando o programa KVFinder. As áreas de superfície das regiões de interação da interface-NC foram calculadas utilizando o PISA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Septinas humanas

Uma parte deste trabalho teve como objetivo compreender a nível molecular as interações das septinas humanas na formação de complexos. O complexo hexamérico formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7 foi selecionado devido à sua maior estabilidade em comparação com os complexos previamente investigados no grupo de pesquisa para o estudo das septinas *in vitro*.

O primeiro objetivo deste trabalho foi confirmar a ordem do complexo mencionado, devido a dúvidas que surgiram a partir de um estudo referência na literatura (Sirajuddin *et al.*)¹⁹ e a um resultado inconsistente observado em um complexo similar (SEPT5-SEPT6-SEPT7)⁴³, como explicado previamente na introdução deste documento e relatado na dissertação de mestrado da autora.

Posteriormente, a técnica de Crio-ME foi empregada para obter informações estruturais mais detalhadas sobre o complexo em questão e melhor compreender a interação entre suas interfaces. O objetivo era alcançar uma resolução superior em comparação com o estudo de referência do complexo e obter informações abrangentes sobre o complexo em sua forma hexamérica.

4.1.1 Ordem do hexâmero HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7

Desde 2007, com o estudo realizado por Sirajuddin *et al.*¹⁹, acredita-se que a ordem dos complexos hexaméricos de septinas humanas posiciona a SEPT2 no centro do complexo (SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7). Esse modelo foi corroborado em 2011 pelo estudo de Kim *et al.*⁴⁰ para o complexo octamérico de septinas humanas. Ao provar que SEPT7 e SEPT9 interagem, por influência do estudo de Sirajuddin, foi proposto que o modelo octamérico também posiciona a SEPT2 no centro (SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9). Uma das implicações desse modelo é que, ao evitar a polimerização usando uma solução com alta concentração salina, a interface exposta do hexâmero seria uma interface-G. No entanto, esse comportamento é inconsistente com um dos complexos de septinas mais estudados na literatura, o octâmero de *Saccharomyces cerevisiae*.

Devido à dúvida gerada pela incompatibilidade do experimento anteriormente realizado com o hexâmero contendo SEPT5 durante o projeto de mestrado da autora (conforme descrito na introdução), e considerando também a incompatibilidade com o modelo proposto por Sirajuddin et al., foi necessário repetir o experimento publicado por Sirajuddin et al. para verificar a ordem correta do hexâmero humano contendo SEPT2.

Para esse propósito, o complexo contendo a SEPT2 fusionada à MBP foi produzido de duas maneiras diferentes: expressando SEPT2-SEPT6 e SEPT7 separadamente e, em seguida, unindo-as antes da purificação, e também coexpressando SEPT2-SEPT6 e SEPT7. Não foram observadas diferenças significativas entre as purificações das expressões independentes e coexpressas. A Figura 12 apresenta um cromatograma de exclusão molecular representativo da preparação do complexo coexpresso, bem como um gel SDS-Page mostrando a pureza da amostra e a presença das septinas do complexo após a eluição. Devido aos pesos moleculares muito próximos de SEPT6 e SEPT7, não foi possível distingui-las no gel. Além disso, foi observada a presença de uma banda adicional correspondente à degradação da SEPT7 (SEPT7d) em seu domínio C-terminal. Essa degradação é regularmente observada em purificações que envolvem a SEPT7 e já foi relatada na literatura.¹⁹⁻⁴⁴ Para ambos os tipos de expressão, a pureza das amostras foi equivalente.

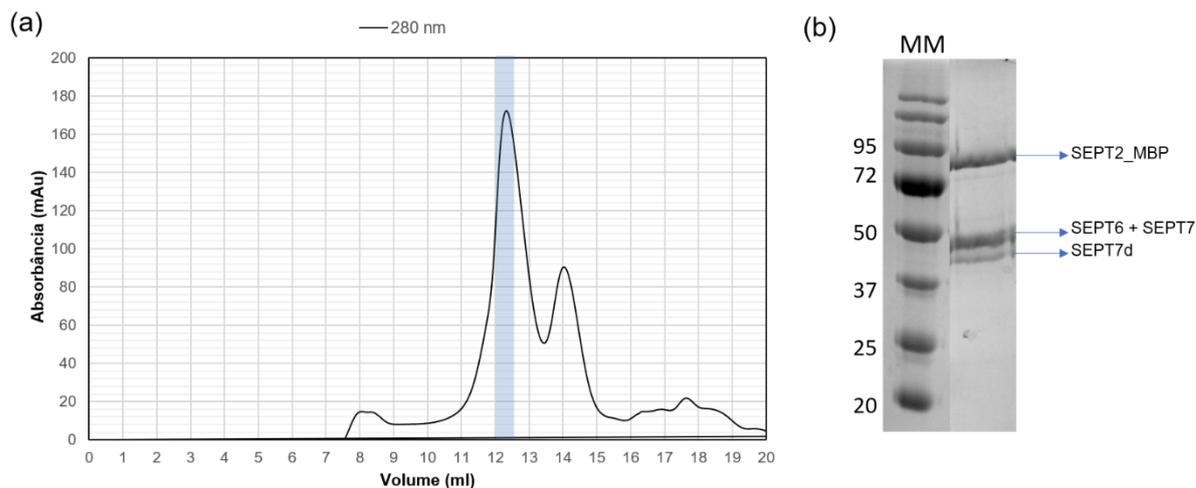


Figura 12 – Purificação do complexo hexamérico HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300. A barra azul evidencia a fração coletada da eluição e utilizada no preparo de grades para TEM. (B) Análise por gel SDS-PAGE da amostra utilizada à direita, incluindo à esquerda o padrão de massas moleculares (em kDa). A presença das bandas correspondentes às três septinas estão identificadas, onde SEPT6 e SEPT7 possuem massas moleculares similares e não podem ser distinguidas. Adicionalmente há a presença de uma banda adicional que corresponde à uma versão degradada da SEPT7 (identificada como SEPT7d) já conhecida na literatura, que ocorre devido à uma degradação da região C-terminal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ambas as amostras foram preparadas usando a técnica de contrastação negativa e foram coletadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13A). Os dados foram processados por meio da análise de partículas isoladas (Figura 13B e Figura 13C), e as classes obtidas representam as partículas presentes nas micrografias com uma resolução suficiente para distinguir as densidades correspondentes às septinas formando um complexo alongado. Esses complexos são visualizados como seis esferas em sequência, com aproximadamente 4nm de diâmetro e um comprimento total de aproximadamente 25 nm.

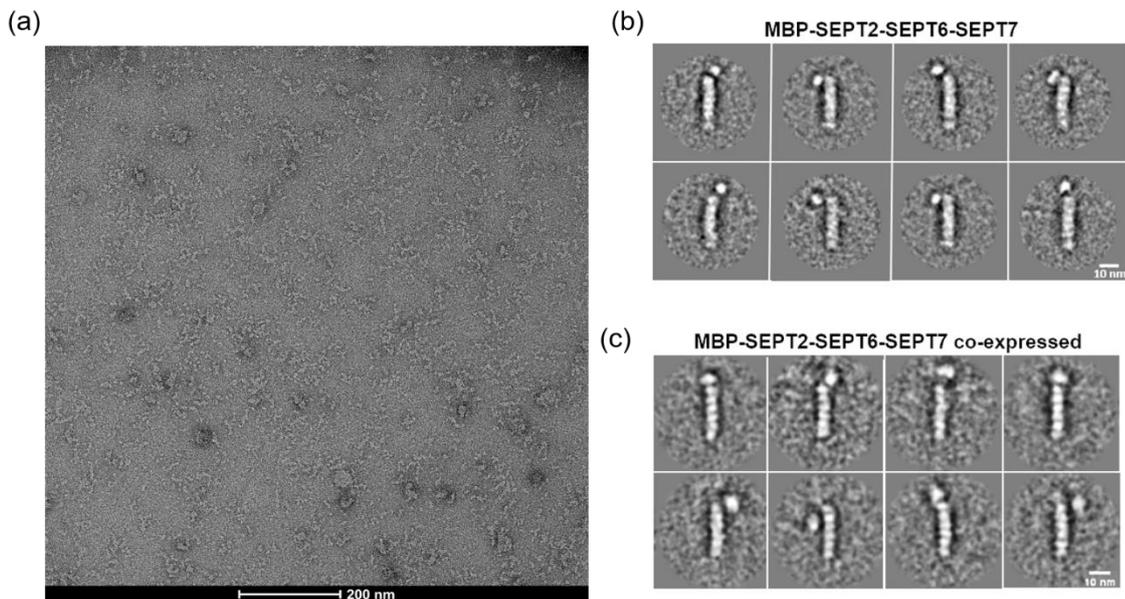


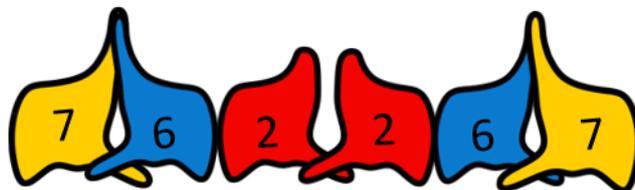
Figura 13 – TEM por contrastação negativa do complexo hexamérico HsSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7 (A) Micrografia representativa da coleta de dados do complexo co-expresso, utilizada para análise de partículas isoladas evidenciando a presença das partículas de hexâmeros de septinas em formato alongado. Barra de escala de 200 nm. (B) Classes representativas obtidas através do processamento de dados da amostra em que SEPT2-SEPT6 foi expressa independentemente de SEPT7. (C) Classes representativas da amostra em que as três septinas foram co-expressas. Ambos os itens B e C mostram uma densidade extra correspondente à proteína de fusão MBP localizada em diversas posições ao redor da extremidade do complexo.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*

A densidade adicional observada nas classes corresponde à MBP, e é evidente que ela se posiciona em torno da extremidade do complexo hexamérico. Esse comportamento também foi observado anteriormente para o complexo contendo a SEPT5, e a flexibilidade da posição da MBP ao redor do complexo se deve ao *linker* que conecta a septina à proteína de fusão. A MBP não é facilmente encontrada nas duas extremidades justamente devido à essa flexibilidade. A variação de posição das duas unidades de MBP dificulta o alinhamento simultâneo de ambas através do algoritmo de classificação das imagens, fazendo com que apenas uma delas apresente uma melhor relação sinal ruído após a soma das imagens (classes).

Portanto, pode-se concluir que a SEPT2, assim como a SEPT5, se posiciona na extremidade do complexo (Figura 14). Esses experimentos esclarecem a ordem do complexo hexamérico de septinas humanas, contradizendo o modelo previamente proposto na literatura por Sirajuddin *et al.*¹⁹ Além disso, a concordância na ordem dos dois complexos demonstram a regra de Kinoshita, que confirma que a posição das septinas dentro do complexo pode ser ocupada por outra septina pertencente ao mesmo grupo.

Modelo antigo (Sirajuddin *et al.*):



Modelo novo:

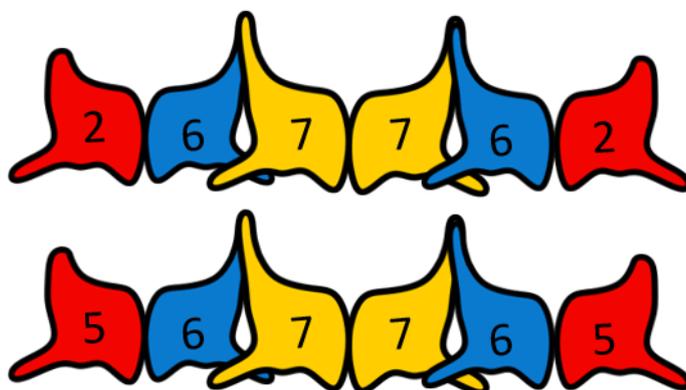


Figura 14 – Modelo esquemático representando acima o modelo proposto por Sirajuddin *et al* e aceito anteriormente na literatura, posicionando a SEPT2 no centro do complexo hexamérico e, abaixo, o modelo corrigido e comprovado para os complexos hexaméricos que contém tanto a SEPT2, quanto a SEPT5, posicionados na extremidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

O novo modelo é mais coerente ao analisar as diferenças entre as interfaces -G e -NC que se alternam na formação do complexo em relação à estabilidade das mesmas. Uma análise anterior, apresentada na dissertação de mestrado da autora, revela que as interações que estabilizam a interface-NC são predominantemente compostas por pontes salinas. Além disso, a interface NC apresenta uma área de contato e energia de ligação menores em comparação com a interface-G.⁴³

Para melhor compreender o efeito da força iônica na interface, em colaboração com o professor Fernando L. Barroso da Silva, uma simulação de Monte Carlo foi realizada para determinar a energia de interação entre as subunidades nas duas interfaces, em função de suas separações em diferentes concentrações salinas. Os resultados revelaram que acima de 100 mM de NaCl, a interface-NC entre SEPT2-SEPT2 é menos estável em comparação com a interface-G entre SEPT7-SEPT7. Isso indica que a interface-NC é mais suscetível à ruptura em uma solução com alta

concentração salina, corroborando com a observação de que essa é a interface exposta.

O fato de que apenas a interface-NC entre SEPT2 (e não a interface NC entre SEPT6 e SEPT7) se rompe em solução de alta força iônica poderia ser explicada pela diferença de tamanho entre os *coiled coils* de cada dímero (SEPT2-SEPT2 e SEPT6-SEPT7). A presença de um *coiled coil* maior feito entre SEPT6-SEPT7 poderia conferir maior estabilidade a essa interface. Entretanto, estudos anteriores realizados por Sirajuddin outros experimentos realizados em colaboração com a autora, demonstraram que o hexâmero ainda pode se formar na ausência da região C-terminal do dímero SEPT6-SEPT7 em alta concentração salina. Isso indica que o *coiled coil* do dímero SEPT6-SEPT7 não é essencial para a formação do complexo e subsequente formação de filamento. Por outro lado, a presença do *coiled coil* parece ser mais determinante para a interface SEPT2-SEPT2, uma vez que a polimerização através dessa interface é comprometida na ausência do mesmo domínio, mesmo em baixa concentração salina.²⁵ Portanto, são necessários estudos estruturais para compreender melhor as diferenças e a estabilidade dessas interfaces ao longo do complexo, a fim de aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de formação dos oligômeros e a formação de filamentos.

Esses resultados foram complementares aos obtidos anteriormente para o complexo composto por SEPT6/SEPT7 em conjunto com SEPT5, em vez de SEPT2, durante o mestrado da autora, visando a publicação de um artigo. Nesse mesmo período, outro grupo de pesquisa chegou a uma conclusão semelhante sobre a ordem invertida dos complexos humanos, embora de uma forma mais indireta.⁵⁹ Nesse estudo, observou-se que tanto hexâmeros quanto octâmeros poderiam compor o mesmo filamento, o que só é possível se ambos os complexos tiverem o mesmo tipo de interface exposta na extremidade para permitir a interação (Figura 15).

No mesmo estudo, considerando que a SEPT9 se posiciona na região terminal do complexo (modelo antigo), foi realizada uma mutação na região N-terminal de SEPT9 para verificar se isso impediria a polimerização em filamentos. Essa mesma estratégia já havia sido empregada para septinas de leveduras.²⁴ Após a análise do complexo mutado neste artigo, foi concluído que a amostra formava tetrâmeros, indicando que a SEPT9 poderia estar posicionada no centro do complexo. O pré-print da autora e deste outro grupo de pesquisa foram submetidos no mesmo dia na plataforma bioRxiv. O modelo sugerido para o hexâmero, após os experimentos

realizados durante esse projeto, corrobora a observação de que hexâmeros e octâmeros podem interagir e se polimerizar em um mesmo filamento, pois ambos possuem a mesma terminação: a interface-NC da SEPT2 (Figura 15).

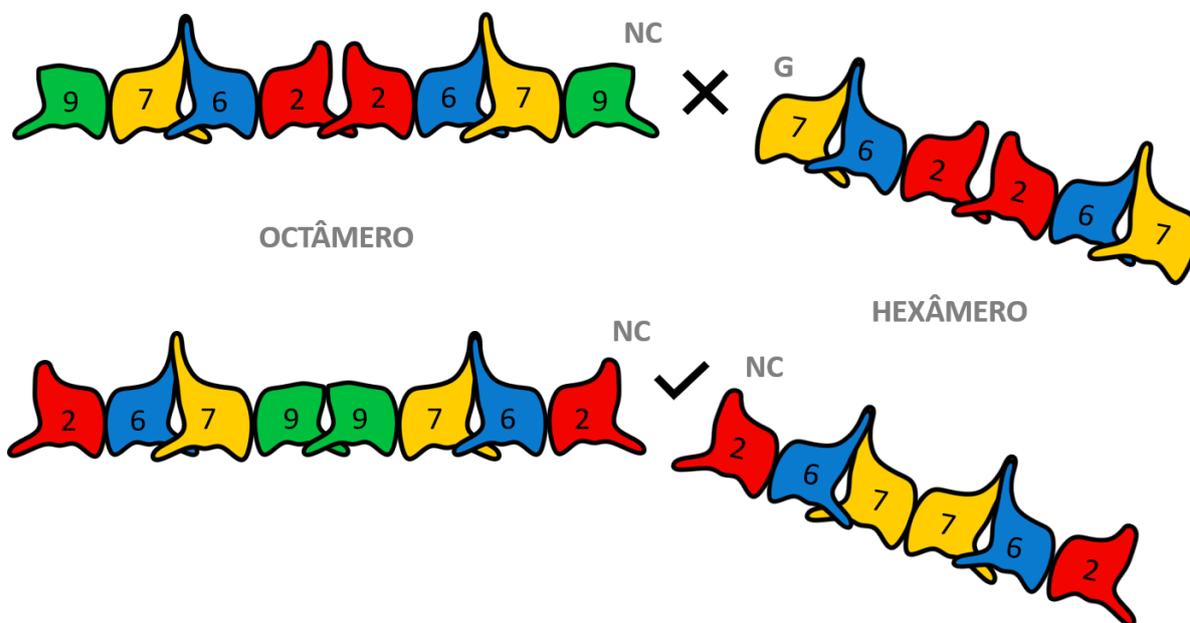


Figura 15 – Modelo esquemático representando a interação entre complexos hexaméricos e octaméricos na formação de filamentos. O primeiro caso, acima, mostra o modelo aceito anteriormente na literatura, onde o octâmero deixaria uma interface-NC exposta, não compatível com a interface-G deixada pelo hexâmero, impossibilitando a existência de um filamento composto pelos dois complexos. O segundo caso, abaixo, mostra o modelo proposto com os resultados desse trabalho e, posteriormente comprovado por Soroor *et al*, em que tanto hexâmero quanto octâmero, expõem a mesma interface-NC da SEPT2 e podem interagir e participar da formação do mesmo filamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Crio-ME do hexâmero HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7, construção e validação do modelo estrutural

A única estrutura cristalográfica de um complexo de septinas foi resolvida no trabalho de Sirajuddin *et al.* e, desde a publicação deste trabalho em 2007, nenhuma outra estrutura de um complexo de septinas foi publicada na literatura. A estrutura apresenta um trímero (SEPT2-SEPT6-SEPT7) na unidade assimétrica, podendo gerar dois possíveis hexâmeros com a aplicação de simetria cristalográfica, o que leva à ambiguidade discutida na seção anterior. Foram feitas algumas tentativas de cristalizar outros complexos (por exemplo, SEPT5-SEPT6-SEPT7) no grupo de pesquisa onde a autora desenvolveu este projeto. No entanto, os complexos de

septinas mostraram-se resistentes ao processo de cristalização. Esse comportamento é esperado devido ao tamanho do complexo (~150 kDa) e à sua flexibilidade intrínseca.

Para contornar esse problema e obter informações estruturais importantes para desvendar os detalhes de interação entre as septinas, muitas estruturas de monômeros e dímeros de septinas foram resolvidas por cristalografia. Entretanto, devido ao próprio processo de cristalização, informações como a flexibilidade das partículas são perdidas. Além disso, as proteínas são produzidas em construções truncadas, contendo apenas o domínio G, o que facilita o processo de cristalização, mas pode resultar em interações promíscuas e limitar a análise das estruturas e interações como um todo. Uma interação é considerada “promíscua” quando envolve duas septinas interagindo de forma não prevista pelo modelo do hexâmero (Figura 14) ou octâmero (Figura 15), podendo ser do tipo G ou NC.

Para obter informações estruturais das septinas e entender seu comportamento em um contexto molecular mais completo, é importante investigá-las dentro do complexo. Por isso, a utilização da técnica de Crio-ME foi utilizada nesse trabalho.

Com este objetivo, o complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 foi selecionado devido ao seu rendimento e estabilidade superiores em comparação com outros complexos estudados anteriormente pela autora. Além disso, visando obter uma amostra mais homogênea e evitar a formação de filamentos, foi utilizada uma construção de SEPT2 que possui apenas o domínio G. Essa escolha foi baseada no conhecimento prévio de que a interface exposta do complexo hexamérico em altas concentrações salinas é uma interface NC. Portanto, considerando que as regiões N e C terminais podem desempenhar um papel importante na interface, esperava-se que a deleção dessas regiões levasse a uma desestabilização da interface, impedindo a polimerização e resultando apenas na formação de hexâmeros, independentemente da concentração salina da solução. Os resultados obtidos confirmaram essa expectativa, conforme descrito a seguir. No entanto, experimentos posteriores realizados pelo mesmo grupo de pesquisa demonstraram que a deleção apenas da região C terminal já é suficiente para desestabilizar a polimerização.²⁵

A purificação do complexo é concluída com uma etapa final de cromatografia de exclusão molecular, que resultou na presença de dois picos no cromatograma mostrado na Figura 16. Além da absorvância no comprimento de onda de 280 nm do primeiro pico, foi também detectada uma alta absorvância no comprimento de onda de 253 nm. A causa dessa alta absorvância a 253 nm ainda não é totalmente

compreendida, mas ao analisar o conteúdo proteico por gel SDS-PAGE, verificou-se que não há bandas correspondentes às proteínas que compõem o complexo em quantidades significativas nesse pico. Por outro lado, o segundo pico do cromatograma contém as três septinas de interesse, e uma fração desse pico (destacada de azul nos dois itens da Figura 16) foi utilizada para a preparação da grade por vitrificação. No gel, a banda adicional identificada como SEPT7d já é conhecida na literatura e corresponde a uma degradação que ocorre na região C-terminal da SEPT7, não afetando a qualidade da amostra para os experimentos realizados.

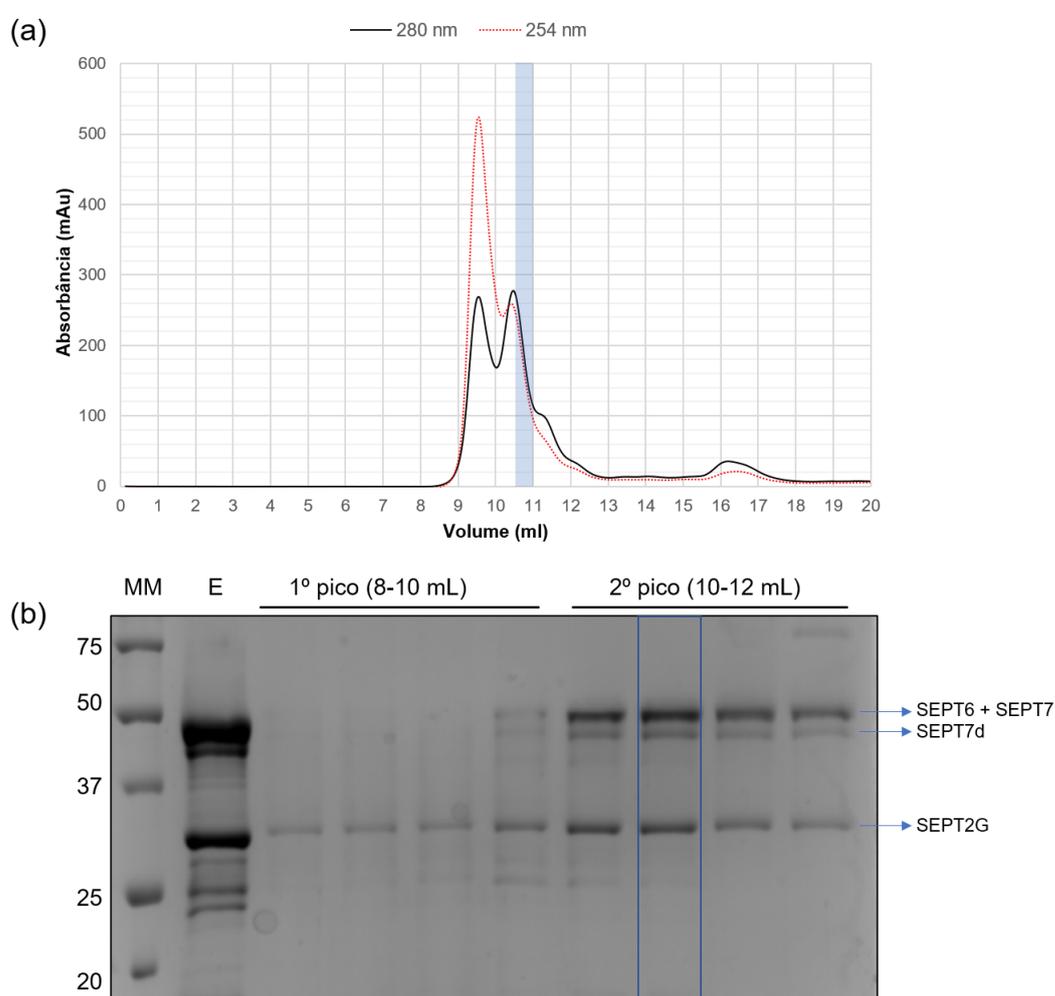


Figura 16 – Purificação do complexo hexamérico HsSEPT2G-SEPT6-SEPT (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 increase. A barra azul evidencia a fração coletada da eluição e utilizada no preparo de grades para TEM. (B) Análise por gel SDS-PAGE das frações eluídas, incluindo à esquerda o padrão de massas moleculares (em kDa). A presença das bandas correspondentes às três septinas estão identificadas, onde SEPT6 e SEPT7 possuem massas moleculares similares e não podem ser distinguidas, uma banda adicional correspondente à SEPT7 degradada. A fração destacada em azul foi utilizada para Crio-ME.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após otimizar a qualidade de diversas grades preparadas por vitrificação, testando diferentes concentrações e espessuras de gelo, a melhor delas foi selecionada para uma coleta automatizada. O conjunto de dados foi processado por análise de partículas isoladas e o fluxograma resumido das etapas de processamento pode ser visualizado na Figura 17.

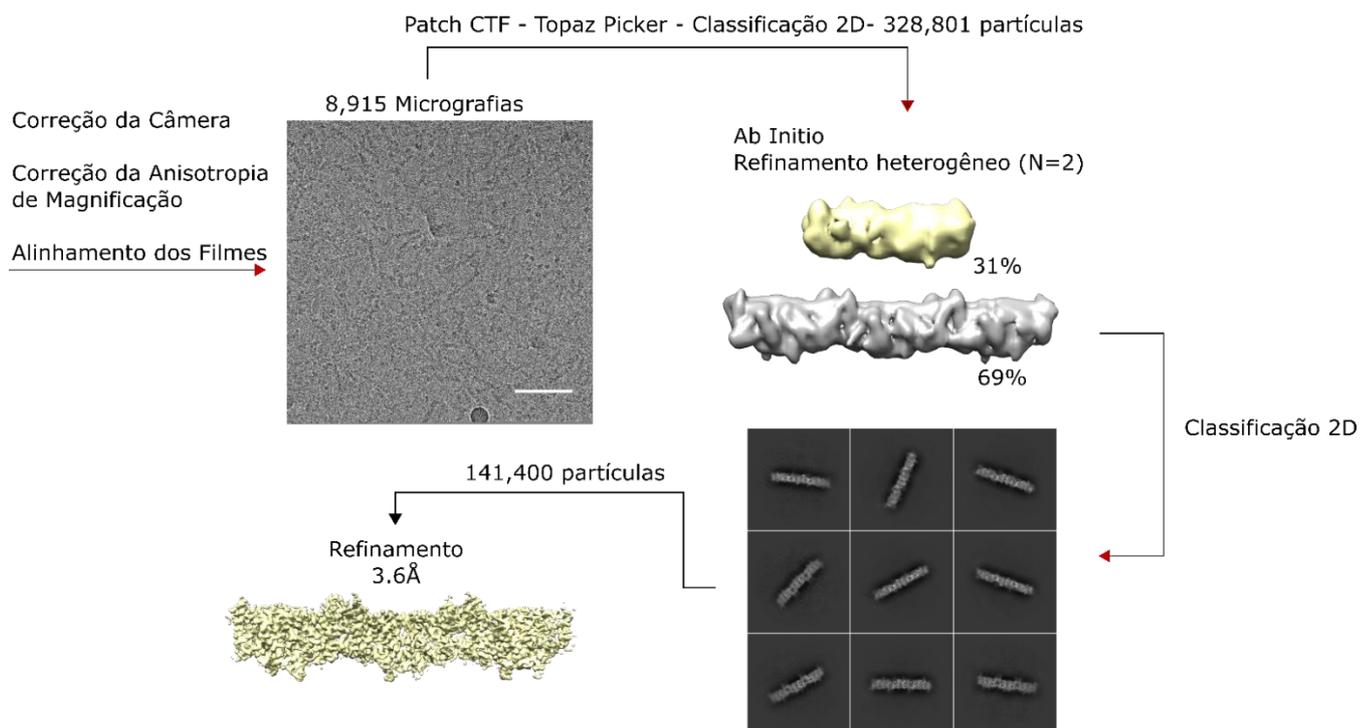


Figura 17 – Fluxograma resumido dos passos de processamento realizados por análise de partículas isoladas com os dados coletados por Crio-ME do complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos com o processamento desses dados revelaram que, mesmo após a purificação, foram identificados outros estados oligoméricos presentes na amostra. Um exemplo disso é a reconstrução de um mapa que utilizou 31% das partículas finais e apresentou um tamanho menor do que o esperado para um hexâmero. Apesar da heterogeneidade observada, foi possível obter um número suficiente de partículas para realizar a reconstrução 3D do complexo hexamérico.

As análises de resolução do mapa foram realizadas em colaboração com o pesquisador Dr. Marin van Heel. A análise de resolução global pode ser observada na Figura 18, que apresenta um gráfico do método chamado Fourier Shell Correlation. Nesse método, o conjunto de dados das partículas é dividido em dois, produzindo dois mapas independentes. Esses dois mapas são comparados posteriormente por correlação em camadas correspondentes a diferentes frequências espaciais.

À medida que a frequência espacial aumenta, a contribuição do sinal das proteínas diminui, tornando o mapa cada vez menos definido pela proteína e mais afetado pelo ruído estocástico em altas frequências espaciais. Diferentes critérios podem ser usados para determinar o ponto em que os dois mapas deixam de se correlacionar, fornecendo uma estimativa da resolução global do mapa final. Utilizando o critério $\frac{1}{2}$ -bit, a resolução global foi estimada em 3,6 Å, enquanto o critério 0.143 resultou em uma estimativa de 3.5 Å. O segundo critério é o mais comumente utilizado na literatura.

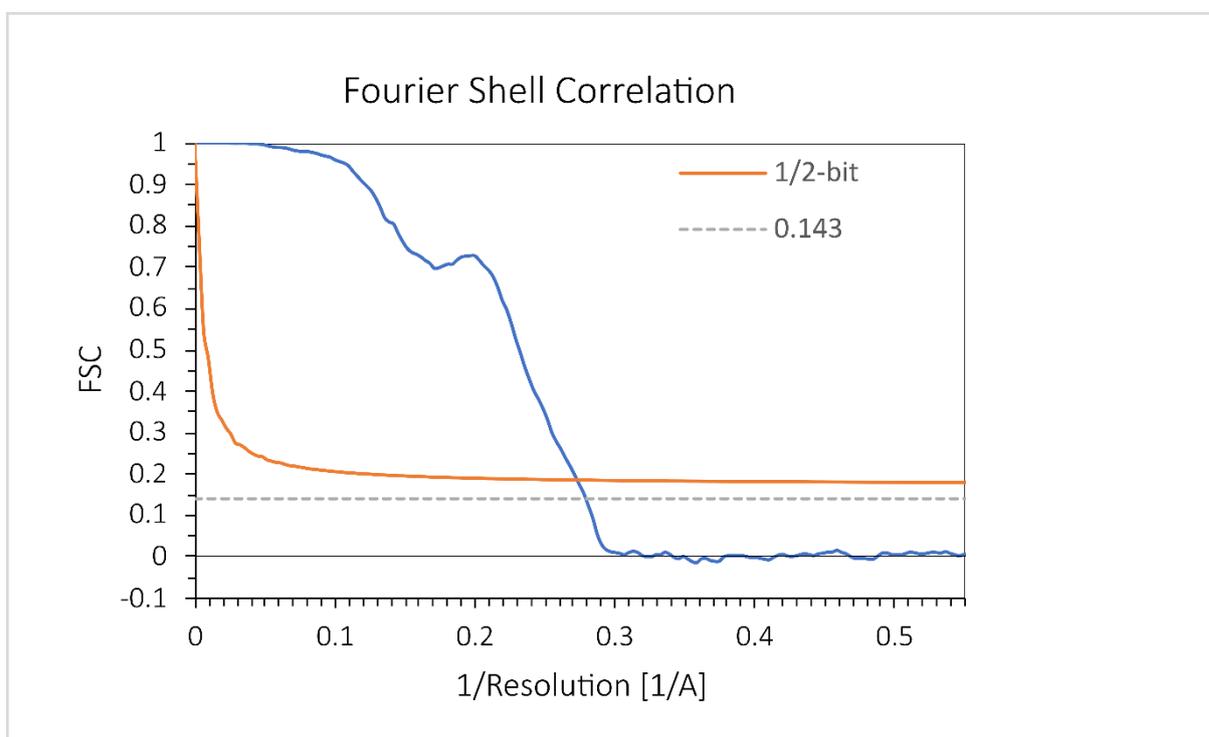


Figura 18 – Fourier Shell Correlation (FSC) do mapa obtido por Crio-ME do complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7, para análise de resolução global. O critério $\frac{1}{2}$ -bit indicou uma resolução de 3.6 Å (linha laranja) e o parâmetro 0.143 está representado em uma linha pontilhada da cor cinza, indicando uma resolução de 3.5 Å.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A resolução local do mapa de potencial obtido também foi estimada (Figura 19). Esse cálculo é relevante, pois a diferença de resolução em diferentes partes do mapa pode indicar heterogeneidade na amostra (como flexibilidade, por exemplo), no processo de imageamento (como o danos causados por radiação) e no processamento de dados (como erros de alinhamento).⁶¹ As regiões mais avermelhadas no mapa indicam menor resolução, o que pode ser observado na extremidade do complexo. Além disso, algumas regiões apresentam uma resolução ainda melhor do que a resolução global (cerca de 3 Å), o que proporcionou maior

confiabilidade na interpretação do mapa nessas regiões e permitiu a construção de um modelo mais detalhado do que a estrutura cristalográfica publicada anteriormente.

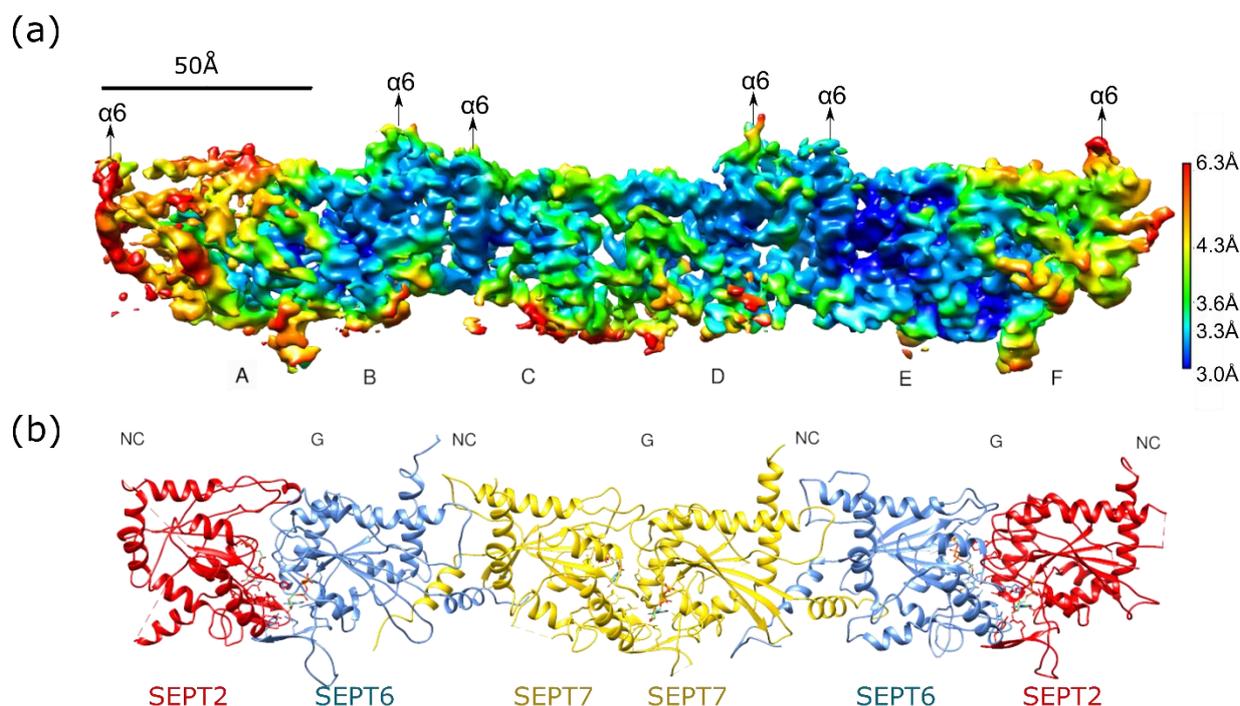


Figura 19 – Análise de resolução local e modelo estrutural obtido com o mapa de HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. (A) Resolução local representada na escala de cores apresentada à direita da figura. O azul representa uma resolução mais alta enquanto que o vermelho representa uma menor resolução. (B) Modelo estrutural obtido após encaixe das estruturas cristalográficas publicadas anteriormente na literatura, correspondentes a cada septina do complexo, e refinamento.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A orientação mostrada na Figura 19 é o que denominado de “side view”, que é perpendicular ao eixo de polimerização (horizontal) e ao eixo da direção em que as hélices $\alpha 6$ apontam (vertical). Como a resolução varia em diferentes regiões do complexo, cada subunidade foi identificada de A a F. O lado que contém as subunidades D, E e F apresenta uma resolução melhor, provavelmente devido à flexibilidade intrínseca do complexo, o que resulta em um alinhamento mais preciso em um dos lados. Além disso, outro fator que pode ter contribuído para essa diferença foi a ausência imposição de simetria C2 durante o processamento.

A partir das classes 2D e da densidade de potencial eletrônico, já era possível observar, pelo formato da partícula, que o hexâmero apresentava duas interfaces-NC expostas. Isso confirma a ordem anteriormente corrigida pela autora, através da técnica de contrastação negativa. Agora, essa evidência visual direta e conclusiva

reforça essa constatação. O modelo estrutural foi construído a partir de estruturas cristalográficas de alta resolução previamente publicadas (PDB:6UPA e 6N0B). Em termos de tamanho e ângulo de ligações, ângulos de torsões da cadeia principal e choques estéricos, os valores estão todos dentro das faixas esperadas (Tabela 2). Além disso, o resultado do Molprobity score foi de 2.13, o que é considerado bom em relação à resolução nominal. O valor do EMRinger score foi de 2.55, que é próximo ao esperado ao comparar com a distribuição de valores calculados para outros mapas depositados no EMDB com a mesma resolução.⁶² Um valor maior que 2 para a pontuação obtida por EMRinger indica uma estrutura de alta qualidade.⁶³

Tabela 2 – Estatísticas e informações sobre a coleta de dados de Crio-ME do complexo hexamérico humano SEPT6-SEPT7-SEPT9, refinamento do modelo e validação.

Coleta de dados e processamento	
Microscópio	FEI Titan Krios
Magnificação	75,000x
Voltagem (kV)	300
Dose total (e ⁻ /Å ²)	28.82
Variação de defoco (µm)	-1.5 e -2.0
Modo de coleta de dados	Counting Mode
Tamanho de pixel (Å)	0.86
Simetria imposta	C1
Número final de partículas	108,262
Resolução global (Å) - ½ bit threshold	3.6Å
-0.143 threshold	3.5Å
Resolução local (Å) - FSC ½ bit threshold	3.0 – 5.0
Refinamento	
Modelos iniciais (PDB code)	6UPA, 6N0B
Map CC (máscara)	0.76
Composição do modelo	
Cadeias	12
Nº de Átomos	12907
Nº de Resíduos	1614
Ligações (RMSD)	
Comprimento (Å) (# > 4σ)	0.004 (0)
Ângulos (°) (# > 4σ)	0.710 (0)
Validação	
EMRinger Score	2.55
MolProbity Score	2.13
Clash score	12.24
Ramachandran plot (%)	
Não aceitos	0.00
Aceitos	9.21
Favorecidos	90.79
Rotâmeros outliers (%)	0.65
Cβ outliers (%)	0.00
Plano do peptídeo (%)	
Cis prolina/geral	6.1/0.0
	continua

Twisted proline/general	0.0/0.0
CaBLAM outliers (%)	4.69
ADP (B-factors)	
Iso/Aniso (#)	12907/0
Proteína (Min/max/mean)	46.85/240.61/108.03
Ocupância	
Mean	1.00
co occ = 1 (%)	99.23
0 < occ < 1 (%)	0.77
occ > 1 (%)	0.0
Deposição	
PDB	7M6J
EMDB	EMD-23698

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

Na Figura 20, são apresentados alguns exemplos de regiões do mapa de potencial obtido. O item B destaca a região correspondente à hélice α_0 , que será mais discutida posteriormente nesse documento. É possível observar que a qualidade do mapa permite determinar a posição de algumas cadeias laterais com uma confiabilidade compatível com a resolução obtida. Entretanto, no item A, um resíduo ácido (Glu120) está destacado para ilustrar uma limitação da técnica de Crio-ME. Os danos pela radiação do feixe de elétrons podem afetar os resíduos ácidos de forma mais intensa, resultando em perda de informação no mapa de potencial das cadeias laterais dos resíduos carregados negativamente.⁶⁴

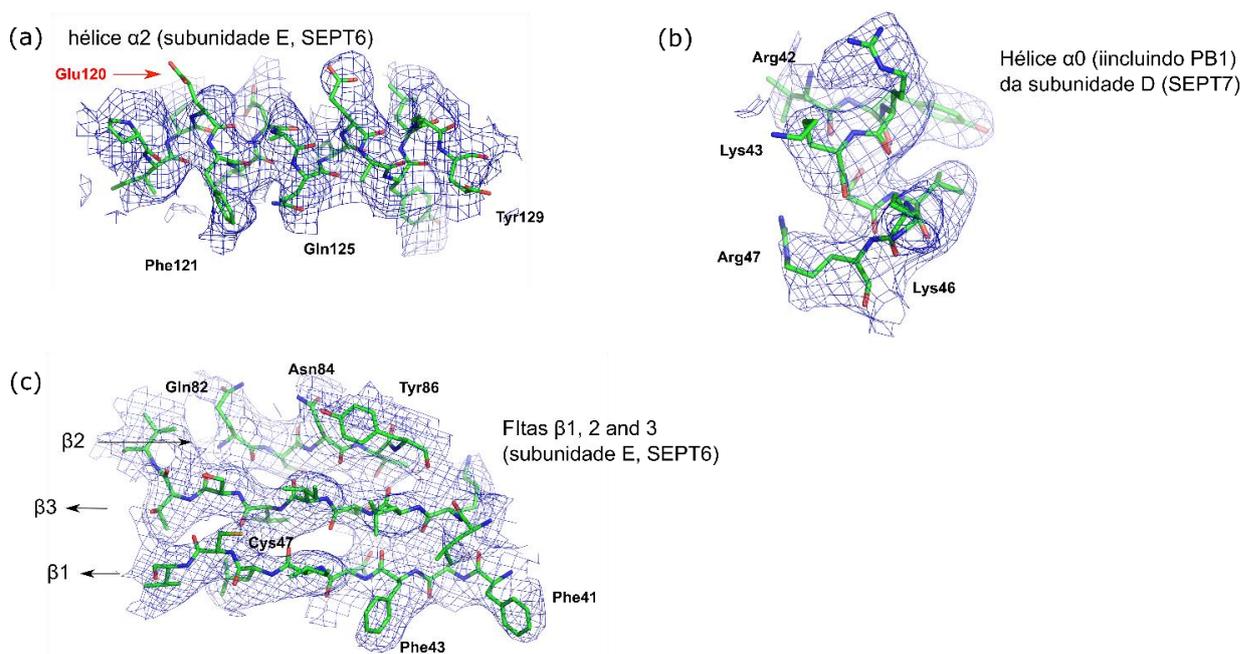


Figura 20 – Regiões do mapa de potencial obtido por Crio-ME. A) Parte da hélice $\alpha 2$ da subunidade E (SEPT6) indicando as cadeias laterais de alguns resíduos. A perda de informação da Glu120 ocorre devido à limitação da técnica para identificar a cadeia lateral de resíduos ácidos. (B) A região da hélice $\alpha 0$ da subunidade D (SEPT7) incluindo a região polibásica (PB1). (C) Parte da folha β central da subunidade E (fitas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$).

Fonte: Adaptada de Mendonça *et al.*⁶⁰

Nesse modelo, pode-se observar que as interfaces -G e -NC, que se alternam ao longo do complexo, são semelhantes ao que foi descrito anteriormente na literatura. Além disso, confirma-se que a interface-NC entre SEPT6 e SEPT7 está em uma conformação aberta, como também foi visualizado na estrutura cristalográfica do trímero. Essa conformação será discutida em maior detalhe posteriormente no documento.

4.1.3 Flexibilidade e análise de interações do hexâmero

A flexibilidade dos complexos de septinas já havia sido observada anteriormente na literatura por meio de microscopia eletrônica de transmissão.¹⁹⁻⁴⁹ Durante este projeto, também foram realizadas análises que demonstraram a presença de conformações curvas em alguns dos complexos visualizados nas micrografias. Essa flexibilidade já era esperada, uma vez que os filamentos de septinas têm a capacidade de formar estruturas circulares, como anéis, e são sensíveis à curvatura de membranas.^{27,49,65-66}

A diferença de resolução em algumas partes do complexo, conforme mostrado na Figura 19, também indica uma possível mudança conformacional. Especificamente,

a baixa resolução observada nas extremidades do complexo pode ser atribuída à flexibilidade vinda de eixos perpendiculares ao eixo principal do complexo (o mesmo eixo de direção de polimerização). Entretanto, esta é a primeira vez que podemos examinar essa flexibilidade com mais detalhes e compreender, em termos de interações moleculares, como esse movimento é permitido.

A análise de variabilidade tridimensional dos dados obtidos por Crio-ME revelou a existência de uma variabilidade de conformação em um dos componentes de PCA. Por meio dessa análise, diversos mapas são gerados e visualizados em forma de um filme, permitindo a observação dessa heterogeneidade contínua. Para ilustrar melhor esse movimento, foram utilizados dois mapas extremamente opostos em termos de conformação máxima. Esses mapas foram usados para realizar um encaixe flexível do modelo estrutural, resultando na obtenção de dois novos modelos estruturais. A fim de visualizar a extensão máxima desse movimento, metade do complexo (um trímero) dos dois modelos foi sobreposta, e a distância dessa extensão foi medida na extremidade não alinhada. A Figura 21 representa essa medida, na qual é possível observar não apenas a capacidade de extensão desse movimento, que resultou em uma distância de 22 Å entre as extremidades do modelo estrutural, mas também a direção de dobramento que ocorre no complexo. Um dos modelos é representado em cinza, enquanto o outro está colorido com base nos valores de rmsd para facilitar a análise. É perceptível que o eixo de dobramento é paralelo ao eixo das hélices $\alpha 6$, o que foi nomeado de *side-to-side bending*. Não foram observados indícios de dobramento do tipo *top-to-bottom bending* com esses dados.

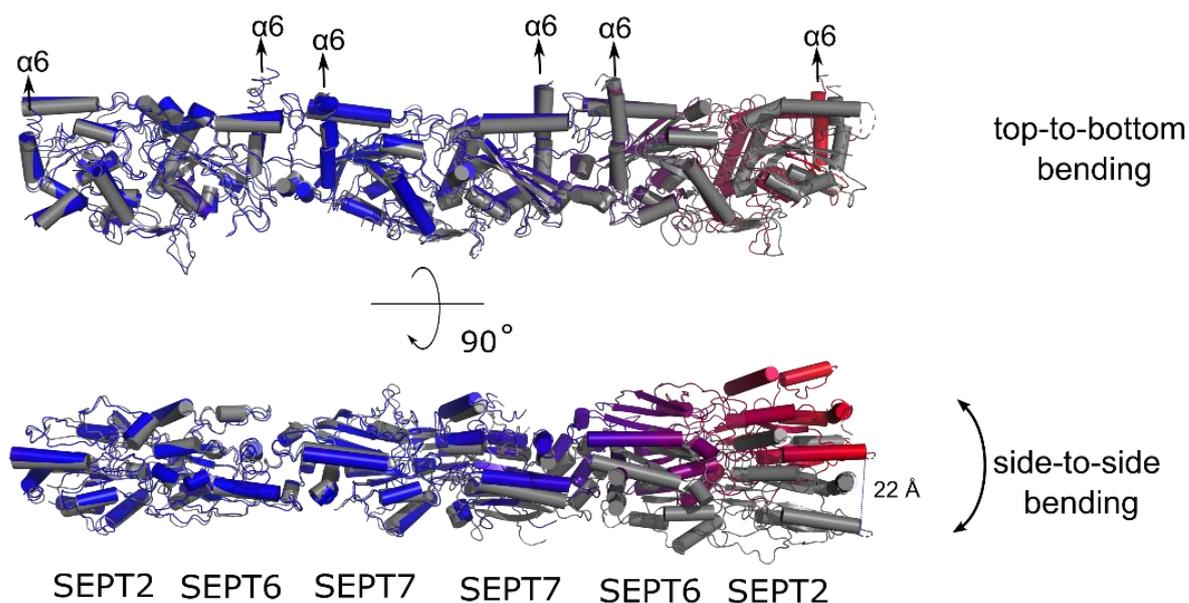


Figura 21 – Análise de flexibilidade do complexo HsSEPT2G-SEPT6-SEPT7. A análise de variabilidade do mapa 3D mostrou uma curvatura do complexo em uma direção. O modelo estrutural foi encaixado de forma flexível nas duas extremidades conformacionais dessa curvatura e os dois modelos resultantes foram sobrepostos utilizando-se apenas um trîmero. Um dos modelos está colorido em cinza e o outro em valores de rmsd, onde azul significa um menor valor e vermelho, maior valor. A figura acima mostra uma orientação lateral, com as hélices C-terminais apontando para cima, e abaixo, uma orientação superior, com as mesmas hélices agora perpendiculares ao plano da imagem (apontando para o leitor). Nessa última a extensão do dobramento (chamada *side-to-side bending*) revela uma distância de 22 Å na extremidade não sobreposta.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A análise de dobramento do complexo hexamérico pode fornecer insights importantes sobre a forma como as septinas interagem com as membranas em contexto celular. Muitos estudos têm sido conduzidos sobre esse assunto, como a influência da curvatura das membranas na interação com as septinas, bem como a região responsável das septinas por essa interação. No entanto, ainda não existe um consenso claro sobre como esse fenômeno ocorre. A movimentação do complexo descrita nesse estudo pode contribuir para desvendar esse enigma, uma vez que se o complexo apresenta uma direção de dobramento preferencial, isso indicaria a orientação do complexo ao interagir com as membranas (Figura 22).

Essa hipótese também foi levantada anteriormente em um estudo que utilizou a técnica de contrastação negativa para analisar filamentos de septinas de levedura em membranas. Devido à limitação de resolução dessa técnica, análises estruturais mais detalhadas não foram possíveis. No entanto, observou-se que a espessura do filamento ao interagir com a membrana era equivalente ao lado mais largo do domínio

G, sugerindo que os complexos estavam deitados na membrana, com os *coiled coils* alinhados paralelamente à superfície lipídica, consistente com a configuração proposta neste trabalho.⁵⁴

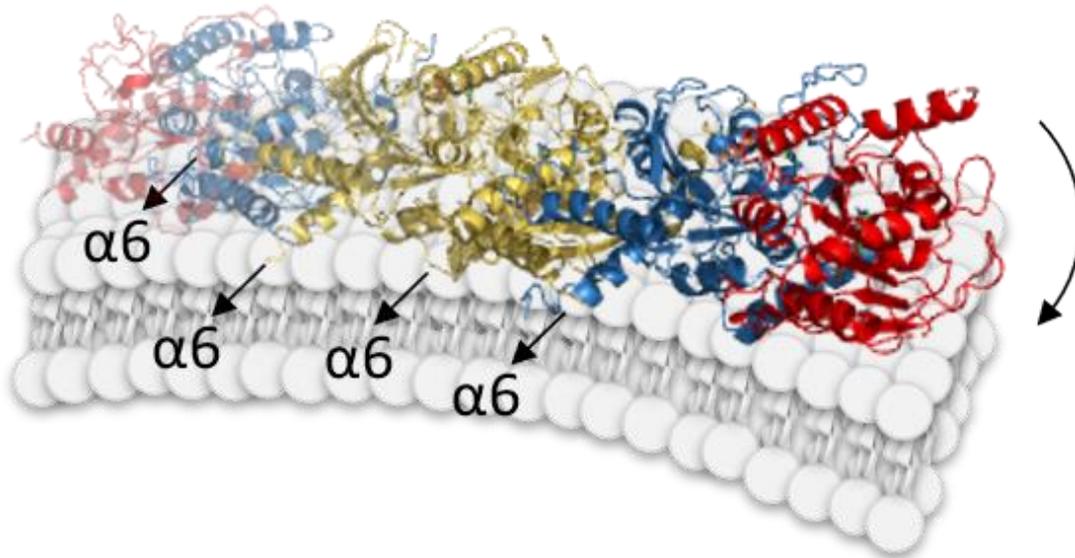


Figura 22 – Representação esquemática da orientação do complexo de septinas ao interagir com membranas com base no dobramento do tipo *side-to-side*, deixando as hélices $\alpha 6$ paralelas à superfície da membrana.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A análise dos dois modelos estruturais em orientações extremas também permitiu investigar qual interface do hexâmero é responsável por essa flexibilidade. Para isso, cada dímero dos dois modelos foi analisado independentemente do restante do complexo. Por exemplo, isolando o dímero AB (SEPT2-SEPT6), as SEPT2 dos dois modelos foram sobrepostas para calcular o rmsd do segundo monômero, no caso, SEPT6. O valor de rmsd representa o desvio espacial do segundo monômero e indica a flexibilidade daquela interface. Os cálculos mostraram que o dímero SEPT7-SEPT7 (interface-G) apresentou o maior desvio (com rmsd de 3.3 Å). Por outro lado, os dímeros SEPT2-SEPT6 (interface-G) e SEPT6-SEPT7 (interface-NC) geraram valores de rmsd próximos: 2.3 Å e 2.4 Å, respectivamente. Esses resultados sugerem que a flexibilidade do complexo hexamérico tem uma origem mais influente na interface central, representada pelo dímero SEPT7-SEPT7.

Para entender melhor por que essa interface tem maior influência no dobramento, podemos analisar a área de superfície enterrada em cada uma dessas

interfaces, que indica a extensão do contato entre os monômeros adjacentes. Com base nas informações das estruturas cristalográficas publicadas anteriormente, sabemos que a área de contato entre SEPT7-SEPT7 é menor (1660 Å) em comparação com SEPT2-SEPT6 (2033 Å), o que facilita a plasticidade gerada pela interface-G de SEPT7-SEPT7. Essa observação também se estende à comparação com dímeros formados entre SEPT2 e outros membros do grupo da SEPT6 (como SEPT8 e SEPT11). Agora, com a estrutura obtida neste trabalho, também podemos comparar com a interface que faltava, o dímero SEPT6-SEPT7, que apresenta uma área de contato ainda maior (2503 Å).

Uma outra maneira para compreender o efeito dessa movimentação é observar o formato das interações na interface-G de SEPT7-SEPT7. A área de contato nessa região apresenta uma forma oval, que pode facilitar o movimento entre as duas subunidades em uma direção específica. A Figura 23 ilustra as duas movimentações mencionadas anteriormente (*side-to-side* e *top-to-bottom*) na região de interação desse homodímero. Na figura, as hélices α_6 da SEPT7 estão apontadas para cima, expondo a região interna de interação da interface-G como se fosse um livro aberto, e seus contatos estão destacados em amarelo. Visualmente, torna-se evidente que o formato oval favorece uma maior liberdade de movimento no do caso *side-to-side bending*, onde o eixo de rotação coincide com o eixo paralelo à hélice α_6 .

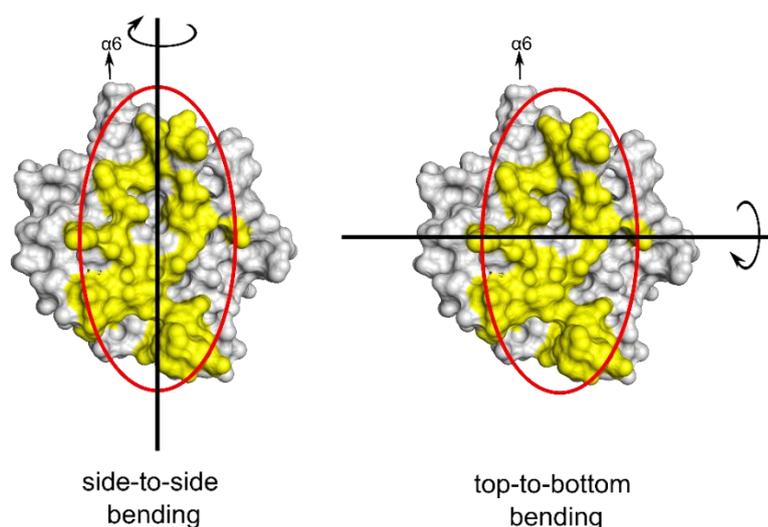


Figura 23 – Representação das interações na interface-G entre SEPT7-SEPT7. A área de contato entre as septinas está evidenciada em amarelo e possui um formato oval. Esse formato providencia uma maior facilidade para o dobramento do tipo *side-to-side*, à esquerda, visto que o eixo de rotação para esse movimento coincide com a superfície de contato. Ao contrário, o dobramento do tipo *top-to-bottom*, à direita, teria um eixo de rotação perpendicular ao formato das interações.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

Em relação às interações moleculares nessa interface-G, a presença de uma área de contato menor e o formato dessas interações ocorre devido à não participação efetiva do domínio Switch I no contato entre esses dois monômeros de SEPT7. Essa região, conhecida por ser importante na interface-G entre outras subunidades de septinas dentro do complexo, como nos dímeros formados pelos grupos da SEPT2 e SEPT6, desempenha um papel crucial na seleção do parceiro correto de interação.³²

Uma hipótese adicional que explicaria uma menor área de interação entre SEPT7-SEPT7 é que essa configuração permite uma desestabilização mais fácil dos contatos, permitindo a entrada de uma septina do grupo da SEPT3 nessa posição. Isso possibilitaria a formação de octâmeros a partir de hexâmeros, conforme ilustrado na Figura 15. Por outro lado, a interface-G heterodimérica entre SEPT7 e SEPT3 também apresenta uma menor área de interação, sem a participação do Switch I (PDB: 6UUQ).³² A fragilidade dessa interface poderia facilitar a transformação de octâmeros em hexâmeros, através da perda do dímero central de SEPT3.

4.1.4 A interface-NC SEPT6-SEPT7 e sua cavidade

A interface-G, que ocorre entre diferentes subunidades que compõem os complexos de septinas, tem sido amplamente descrita na literatura devido à abundância de estruturas cristalográficas disponíveis. Por outro lado, a interface-NC é pouco caracterizada devido à escassez de informações estruturais disponíveis para essa região.

Para relembrar, a interface-NC entre SEPT2-SEPT2 desempenha um papel importante na polimerização, uma vez que essa é a interface exposta na extremidade do complexo, seja ele um hexâmero ou um octâmero. Já a interface-NC entre as septinas do grupo da SEPT3, presentes apenas em octâmeros, encontra-se no centro do complexo. Neste estudo, foi possível realizar uma caracterização mais detalhada da interface-NC entre SEPT6-SEPT7, que é a única interface-NC interna ao complexo hexamérico, além de ser uma região presente também em octâmeros. Adicionalmente, essa é a única interface-NC heterodimérica.

Muitas das estruturas que apresentam interfaces-NC não incluem a hélice $\alpha 0$ em suas construções. A hélice $\alpha 0$ é um elemento estrutural importante para essa interface, porém, sua presença dificulta o processo de cristalização. Na literatura, a descrição da interface entre SEPT6-SEPT7, incluindo a hélice $\alpha 0$, foi relatada apenas

no estudo publicado por Sirajuddin *et al*, que apresentou a estrutura do complexo humano em baixa resolução (4 Å). No mesmo estudo, a estrutura de SEPT2-SEPT2 foi a que obteve melhor resolução (3.4 Å) e também inclui essa hélice. Outras estruturas que descrevem a interface NC são relacionadas às septinas do grupo da SEPT3, porém, em grande parte dessas estruturas, a hélice $\alpha 0$ também está ausente.

A análise da estrutura obtida neste trabalho permitiu detalhamento mais preciso da região de contato entre as duas subunidades de SEPT6 e SEPT7 na interface-NC, em comparação com a estrutura cristalográfica do complexo. Constatou-se que não há uma continuidade de interações ao longo da superfície da interface, ao contrário do que é observado nas interfaces-G. para facilitar a visualização, a interface-NC pode ser dividida em duas principais regiões: superior e inferior, conforme ilustrado na Figura 24.

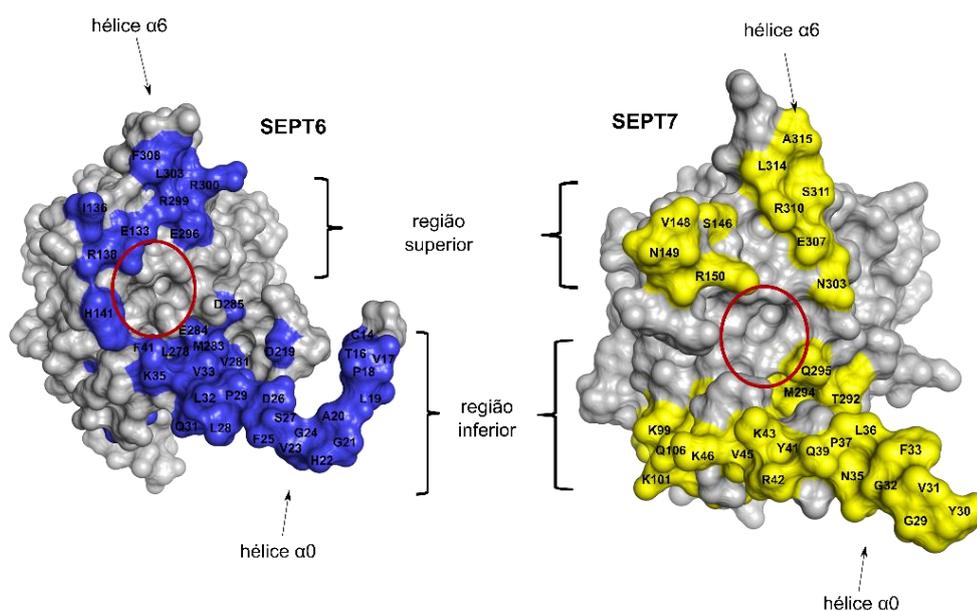


Figura 24 – Interações moleculares envolvidas na interface-NC entre SEPT6 e SEPT7. Os resíduos de contato estão identificados e evidenciados em azul (para SEPT6) e amarelo (para SEPT7). Os círculos em vermelho indicam o espaçamento deixado pela cavidade NC.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A região superior da interface-NC já foi melhor caracterizada na literatura. Essa região é composta principalmente por pontes salinas, que são formadas por resíduos localizados na hélice $\alpha 6$ e na região C-terminal da hélice $\alpha 2$, juntamente com o loop subsequente (Figura 25).²² Por outro lado, a região inferior da interface é

principalmente estabilizada por contatos entre resíduos da hélice $\alpha 0$ e será discutida em mais detalhes posteriormente.

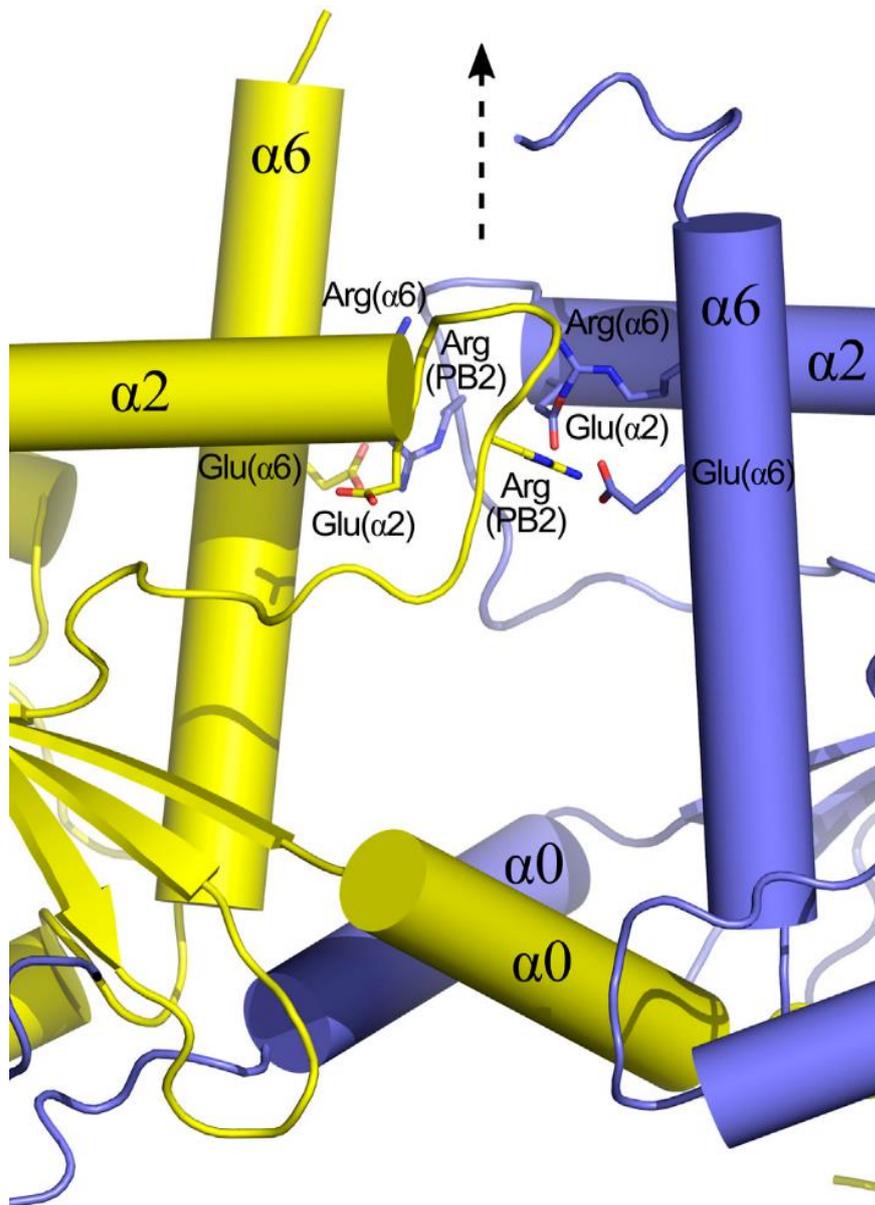


Figura 25 – Interações importantes da região superior da interface NC entre SEPT6 e SEPT7. Resíduos de contato conservados na maioria das septinas estão indicadas em ambas subunidades e os contatos eletrostáticos envolvidos na interface são realizados por: Glu($\alpha 2$) e Arg(PB2), Glu($\alpha 6$) e Arg(PB2), assim como Arg($\alpha 6$) e o dipolo da hélice $\alpha 2$.

Fonte: Adaptada de CAVINI *et al.*¹⁶

As regiões inferior e superior da interface-NC delimitam uma cavidade espaçosa entre as duas subunidades, que possui uma abertura para o exterior nas laterais. Essa cavidade pode ser visualizada com mais clareza na Figura 27. Algumas dimensões do espaço dessa cavidade foram estimadas com o software KVFinder, resultando em um volume de 4100 Å³ e uma área de superfície interna de 2400 Å².

Até o momento, não se conhece uma função específica atribuída a essa cavidade. No entanto, esse espaço é importante para que haja uma movimentação das subunidades, permitindo mudanças conformacionais conforme descrito anteriormente para o grupo da SEPT3 e ilustrado na Figura 26.²²

Foi observado que, para as septinas desse grupo, diferentes conformações são observadas dependendo do tipo de nucleotídeo ligado. A conformação canônica, denominada conformação aberta, está presente também nas septinas dos outros grupos e possui uma separação de 20 Å entre as duas hélices α_6 de cada subunidade da interface-NC. Nas septinas do grupo da SEPT3, quando em conformação fechada, ocorre uma redução de 8 Å nessa separação, além da expulsão da hélice α_0 da interface, conferindo uma liberdade conformacional que pode estar relacionada com a interação dos resíduos de carga positiva da região PB1 (contida na hélice α_0) com membranas.

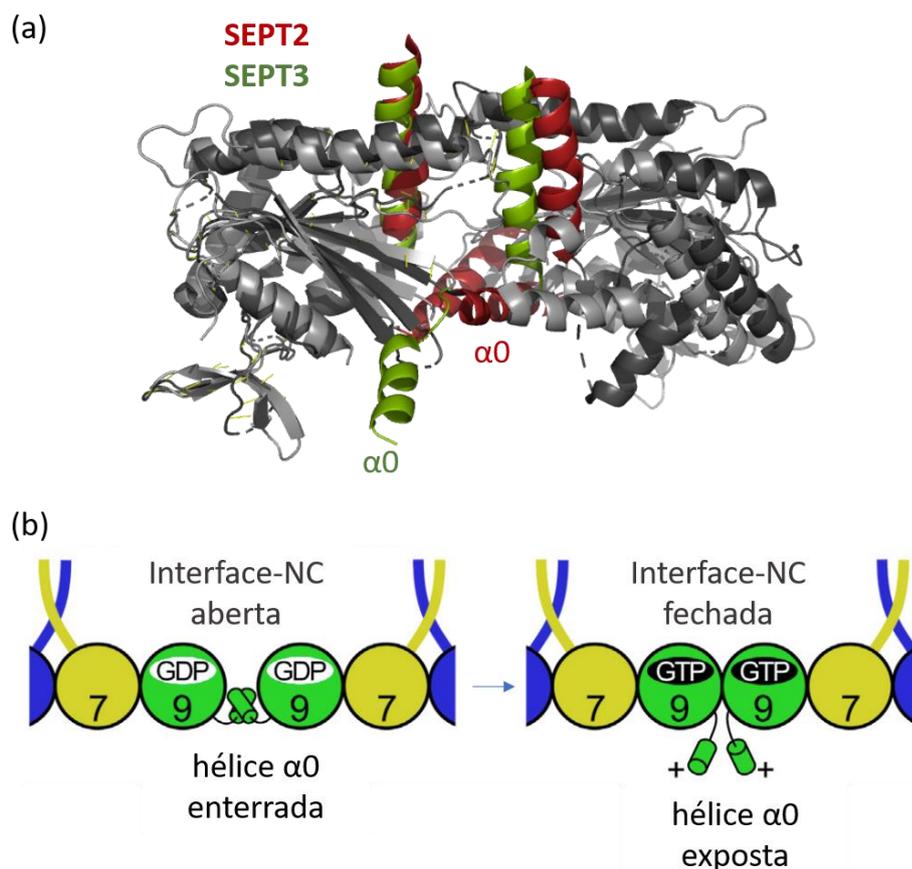


Figura 26 – Mudança conformacional da interface-NC das septinas do grupo da SEPT3 (grupo I) dependente do nucleotídeo ligado. (A) Comparação entre estruturas com a conformação aberta formada pela interface-NC entre SEPT2-SEPT2 (PDB:2QA5) e conformação fechada entre SEPT3-SEPT3 (PDB:4Z54). O fechamento da interface resulta na expulsão da hélice α_0 . (B) Esquema representativo da mudança conformacional das septinas do grupo I localizadas no centro de octâmeros.

Fonte: Adaptada de CAVINI *et al.*¹⁶

Entretanto, até o momento, esse fenômeno ainda não foi observado no caso do heterodímero SEPT6-SEPT7. Retomando a hipótese da orientação de contato entre os complexos de septinas e membranas, devido ao dobramento preferencial do tipo *side-to-side bending*, pode-se inferir que pelo menos uma das aberturas laterais dessa cavidade ficaria diretamente em contato com a superfície das membranas celulares. Portanto, é possível que essa região desempenhe uma função de interação com lipídeos durante o processo de associação.

No item C da Figura 27, um dos bolsões da cavidade está em destaque. Entre vários outros bolsões, esse em particular separa a hélice $\alpha 2$ de uma folha β abaixo dela, proporcionando liberdade de movimento e autonomia conformacional necessárias para que essa hélice atue como um meio de comunicação entre a interface-G e NC. Essa ideia foi sugerida na literatura como uma forma de explicar como o fenômeno da mudança conformacional na interface-NC mencionada anteriormente (Figura 26) é influenciada pelo tipo de nucleotídeo presente na interface-G. A presença desse bolsão contribui para a independência estrutural da hélice $\alpha 2$, facilitando seu movimento e permitindo a comunicação entre diferentes interfaces. Tanto a cavidade quanto o bolsão, observados na estrutura obtida nesse trabalho, podem ser fatores importantes para esse mecanismo.

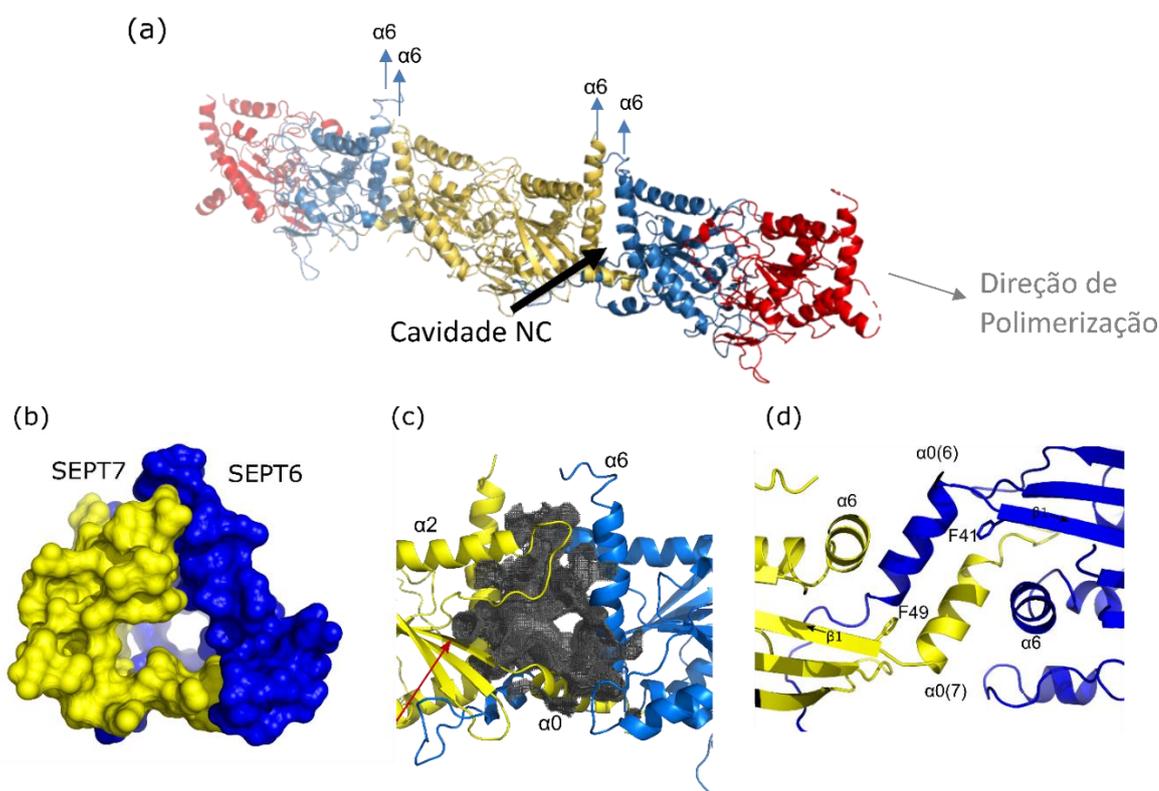


Figura 27 – Cavidade NC entre SEPT6 e SEPT7 (A) Visualização lateral do complexo evidenciando a cavidade NC com uma seta preta. (B) Abertura da cavidade visualizada entre as superfícies das duas subunidades da interface, limitada pela região inferior composta pelas hélices $\alpha 0$ de cada septina, formando a menor área de contato dessa interface, e a região superior contendo interações conservadas de pontes salinas. (C) Na mesma orientação representada no item B, a superfície interna da cavidade está representada em cinza escuro. O bolsão que separa a hélice $\alpha 2$ da folha β abaixo está evidenciado com uma seta vermelha. (D) Base da cavidade NC em detalhes estruturais.

Fonte: Adaptada de MENDONÇA *et al.*⁶⁰

A base da cavidade é fechada pelas duas hélices $\alpha 0$ de cada subunidade, que estão empacotadas de forma antiparalela, formando um ângulo de 44° , próximo ao ângulo esperado de 50° devido à natureza de interações entre as cadeias laterais de hélices α em geral.⁶⁷ A área enterrada entre as hélices $\alpha 0$ é de 2570 \AA^2 . Na Figura 27D, destacam-se duas fenilalaninas (F41 na SEPT6 e F49 na SEPT7), uma em cada subunidade, marcando o início do domínio G.

4.1.5 A hélice $\alpha 0$ na interface-NC

A nova estrutura do hexâmero, com uma resolução superior, permitiu uma análise mais detalhada das hélices $\alpha 0$ que formam a base da cavidade mencionada anteriormente. Essas hélices contêm uma região polibásica, também conhecida como PB1, em suas regiões C-terminais. A região PB1 da hélice $\alpha 0$ da SEPT7 é composta

por 7 resíduos (${}_{41}\text{YRKSVKR}_{47}$), dos quais 4 são carregados positivamente. Em contraste, a região equivalente na SEPT6 (${}_{33}\text{VNKSVSQ}_{39}$) contém apenas um resíduo carregado positivamente, que é uma lisina, e, portanto, não é considerada uma região polibásica. A Figura 28 ilustra como os contatos feitos pelas hélices $\alpha 0$ estabilizam suas posições na interface-NC.

A região PB1 de SEPT7 pode ser subdividida em duas partes com base na posição dos dois pares de resíduos carregados: a região proximal (R42 e K43) e a região distal (K46 e R47). Ambas as regiões são importantes para a interação com a SEPT6 nessa região inferior da interface-NC.

Na região proximal da PB1, o resíduo R42 da SEPT7 interage com as carbonilas da cadeia principal da região C-terminal da hélice $\alpha 5$, no cotovelo formado entre essa hélice e a hélice $\alpha 6$. Essa estrutura de cotovelo entre as hélices é uma característica comumente observada em quase todas as estruturas cristalográficas de septinas na literatura. Além disso, esse cotovelo faz parte da chamada região SUE, que exibe uma estrutura altamente conservada, sugerindo o seu potencial papel funcional na estabilização da hélice $\alpha 0$ na interface-NC.

O segundo resíduo dessa região, K43, corresponde ao único resíduo carregado positivamente nessa região em SEPT6, e também interage com a subunidade vizinha de forma semelhante. A cadeia lateral de K43 está direcionada para dois resíduos ácidos da hélice $\alpha 6$ da SEPT6: E288 e D285.

Na região distal, foi observado que apenas um resíduo (K46) é responsável pelo contato com a região poliácida (PAR) da subunidade vizinha, e sua cadeia lateral está direcionada para os resíduos D218 e D219. O segundo resíduo da região distal, R47, aponta para o espaço da cavidade e está direcionado também para o resíduo E288.

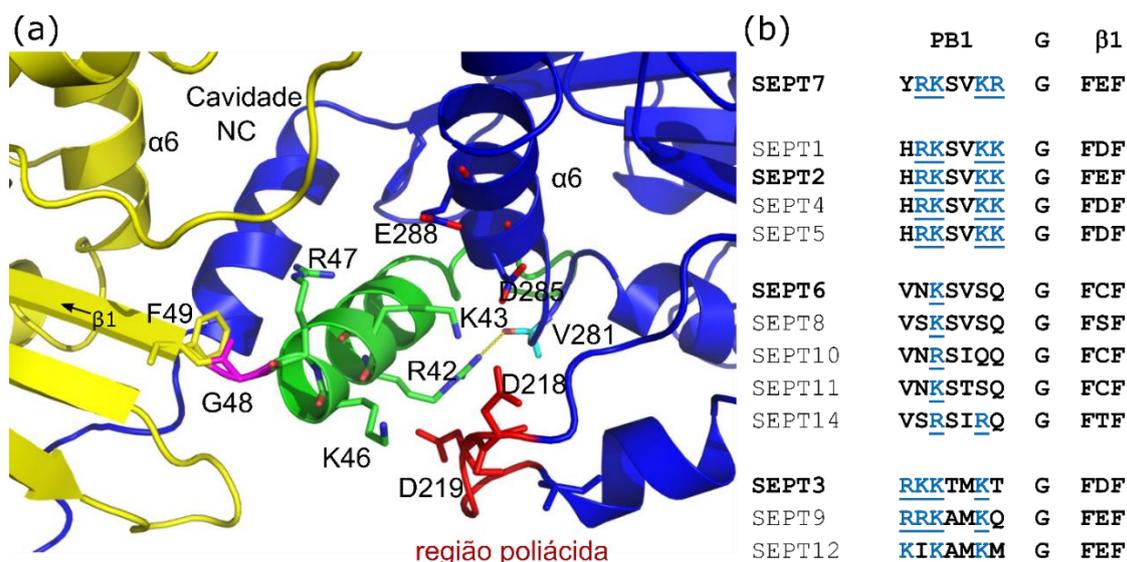


Figura 28 – Detalhes moleculares da hélice $\alpha 0$ (A) Região inferior da interface-NC, evidenciando a hélice $\alpha 0$ da SEPT7 (em verde) e suas cadeiras laterais dos resíduos básicos presentes. Na região proximal, R42 interage com uma carbonila livre do resíduo V281 da SEPT6 no cotovelo formado ao final da hélice $\alpha 5$, enquanto K43 interage com resíduos ácidos de $\alpha 6$. Na região distal, K46 interage com a região poliácida (em vermelho) e R47 aponta para o espaço da cavidade NC. O resíduo conservado G48 indicado em roxo conecta da hélice $\alpha 0$ à fita $\beta 1$ do domínio G, que é iniciado com F49, e permite com que a hélice $\alpha 0$ seja expulsa da interface quando em sua conformação fechada. (B) Comparação sequencial da região PB1 entre os diferentes grupos de septinas, evidenciando os resíduos básicos em azul.

Fonte: Adaptada de Mendonça *et al.*⁶⁰

Na literatura, tem sido amplamente discutida a região responsável pela interação das septinas com membrana, e foi demonstrado que a região PB1 desempenha um papel importante nesse processo. No caso das leveduras, apenas a hélice $\alpha 0$ da septina central (Cdc10), que é análoga às septinas do grupo da SEPT3 humana, parece ser a mais determinante para essa função.⁵⁴ Além disso, o mecanismo de interação pode ser explicado pela capacidade do grupo da SEPT3 humana de expor a hélice $\alpha 0$ ao alterar sua conformação aberta para fechada, permitindo que os resíduos básicos dessa hélice entrem em contato com os lipídeos da membrana. Algumas diferenças na região PB1 do grupo da SEPT3 podem explicar como a hélice $\alpha 0$ pode ser mais facilmente exposta, uma vez que a análise realizada para o caso da SEPT6/SEPT7 mostrou que essa região é estabilizada dentro da interface. O grupo da SEPT3 possui uma distribuição de cargas positivas diferente (Figura 28B), onde o último resíduo da região não possui carga, o que pode enfraquecer as interações que mantêm a hélice na interface, facilitando sua liberação. Além disso, as septinas do grupo da SEPT3 possui uma arginina na posição 1 (Figura

29), apontando para fora da interface, o que potencialmente permite iniciar uma interação com os lipídeos negativamente carregadas na membrana.

Comparativamente, a interface-NC formada entre duas SEPT2, que é responsável pela polimerização do complexo, provavelmente não sofre essa mudança conformacional, e sua hélice $\alpha 0$ não está diretamente envolvida na interação com membranas. Isso ocorre porque a distribuição de cargas na hélice $\alpha 0$ da SEPT2 segue o mesmo padrão da SEPT7. A Figura 29 resume as interações da hélice $\alpha 0$ com a subunidade vizinha para os diferentes grupos de septinas.

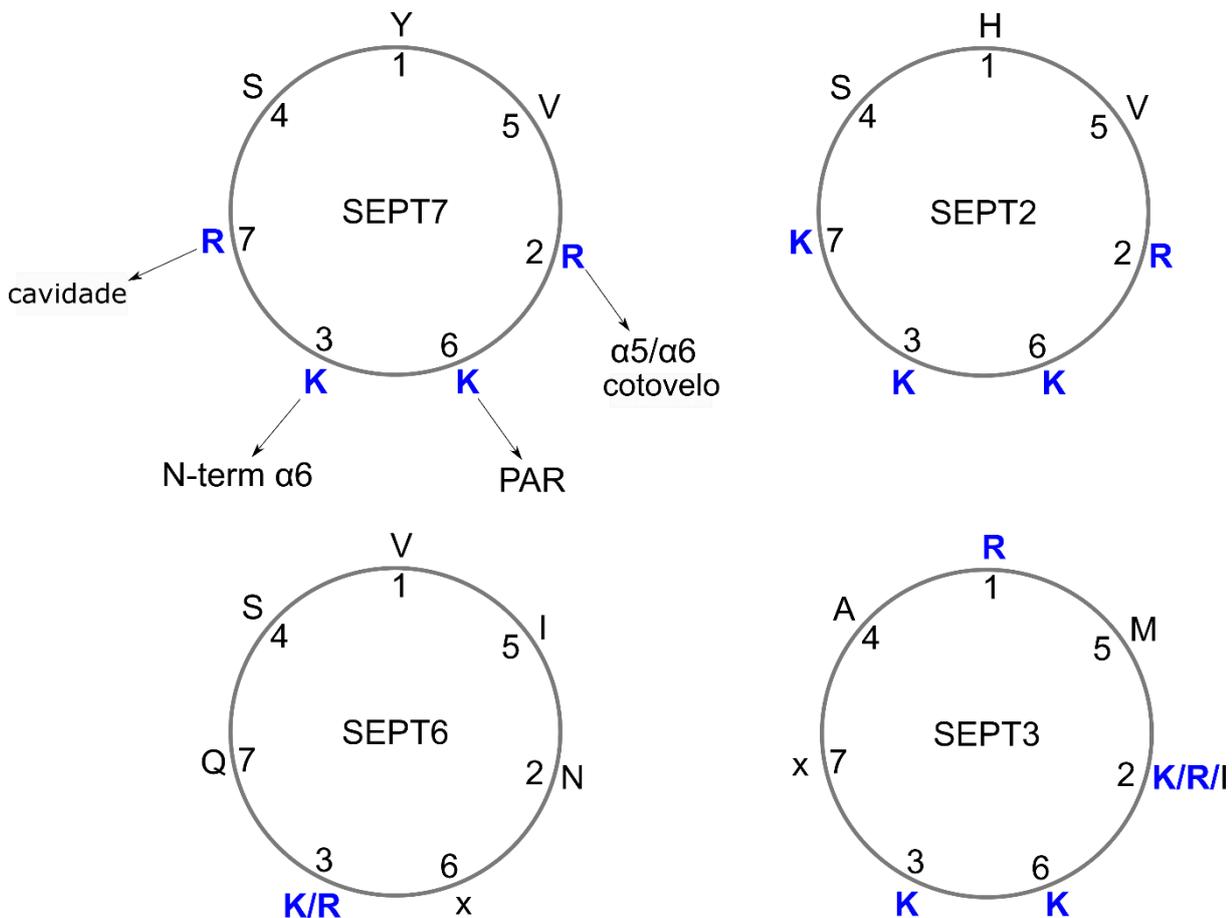


Figura 29 – Diagrama esquemático em forma de rodas helicoidais para as regiões que correspondem à hélice $\alpha 0$ dos quatro diferentes grupos. Os resíduos conservados de cada grupo estão representados e os resíduos básicos estão indicados em azul. Quando não há um resíduo consenso no grupo, a posição está marcada com um x. Na primeira roda, representando a hélice da SEPT7, as interações com regiões da SEPT6 estão indicadas. Espera-se que os aminoácidos básicos em posições equivalentes interagem de maneira similar.

Fonte: Adaptada de Mendonça *et al.*⁶⁰

Outro aspecto importante para ancorar a hélice $\alpha 0$ na interface em sua conformação aberta é a presença de uma fenilalanina (abreviada como Phe(HL)) na região N-terminal anterior à hélice $\alpha 0$, conhecida como *Hook-loop* (HL). Essa região é

conservada e desempenha um papel importante na estabilização da interface-NC.¹⁶⁻¹⁹

A Phe(HL) está localizada em um bolsão hidrofóbico da septina parceira (Figura 30), fazendo com que a hélice $\alpha 0$ fique ancorada nessa posição nas interfaces-NC. A ausência desse resíduo exclusivamente em septinas do grupo da SEPT3 também é consistente com a capacidade dessas septinas de expulsar a hélice em caso de mudança conformacional, uma vez que há um resíduo de isoleucina na mesma posição, que não preenche o espaço hidrofóbico da mesma forma.

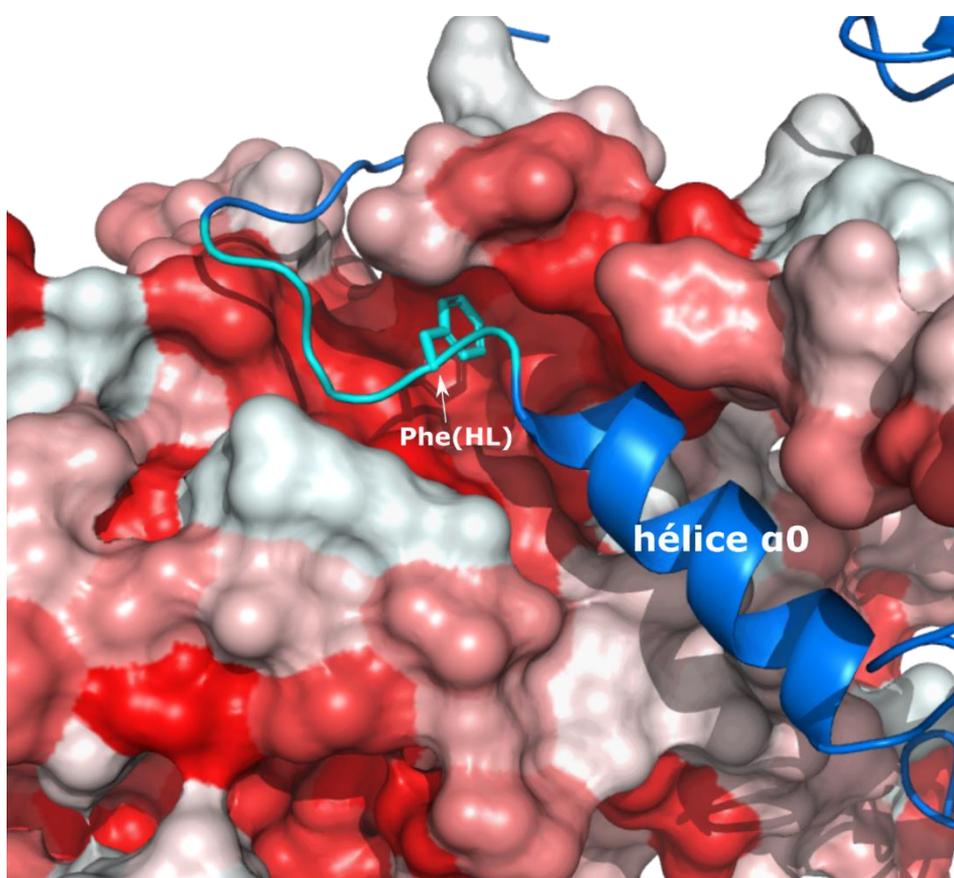


Figura 30 – Posicionamento da Phe(HL) em relação à septina parceira. A região *Hook-loop* da SEPT6 está representada em azul claro, destacando o resíduo Phe(HL). A SEPT7 foi colorida por hidrofobicidade, onde os resíduos mais hidrofóbicos estão em vermelho mais intenso. A posição da Phe(HL) no bolsão hidrofóbico ajuda a ancorar a hélice $\alpha 0$ dentro da interface.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Septinas de *Ciona intestinalis*

Os complexos de septinas de *Ciona intestinalis* também foram investigados neste trabalho com o objetivo de compará-los com as septinas de outros organismos.

Conforme mencionado anteriormente, esse organismo possui sequências codificantes para apenas quatro septinas, sendo cada uma delas representativa de um dos quatro grupos de septinas. O interesse nessas septinas se deve ao fato de cada uma das quatro septinas apresenta semelhanças com os quatro grupos de classificação das septinas humanas.

A similaridade das septinas desse organismo com os diferentes grupos sugere uma importância evolutiva, considerando que esse *C. intestinalis* é um urocordado invertebrado. Essa similaridade indica que a presença de uma septina representante de cada grupo pode ser uma característica essencial que remonta ao período anterior à separação entre vertebrados e invertebrados.³⁷ Essa conservação genética é notável, uma vez que o genoma desse organismo é significativamente menor do que o genoma humano. A presença dos genes codificantes para as quatro septinas parece constituir um conjunto mínimo necessário para sua funcionalidade, pois não ocorreu em *C. intestinalis* a expansão gênica observada em organismos superiores, que resultou no aumento do número de septinas.

Devido ao seu genoma simples e à sua posição filogenética, *C. intestinalis* é considerado um modelo experimental útil para estudos moleculares e evolutivos em geral. Além disso, esse organismo pode ser especialmente interessante para investigar a evolução das septinas durante o desenvolvimento dos cordados. Outro aspecto relevante no estudo das septinas desse organismo é a alta similaridade das sequências de aminoácidos entre *C. intestinalis* e humanos para as septinas 2,6 e 7. No entanto, a similaridade é menor para a SEPT9: CiSEPT2 possui 73% de identidade com SEPT2 humana, CiSEPT6 possui 71% de identidade com SEPT6 humana e, CiSEPT7 apresenta 71% de identidade com SEPT7 humana e CiSEPT9 apresenta 48% de identidade com a SEPT9 humana.⁶⁸

4.2.1 Ordem do hexâmero CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7

Inicialmente, o hexâmero de septinas de *C. intestinalis* foi preparado para verificar se a ordem do complexo era compatível com o complexo de septinas humanas. Para isso, o mesmo experimento foi realizado, no qual a SEPT2 foi fusionada à MBP para facilitar sua localização por meio da densidade adicional gerada. A Figura 31 apresenta alguns dados referentes à produção desse complexo, incluindo um cromatograma de exclusão molecular, que representa da etapa final de purificação

do hexâmero. Essa purificação foi realizada após duas cromatografias de afinidade (em resina de níquel e amilose).

O gel DSD-Page demonstra a pureza da amostra e exibe apenas as eluições correspondentes às purificações de afinidade, pois a concentração da amostra após a cromatografia de exclusão molecular estava muito baixa, inviabilizando sua visualização no gel. Assim como no experimento realizado para o complexo humano, não é possível distinguir a SEPT6 da SEPT7, pois ambas possuem o mesmo peso molecular nesse experimento. No entanto, experimentos anteriores realizados durante o projeto de doutorado da Dra. Sinara T. do B. Morais demonstraram a interação entre essas septinas e confirmaram a formação dos complexos.⁶⁸ É importante ressaltar que, ao contrário da SEPT7 humana, não foi observada a degradação da SEPT7 de *Ciona intestinalis*.

Observa-se a presença de dois picos distintos no cromatograma. Porém, devido à impossibilidade de determinar visualmente em qual dos picos o complexo estava presente utilizando SDS-Page, foram preparadas grades de contrastação negativa com frações de ambos os picos. Após análise, foi confirmado que apenas o segundo pico continha o complexo hexamérico de *C. intestinalis*, enquanto na grade do primeiro pico foram observados apenas alguns agregados.

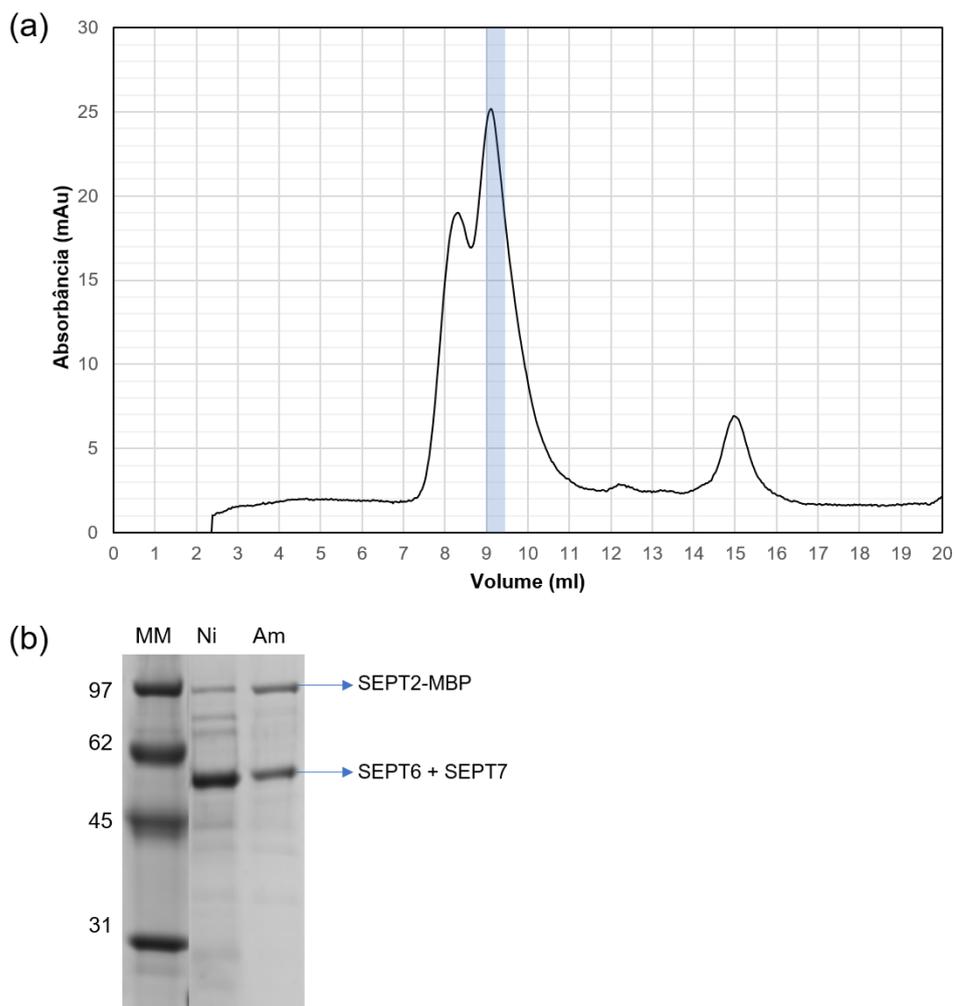


Figura 31 – Purificação do complexo hexamérico CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 increase. A barra azul evidencia a fração coletada da eluição e utilizada no preparo de grades para TEM. (B) Análise por gel SDS-PAGE das frações eluídas, incluindo à esquerda o padrão de massas moleculares (em kDa). A presença das bandas correspondentes às três septinas estão identificadas, onde SEPT6 e SEPT7 possuem massas moleculares similares e não podem ser distinguidas. A fração “Ni” corresponde à eluição da cromatografia de afinidade em resina de níquel, enquanto “Am”, à eluição da resina de amilose.

Fonte: Elaborada pela autora

Seguindo o mesmo procedimento utilizado para o complexo hexamérico humano, os dados foram coletados por microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 32 apresenta algumas classes representativas obtidas a partir do processamento dos dados utilizando a análise de partículas isoladas e a mesma metodologia utilizada para o complexo humano, com o programa IMAGIC-V. Essas classes mostram o complexo formado por seis esferas em sequência, com um diâmetro aproximado de 4 nm e um comprimento total de cerca de 25 nm.

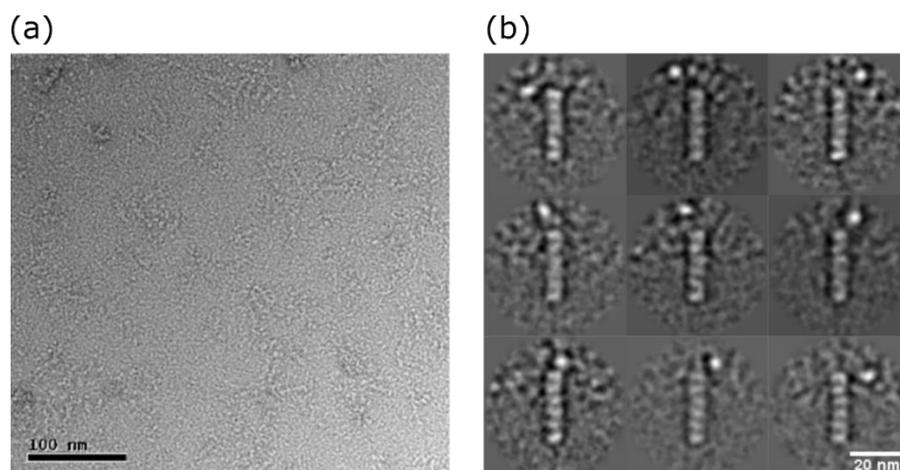


Figura 32 – TEM por contrastação negativa do complexo hexamérico CiSEPT2_MBP-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (A) Micrografia representativa da coleta de dados utilizada para análise de partículas isoladas evidenciando a presença das partículas de hexâmeros de septinas em formato alongado. Barra de escala de 100 nm. (B) Classes representativas obtidas através do processamento de dados que mostram uma densidade extra correspondente à proteína de fusão MBP localizada em diversas posições ao redor da extremidade do complexo

Fonte: Elaborada pela autora

A análise das imagens revelou que a densidade adicional correspondente à MBP está localizada ao redor da extremidade do complexo hexamérico, exibindo um comportamento semelhante ao observado anteriormente para o complexo humano. Esses resultados indicam que a SEPT2 de *C. intestinalis*, assim como as septinas humanas pertencentes ao grupo da SEPT2, se posicionam na extremidade do complexo, sugerindo que a ordem das septinas ao longo do hexâmero segue o mesmo padrão.

4.2.2 Heterogeneidade na produção de octâmeros CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9

Com o objetivo de obter uma estrutura em alta resolução do complexo octamérico de *C. intestinalis*, que inclui as septinas SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, foi empregada a estratégia de duas caudas na produção do complexo. Nessa abordagem, a SEPT2 possui uma cauda de histidina, enquanto a SEPT9 possui a cauda *strep*. A SEPT7 contém também a proteína 6xHis-SUMO fusionada.

Para garantir que apenas a histidina da SEPT2 interaja na primeira etapa de purificação por afinidade, a enzima SUMO protease é normalmente utilizada antes da purificação, durante a etapa de lise celular, para remover a proteína fusionada à

SEPT7. Dessa forma, espera-se obter apenas octâmeros na solução final após as duas purificações por afinidade.

No entanto, devido à indisponibilidade da protease necessária para a remoção da SUMO, essa etapa não foi realizada na produção da amostra em questão. Portanto, é possível que outros complexos além dos octâmeros estejam presentes na solução final.

Os resultados da purificação do complexo são apresentados na Figura 33, na qual os géis SDS-PAGE (itens B e C) mostram que não é possível distinguir entre SEPT2 e SEPT6, pois possuem massas moleculares semelhantes. A presença das quatro septinas foi confirmada por espectrometria de massas.

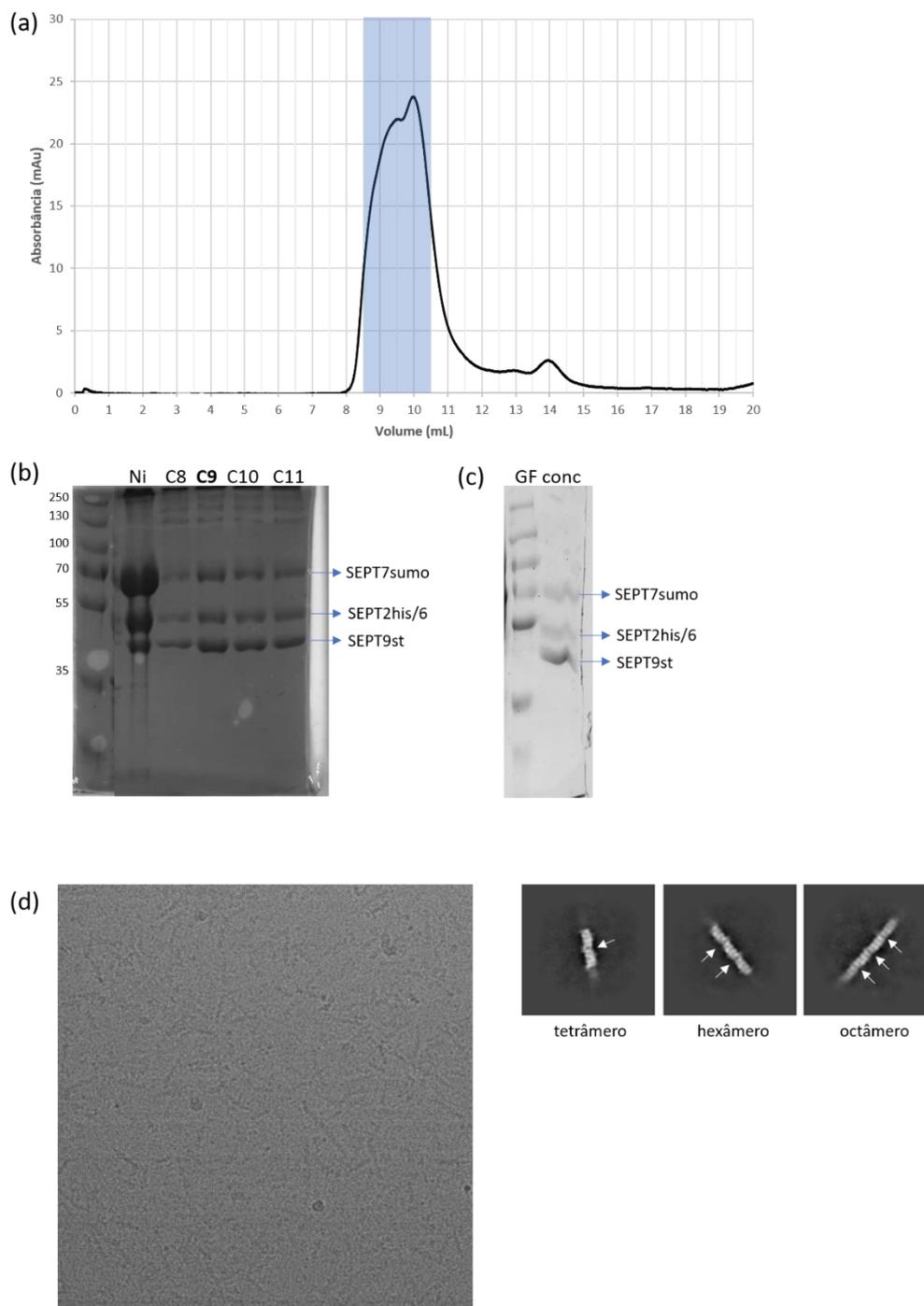


Figura 33— Produção do complexo octamérico CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 e sua heterogeneidade (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300. A barra azul evidencia a fração coletada da eluição e utilizada no preparo de grades para Crio-ME. (B) Análise por gel SDS-PAGE da amostra eluída das duas purificações por afinidade, incluindo à esquerda o padrão de massas moleculares (em kDa). A presença das bandas correspondentes às quatro septinas estão identificadas, onde SEPT2 e SEPT6 possuem massas moleculares similares e não podem ser distinguidas. A fração Ni corresponde à amostra eluída da coluna HisTrap e as frações seguintes correspondem à eluições da coluna StrepTrap. (C) Gel SDS-PAGE da amostra eluída da exclusão molecular que foi posteriormente concentrada para o preparo de grades por vitrificação. (D) Micrografia representativa da coleta por Crio-ME e três classes representativas da análise de partículas isoladas, evidenciando a presença de três estados oligoméricos diferentes: tetrâmero, hexâmero e octâmero.

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras foram preparadas para Crio-ME e foram coletados 7621 *movies*. O processamento das imagens por análise de partículas isoladas revelou uma alta heterogeneidade na amostra. Devido à não remoção da SUMO durante a purificação, tetrâmeros (compostos por SEPT7 e SEPT9) estão presentes na amostra final, como pode ser observado no item D da Figura 33.

Adicionalmente, foi observada a presença de hexâmeros na amostra, o que não estava previsto de acordo com a estratégia de purificação adotada. Como a última etapa de purificação por afinidade é baseada na interação da cauda *strep* presente na SEPT9, o hexâmero SEPT2-SEPT6-SEPT7 não deveria estar presente na amostra final. Uma possível explicação para a presença de hexâmeros na amostra é que o octâmero não é estável em solução, resultando na dissociação da SEPT9 do complexo devido a uma interação mais fraca com SEPT7, como observado anteriormente para as septinas do mesmo grupo em humanos.³²⁻⁴⁰⁻⁴² Na literatura e com base na experiência do próprio grupo de pesquisa da autora, a produção de octâmeros humanos também contém uma mistura de outros oligômeros.⁶⁹

Após o processamento dos dados obtidos por Crio-ME, foram obtidos três mapas tridimensionais distintos para os três estados oligoméricos presentes: octâmero, hexâmero e tetrâmero (Figura 34). Observa-se que o mapa do octâmero, representado em azul na figura, possui a menor resolução (estimada em 10Å). Isso se deve à flexibilidade intrínseca do complexo e à baixa quantidade de octâmeros na amostra, visto que apenas 16 mil partículas foram encontradas para a construção desse mapa. No caso do tetrâmero, apesar de possuir o mais partículas (aproximadamente 120 mil), também não foi possível obter alta resolução (estimada em 7 Å). Outros fatores podem ter limitado a obtenção de mapas de alta resolução, como o tamanho pequeno do complexo tetramérico, que pode ter resultado em baixo contraste, ou a ausência de diferentes orientações no conjunto de partículas.

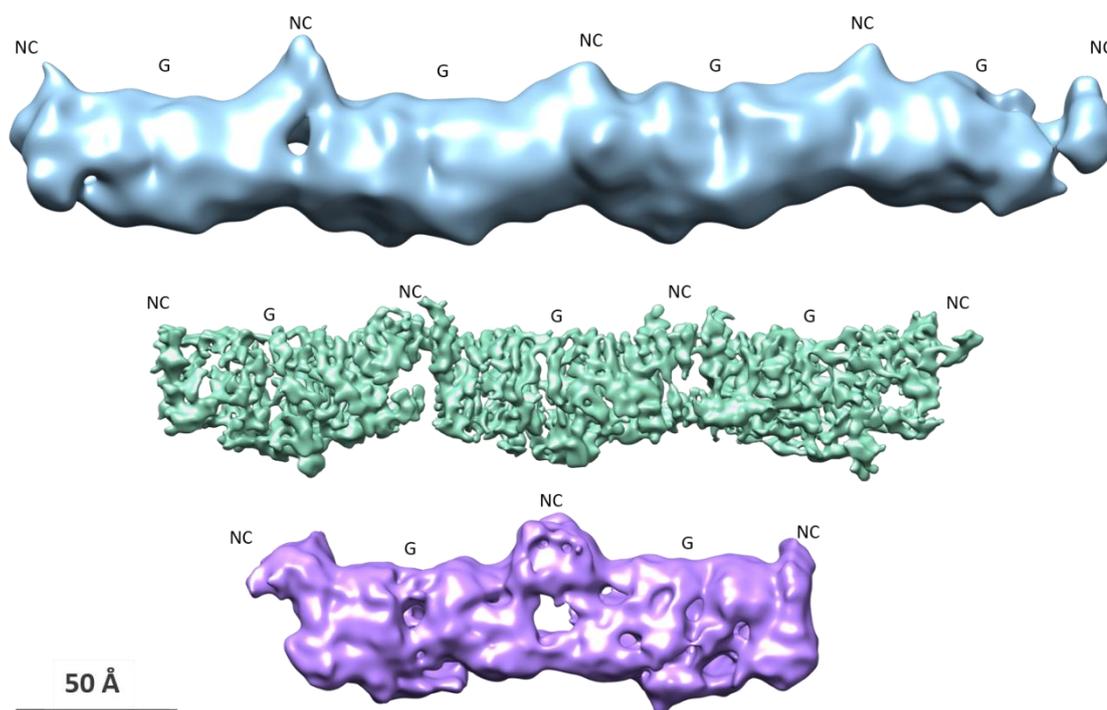


Figura 34 – Mapas tridimensionais obtidos por Crio-ME. A heterogeneidade da amostra possibilitou a visualização dos três estados oligoméricos presentes: octâmero (em azul), hexâmero (em verde) e tetrâmero (em lilás). Apesar da resolução limitada, as interfaces G e NC podem ser facilmente reconhecidas.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.3 Ordem do tetrâmero CiSEPT7-SEPT9

Durante o processamento das imagens por análise de partículas isoladas, vários ciclos de seleção e extração de partículas, bem como classificação bidimensional e tridimensional foram realizados para otimizar a qualidade das partículas finais. Em um dos mapas tridimensionais obtidos em um desses ciclos de processamento, foi possível identificar a presença da proteína SUMO que estava fusionada à SEPT7 (Figura 35). A densidade extra correspondente à SUMO foi observada em uma das extremidades do complexo tetramérico. Além disso, com a visualização das interfaces G e NC, foi possível confirmar a ordem das subunidades no tetrâmero, onde a SEPT7 está posicionada na extremidade do complexo, formando a seguinte sequência: SEPT7-SEPT9-SEPT9-SEPT7 (Figura 35).

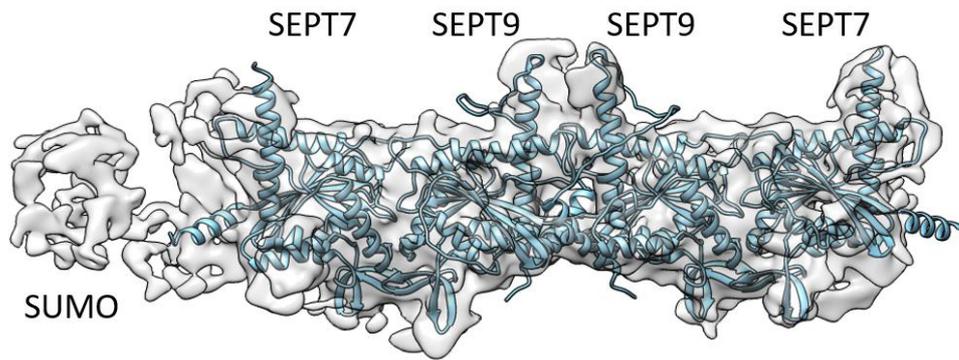


Figura 35 – Mapa tridimensional obtido por Crio-ME destacando a densidade extra que corresponde à proteína SUMO fusionada à SEPT7, confirmando a ordem esperada para o tetrâmero SEPT7-SEPT9-SEPT9-SEPT7 de *Ciona intestinalis*.

Fonte: Elaborada pela autora

A ordem confirmada do tetrâmero, unida à informação sobre a ordem do hexâmero de *Ciona intestinalis*, está de acordo com a configuração esperada para um octâmero desse organismo, onde o tetrâmero é o núcleo central do complexo. Além disso, este estudo conclui que as septinas de *C. intestinalis* são análogas às septinas humanas e de leveduras. Tanto os hexâmeros quanto os octâmeros apresentam uma interface NC em altas concentrações salinas e posicionam as septinas do mesmo grupo de maneira semelhante na estrutura dos complexos. Em resumo, a Figura 36 ilustra todos os resultados obtidos em relação à ordem dos complexos de septinas de *C. intestinalis* e de septinas humanas obtidas neste trabalho.

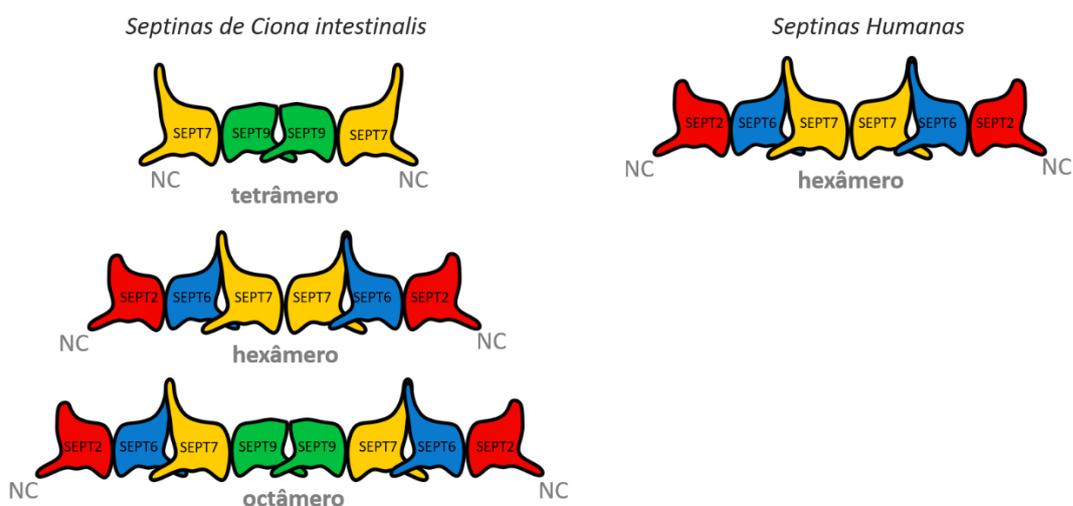


Figura 36 – Esquema representativo da ordem dos complexos de septinas de *C. intestinalis* e septinas humanas obtidos por contrastação negativa e Crio-ME neste trabalho. Todos os complexos expõem uma interface-NC na extremidade quando produzidos em alta concentração salina.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.4 Modelo estrutural do hexâmero CiSEPT2-SEPT6_SEPT7

No experimento anterior, o mapa do complexo hexamérico mostrou-se mais promissor em termos de obter informações de alta resolução. Mesmo em uma amostra mais heterogênea, contendo aproximadamente 95 mil partículas, o mapa obtido apresentou uma resolução de 4.1 Å. Foram realizadas algumas tentativas de produzir exclusivamente o hexâmero. No entanto, devido ao baixo rendimento da purificação, não foi possível prosseguir com o experimento utilizando a técnica de Crio-ME (dados não mostrados).

A estratégia adotada foi a produção de uma nova amostra de octâmeros (Figura 37), que conseqüentemente geraria hexâmeros, com a aplicação da SUMO protease, a fim de evitar a acumulação excessiva de tetrâmeros (SEPT7-SEPT9). Ao remover a proteína SUMO, apenas a cauda de histidina da SEPT2 interage com a resina de níquel na primeira etapa de purificação por afinidade. A expectativa era que somente hexâmeros e octâmeros estivessem presentes na amostra final.

No cromatograma da exclusão molecular (Figura 37A), é possível notar uma alteração no perfil de eluição em relação ao anterior (Figura 33A), em que o primeiro pico elui mais cedo e apresenta uma maior absorvância, indicando uma maior quantidade de complexos maiores. Após a coleta e o processamento dos dados, pode-se observar nas classes representativas mostradas no item C que ainda há a presença de tetrâmeros. Entretanto, a quantidade foi significativamente reduzida, enquanto houve um aumento na quantidade de hexâmeros, permitindo a obtenção de um mapa tridimensional de alta resolução.

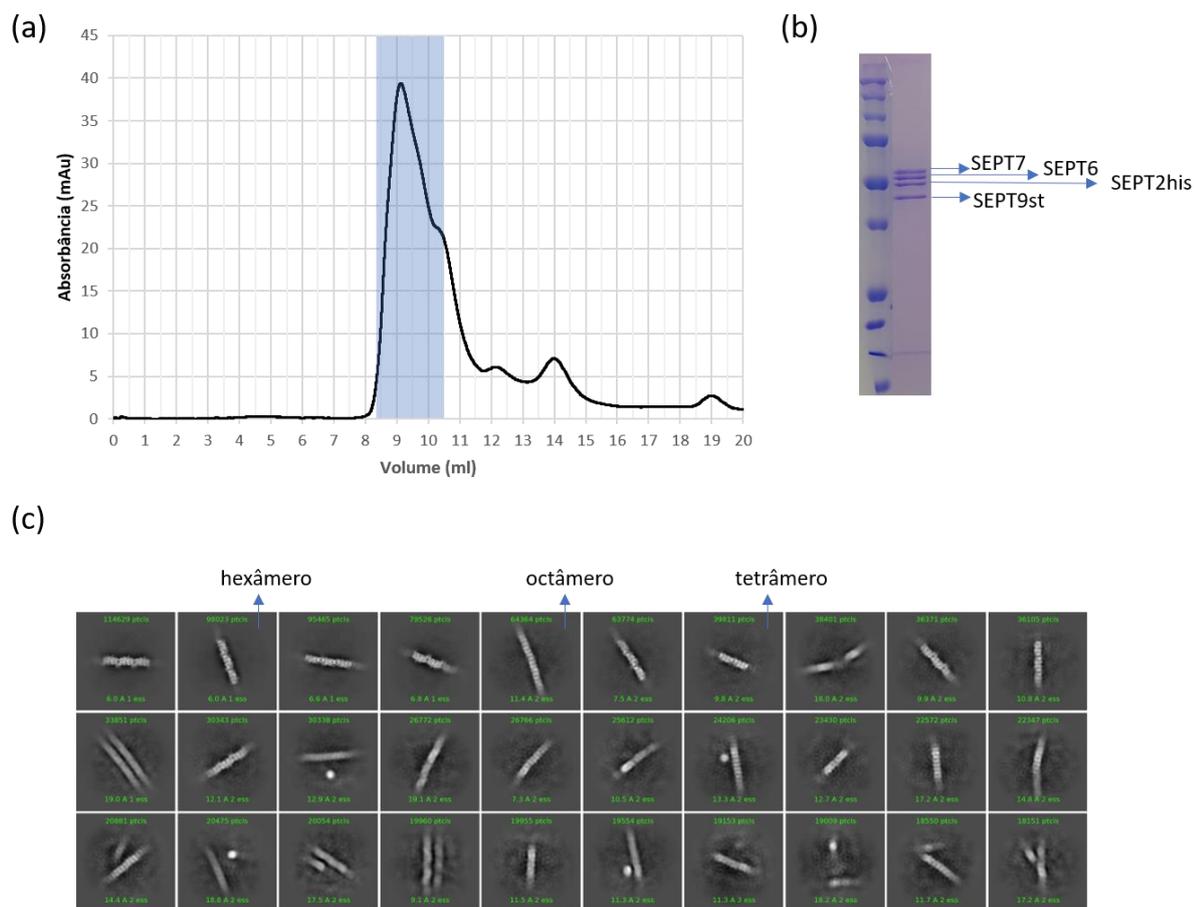


Figura 37 – Produção do complexo octamérico CiSEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 com SUMO protease (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300. A barra azul evidencia a fração coletada da eluição e utilizada no preparo de grades para Crio-ME. (B) Análise por gel SDS-PAGE da amostra eluída da exclusão molecular, incluindo à esquerda o padrão de massas moleculares (em kDa). A presença das bandas correspondentes às quatro septinas estão identificadas. (C) Classes representativas da análise de partículas isoladas, evidenciando ainda uma certa heterogeneidade com a presença de três estados oligoméricos diferentes: tetrâmero, hexâmero e octâmero.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os hexâmeros resultantes da dissociação dos octâmeros na amostra foram selecionados através do processamento dos dados coletados. O resultado dessa nova preparação foi a obtenção de um mapa do complexo hexamérico de *Ciona intestinalis* SEPT2-SEPT6-SEPT7 com uma resolução de 3.26 Å (Figura 38). Este mapa apresenta uma qualidade e resolução superiores em comparação ao mapa previamente obtido para o hexâmero humano.

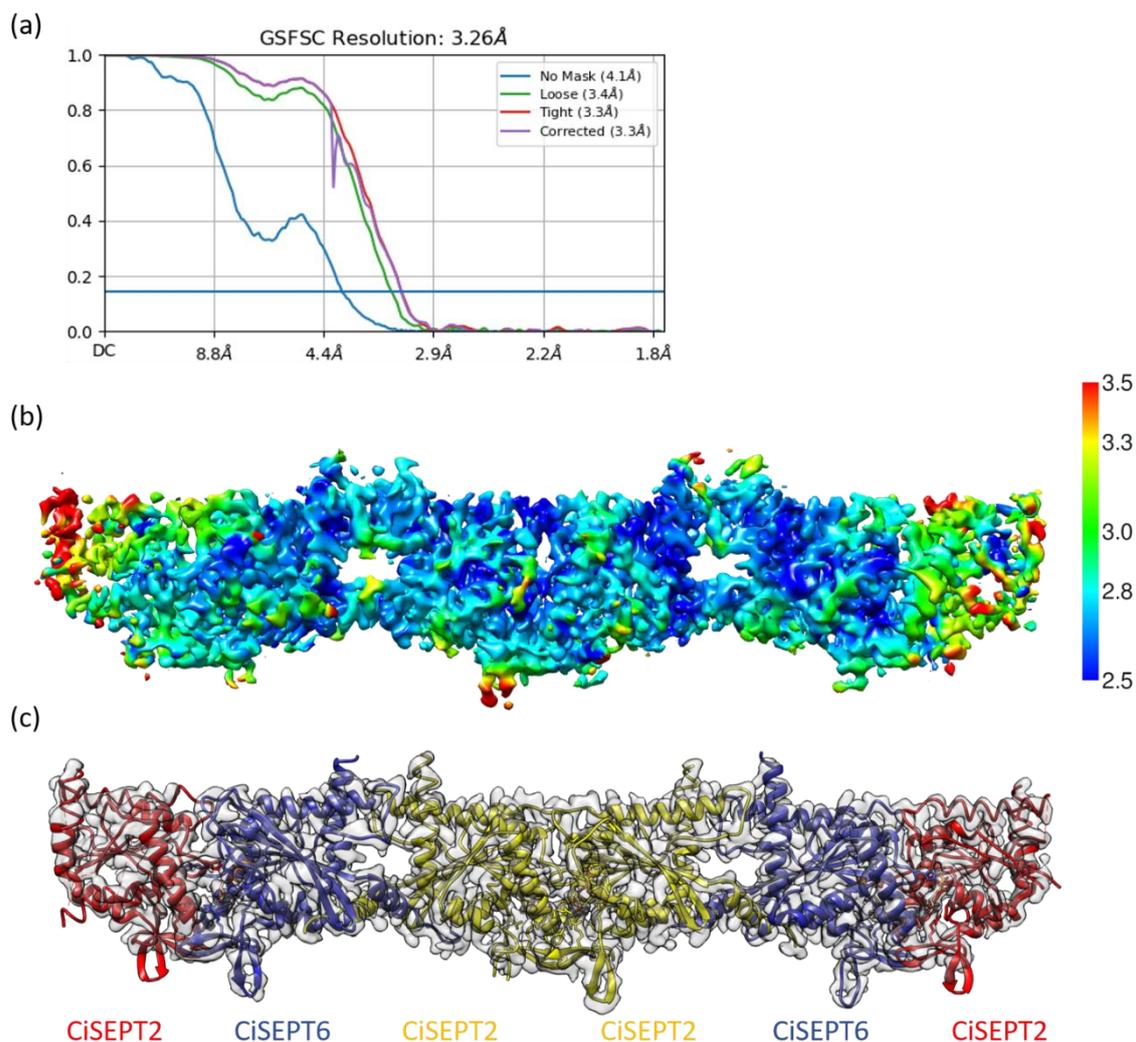


Figura 38 – Análise de resolução local e modelo estrutural obtido com o mapa do hexâmero CiSEPT2-SEPT6-SEPT7. (A) Fourier Shell Correlation (FSC) do mapa obtido, para análise de resolução global, indicando uma resolução de 3.3 Å. (B) Resolução local representada na escala de cores apresentada à direita da figura. O azul representa uma resolução mais alta enquanto que o vermelho representa uma menor resolução. (C) Modelo estrutural (em vermelho) obtido após encaixe das estruturas obtidas por AlphaFold no mapa (em cinza), correspondentes a cada septina do complexo, e refinamento.

Fonte: Elaborada pela autora

O modelo estrutural foi construído a partir de modelos estruturais preditos utilizando o AlphaFold.⁷⁰ A análise dos parâmetros estruturais, como tamanho e ângulo de ligações, ângulos de torções da cadeia principal e choques estéricos, demonstraram que esses valores estão dentro dos intervalos esperados. Além disso, o modelo apresenta um Molprobit score de 2.13, indicando uma boa qualidade estrutural, e um EMRinger score de 2.46, o que sugere uma alta qualidade do mapa.

Tabela 3 – Estatísticas e informações sobre a coleta de dados de Crio-ME do complexo hexamérico de *Ciona intestinalis* SEPT6-SEPT7-SEPT9, refinamento do modelo e validação.

Coleta de dados e processamento	
Microscópio	FEI Titan Krios
Magnificação	81,000x
Voltagem (kV)	300
Dose total (e ⁻ /Å ²)	28.82
Variação de defoco (µm)	-1.5 e -2.0
Modo de coleta de dados	Counting Mode
Tamanho de pixel (Å)	0.862
Simetria imposta	C1
Número final de partículas	304,274
Resolução global (Å) – 0.143 threshold	3.26Å
Resolução local (Å) – 0.143 threshold	3.0 – 5.0
Refinamento	
Modelos iniciais (PDB code)	Alphafold
Map CC (máscara)	0.75
Composição do modelo	
Cadeias	12
Nº de Átomos	12715
Nº de Resíduos	1563
Ligações (RMSD)	
Comprimento (Å) (# > 4σ)	0.004(0)
Ângulos (°) (# > 4σ)	0.979(13)
Validação	
EMRinger Score	2.46
MolProbity Score	2.19
Clash score	18.55
Ramachandran plot (%)	
Não aceitos	0.46
Aceitos	5.89
Favorecidos	93.65
Rotâmeros outliers (%)	1.00
Cβ outliers (%)	0.00
Plano do peptídeo (%)	
Cis prolina/geral	10.5/0.0
Twisted proline/general	0.0/0.0
CaBLAM outliers (%)	3.48
ADP (B-factors)	
Iso/Aniso (#)	12715/0
Proteína (Min/max/mean)	17.09/160.66/77.54
Ocupância	
Mean	1.00
occ = 1 (%)	100.00
0 < occ < 1 (%)	0.00
occ > 1 (%)	0.00

Fonte: Elaborada pela autora

Embora os parâmetros de validação tenham apresentado valores semelhantes ao mapa de potencial obtido para o complexo humano, uma diferença observada foi

a maior continuidade das informações de densidade no mapa tridimensional obtido para *Ciona intestinalis*. Isso significa que as regiões do mapa estão mais conectadas e coerentes, proporcionando uma representação mais clara e precisa da estrutura do complexo hexamérico.

4.2.5 Comparação com modelo do hexâmero humano

Ao analisar as estruturas dos complexos hexaméricos SEPT2-SEPT6-SEPT7 dos dois organismos, não se espera encontrar diferenças significativas, visto que as três septinas apresentam uma alta similaridade de sequência. Entretanto, é essencial verificar se as interações moleculares necessárias para manter as interfaces -G e -NC foram conservadas ao longo da evolução.

A fim de obter uma visualização global da flexibilidade do complexo, realizou-se a mesma análise de variabilidade tridimensional que foi aplicada ao complexo humano para as septinas de *C. intestinalis*. Entretanto, nenhum dos resultados revelou o mesmo tipo de movimento *side-to-side bending*, o que não implica necessariamente que o complexo não possui a mesma flexibilidade. Uma possível explicação para a não detecção desse movimento é que a maioria das partículas utilizadas no modelo final apresentavam conformações semelhantes.

Entretanto, ao comparar as estruturas dos dois organismos, observa-se uma curvatura que afasta suas extremidades, conforme ilustrado na Figura 39. Para melhor visualizar esse efeito, foi realizada uma sobreposição de um dos trímeros de cada modelo (correspondente à metade esquerda dos complexos na figura), de modo que a máxima extensão dessa diferença fosse evidenciada na outra extremidade (lado direito da figura). Como resultado, a medida da distância entre as duas pontas não alinhadas resultou em um valor de 9 Å.



Figura 39 – Análise de flexibilidade do complexo CiSEPT2G-SEPT6-SEPT7 em comparação com hexâmero humano. Os dois modelos foram sobrepostos utilizando-se apenas um trîmero. O complexo humano está colorido em azul, enquanto o complexo de *C. intestinalis* está colorido em laranja. A extensão do dobramento revela uma distância de 9 Å na extremidade não sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A observação dessa curvatura não apenas confirmou a flexibilidade do complexo hexamérico de *C. intestinalis*, mas também evidenciou a presença do mesmo tipo de curvatura *side-to-side* descrito anteriormente para o complexo humano. Conforme discutido previamente para o caso humano, essa curvatura pode estar relacionada à maneira com que as septinas interagem com membranas, onde os *coiled-coils* se alinham em sua superfície.

A obtenção de um modelo estrutural das septinas desse organismo também foi importante para confirmar algumas observações na interface-NC do complexo de septinas humanas. Conforme mencionado anteriormente, existem evidências de uma comunicação entre interfaces adjacentes em septinas humanas, especificamente no grupo da SEPT9, em que o tipo de nucleotídeo ligado à interface-G pode influenciar a abertura/fechamento da interface-NC vizinha. A possível comunicação entre as subunidades do complexo sugere que desmontar o hexâmero em seus componentes individuais (como tem sido feito por meio de cristalografia até o momento) pode não ser suficiente para compreender a estrutura como um todo. Portanto é necessário estudar o complexo completo para obter informações mais abrangentes.

A fim de investigar possíveis diferenças nas interfaces entre subunidades ao longo da partícula, foram realizadas as seguintes sobreposições:

- 1) Dos dímeros SEPT2-SEPT6 humano (6UPA), SEPT2-SEPT11 humano (6UPQ) e SEPT2-SEPT8 humano (6UPR) com as duas cópias do dímero CiSEPT2-CiSEPT6 extraído do hexâmero. Para tal, a subunidade da SEPT2 foi usada para a sobreposição em todos os casos e eventuais diferenças no posicionamento da outra subunidade observada. Respeitando a resolução limitada da estrutura do hexâmero

de Ciona, as observações foram basicamente limitadas a eventuais deslocamentos de elementos de estrutura secundária.

2) O dímero central de SEPT7-SEPT7 (6N0B) com o dímero central de CiSEPT7-CiSEPT7 extraído do hexâmero de Ciona.

No primeiro caso, não foram observadas diferenças significativas no posicionamento global das subunidades ao comparar as estruturas de *Ciona intestinalis* e humana. Além disso, não foram identificadas diferenças significativas em termos de deslocamentos de estruturas secundárias. Na literatura, já foi sugerido que a comunicação entre interfaces observada no caso da SEPT9 humana poderia envolver a hélice- $\alpha 2$. Por esse motivo, foram realizadas investigações na região correspondente, porém não foram observadas diferenças significativas.

No segundo caso, visando examinar o dímero central do hexâmero, ao sobrepor uma das duas subunidades, foi observado um deslocamento localizado da hélice $\alpha 2$ da subunidade vizinha, que aparentemente também induz um deslocamento da $\alpha 6$ (Figura 40). Essa observação sugere que a hélice $\alpha 2$ possui um maior grau de variação conformacional em comparação com outros elementos de estrutura secundária, o que está de acordo com a hipótese de seu possível papel na transmissão de informações entre as interfaces. Apesar da observação não ser uma comprovação da hipótese, é coerente com ela.

No entanto, é importante ressaltar que a comparação entre estruturas diferentes e de organismos diferentes pode revelar eventuais alterações que podem ser simplesmente consequências das diferenças nas sequências. Sabe-se que a orientação relativa de elementos de estrutura secundária pode variar entre proteínas homólogas. Apesar disso, o fato de esse deslocamento ser específico para as hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$, enquanto outras regiões das septinas se sobrepõem bem, sugere que esse não é um mero deslocamento de corpo rígido causado pela movimentação que a interface central pode provocar no complexo.

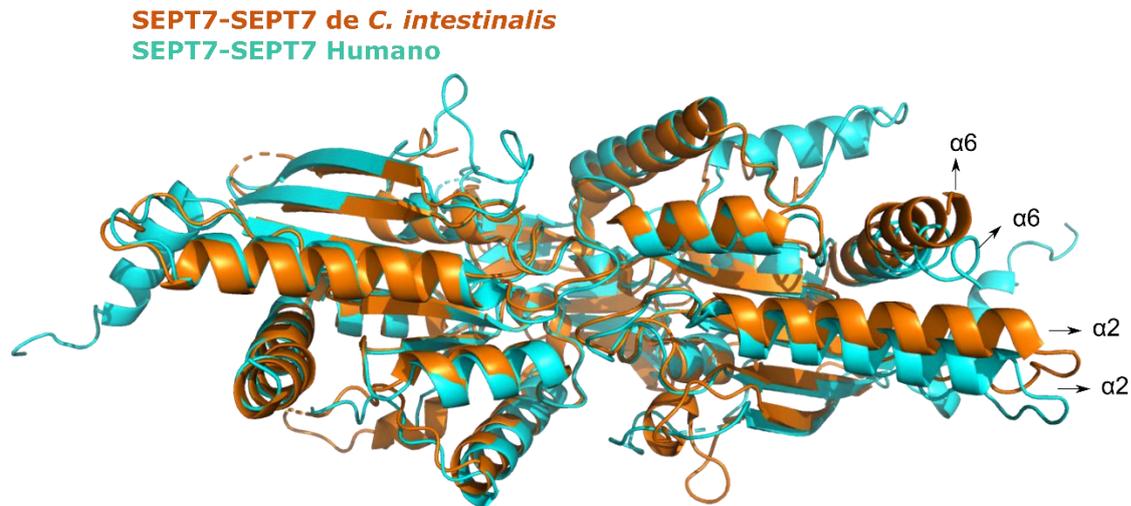


Figura 40 – Comparação entre os dímeros de SEPT7-SEPT7 humano e de *Ciona intestinalis*. A sobreposição de um dos monômeros destaca um deslocamento de algumas estruturas secundárias do monômero vizinho. A diferença observada entre as hélices $\alpha 2$ de cada organismo pode estar relacionada com a liberdade conformacional que a mesma possui, indicando seu provável papel no mecanismo de comunicação entre interfaces G e NC dependente do nucleotídeo ligado.

Fonte: Elaborada pela autora

Ao comparar a região inferior da interface-NC entre CiSEPT6-SEPT7, mais especificamente a hélice $\alpha 0$, nota-se pouca diferença em relação à interface humana. A análise da hélice $\alpha 0$ da CiSEPT7 revelou que as cadeias laterais dos resíduos básicos característicos dessa região apresentam uma dinâmica de interações equivalente ao que foi descrito para as septinas humanas (Figura 41). A única diferença é a e uma arginina (R47) presente na SEPT7 humana por uma glutamina (Q35) na SEPT7 de *Ciona intestinalis*, que aponta em direção à interface-NC. No entanto, a falta de um parceiro molecular de interação específico para ambos os resíduos faz com que essa substituição não tenha consequências estruturalmente significativas. Isso levanta questionamentos sobre a importância desse aminoácido na estabilização da hélice $\alpha 0$ na interface-NC. Além disso, a conservação sequencial e estrutural dos outros resíduos básicos confirma as análises de interação feitas anteriormente para as septinas humanas.

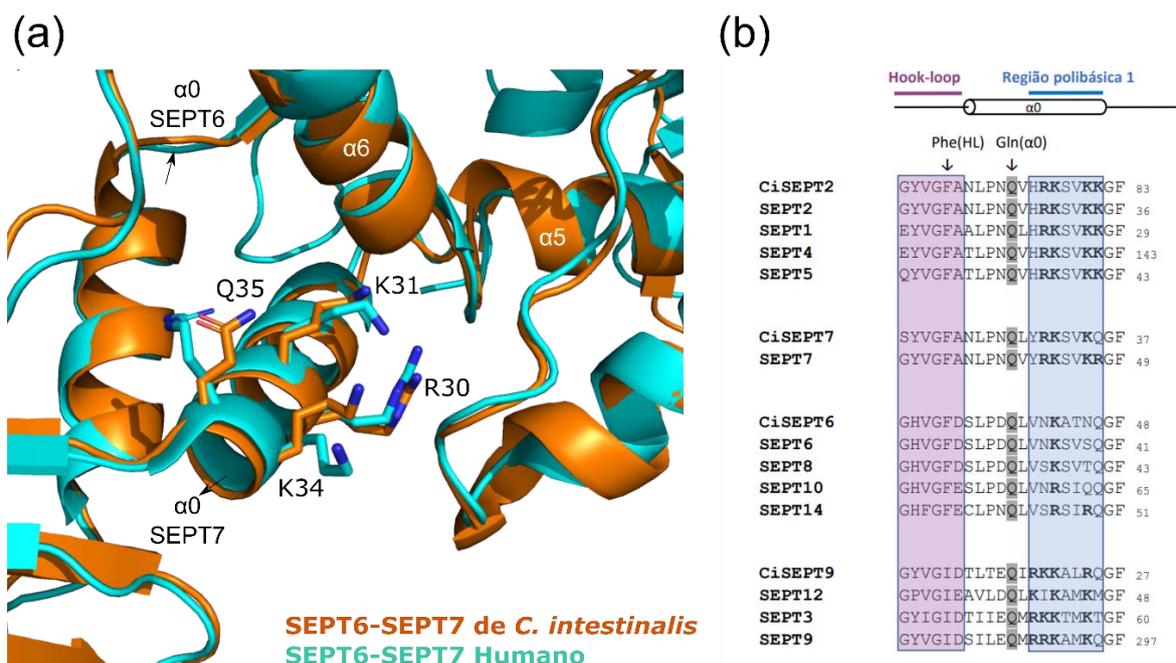


Figura 41 – Comparação da hélice $\alpha 0$ de ambos organismos. (A) Região inferior da interface-NC, evidenciando a hélice $\alpha 0$ da CiSEPT7 (em laranja) e as cadeias laterais dos resíduos básicos presentes, em relação aos resíduos correspondentes de SEPT7 humana. (B) Comparação sequencial da região Hook-loop (destacado em violeta) e hélice $\alpha 0$ (que inclui a região PB1, em azul) entre os diferentes grupos de septinas, incluindo as septinas de *C. intestinalis*, destacando os resíduos básicos da região PB1 em negrito.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da análise mencionada, destaca-se no alinhamento apresentado no item B da Figura 41 a presença de uma glutamina conservada (denominada Gln($\alpha 0$)) em todas as septinas humanas e de *C. intestinalis*. Ao examinar mais detalhadamente esse resíduo na CiSEPT7 (Gln27), pode-se notar que ele também interage com a cadeia principal de alguns resíduos do cotovelo formado entre as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ da subunidade vizinha (Figura 42A). O cotovelo entre $\alpha 5$ e $\alpha 6$ é uma região conservada em todas as estruturas de septinas conhecidas, com a exceção de cdc11 de levedura. Essa região faz parte do elemento único de septinas (SUE). A exposição da cadeia principal entre $\alpha 5$ e $\alpha 6$ por conta do cotovelo parece ser fundamental para a integridade da interface NC, devido à sua interação específica com a Gln($\alpha 0$). Essa interação também explicaria a conservação da sua estrutura.

Conforme mencionado previamente, a SEPT6 humana apresenta apenas um dos resíduos básicos relevantes para as interações da hélice $\alpha 0$, o que também é observado na CiSEPT6. A Figura 42B mostra que a glutamina correspondente (Gln38) é conservada também em termos estruturais, indicando que ela pode desempenhar

um papel tão importante quanto os resíduos básicos da hélice α_0 para a estabilização da interface.

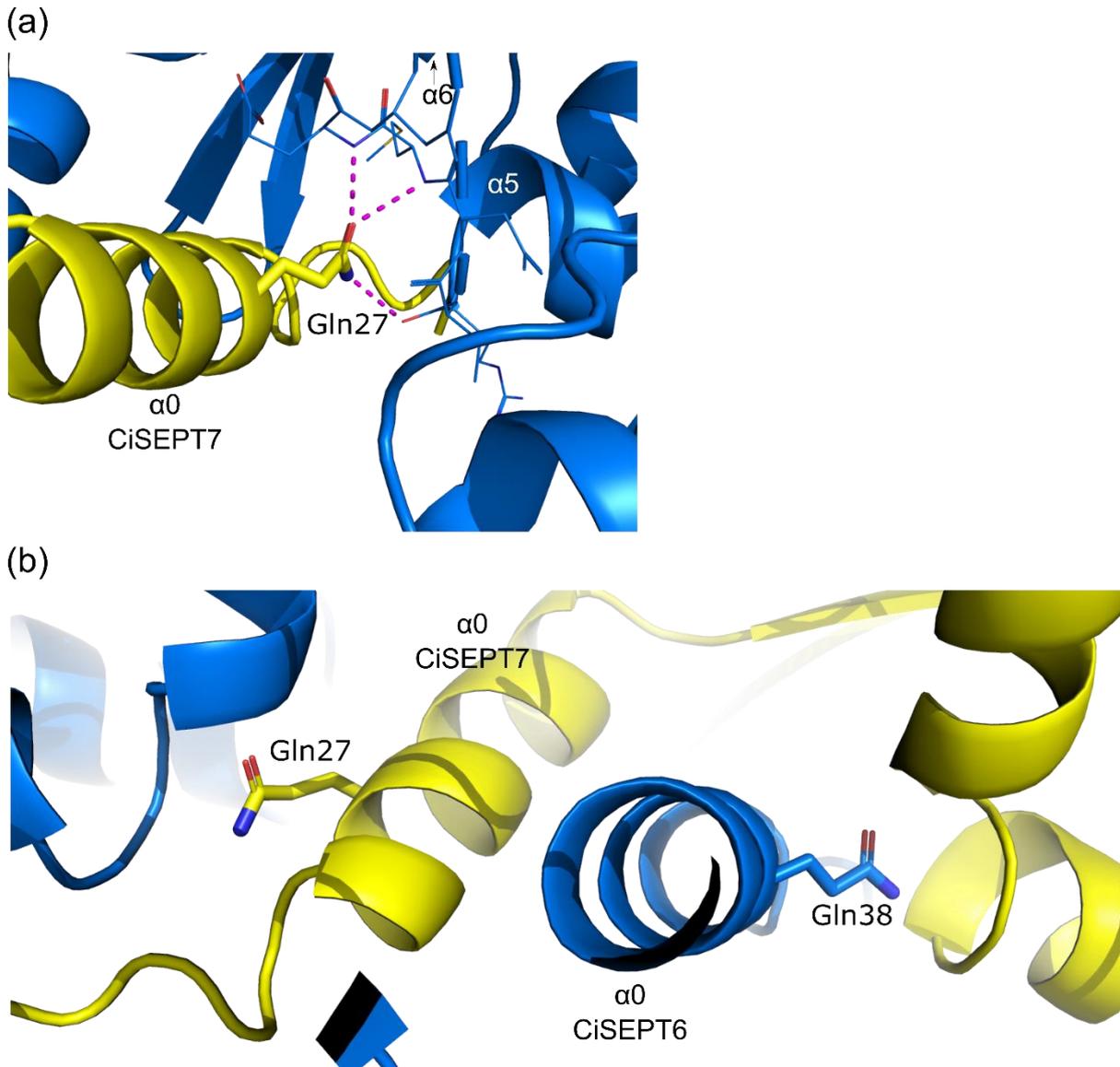


Figura 42 – Análise da Gln(α_0) na SEPT6 e SEPT7 de *C. intestinalis*. (A) Hélice α_0 da CiSEPT7 (em amarelo) destacando a cadeia lateral da glutamina conservada em todas as septinas, fazendo interações (em magenta) com o cotovelo formado entre as hélices α_5 e α_6 da CiSEPT6 (em azul) (B) Gln(α_0) destacada nas hélices α_0 de CiSEPT6 (em azul) e CiSEPT7 (em amarelo) evidenciando sua conservação estrutural em relação ao cotovelo da subunidade parceira de interação na interface-NC.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de ser totalmente conservada entre as septinas humanas e de *C. intestinalis*, a Gln(α_0) não está presente em duas septinas de levedura (Cdc11 e Shs1) que ocupam a posição terminal do complexo octamérico (assim como SEPT2). Uma observação interessante é que a estrutura da septina Cdc11 (PDB:5AR1), a única

estrutura de levedura publicada até o momento, não apresenta o cotovelo observado em todas as outras estruturas de septinas.⁷¹ Nesse caso, a hélice α_6 é contínua em relação à região correspondente à α_5 , o que impede o contato das carbonilas que deveriam interagir com a região PB1 da hélice α_0 . No entanto, modelos gerados pelo AlphaFold para essa mesma proteína apresentam a formação do cotovelo.⁷² Portanto, uma investigação mais cuidadosa é necessária para avaliar a influência da ausência desse resíduo (Gln(α_0)) na estrutura e na formação das interfaces-NC.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As septinas são proteínas do citoesqueleto importantes em diversos processos celulares. Para desempenharem suas funções, as septinas formam filamentos e estruturas mais complexas a partir de oligômeros de tamanhos variados, dependendo da composição de septinas e do organismo em questão. Problemas na montagem desses filamentos podem desencadear disfunções celulares e estão associadas a algumas doenças em seres humanos. Portanto, o estudo dos complexos de septinas é fundamental para compreender o mecanismo de montagem desses filamentos e como eles podem ser afetados em condições patológicas.

Neste estudo, vários aspectos da polimerização foram investigados, tanto para septinas humanas quanto para septinas de *Ciona intestinalis*, um organismo do grupo dos urocordados frequentemente utilizado como modelo evolutivo em pesquisas. Aplicando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível desvendar a organização dos complexos hexaméricos de ambos os organismos e observar detalhes moleculares em alta resolução do complexo como um todo, o que representa uma contribuição inédita para a literatura científica.

O estudo da organização do hexâmero SEPT2-SEPT6-SEPT7 humano revelou uma descoberta surpreendente: a ordem do complexo, anteriormente relatada como 7-6-2-2-6-7, anteriormente consagrada na literatura, estava equivocada. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a ordem correta do hexâmero é 2-6-7-7-6-2. Essa descoberta foi fundamental para compreender como os hexâmeros e octâmeros humanos podem compor o mesmo filamento. Adicionalmente, as interfaces expostas na ordem correta do hexâmero estão em concordância com dados observados dos complexos de septinas de levedura, que são amplamente estudados na literatura. A ordem do hexâmero do organismo *C. intestinalis* também foi investigada neste trabalho e mostrou-se correspondente ao complexo humano.

A utilização da técnica de criomicroscopia eletrônica permitiu obter estruturas moleculares detalhadas dos hexâmeros de septinas tanto em humanos quanto em *C. intestinalis*. As resoluções alcançadas foram significativamente melhores em comparação com a única estrutura cristalográfica disponível na literatura. A estrutura do complexo humano apresentou uma resolução de 3,6 Å, enquanto a do complexo

de *C. intestinalis* obteve uma resolução de 3,3 Å, em comparação aos 4 Å da estrutura cristalográfica.

Essas novas estruturas revelaram importantes detalhes moleculares, incluindo um dobramento específico conhecido como *side-to-side bending*, que pode estar relacionado à maneira com que as septinas interagem com membranas celulares. Além disso, foi possível desvendar detalhes importantes da interface-NC entre SEPT6 e SEPT7 de ambos os organismos. Essa interface, que era pouco explorada na literatura devido às dificuldades em obter cristais desse dímero e à baixa resolução da estrutura cristalográfica anteriormente resolvida, pôde ser estudada em maior profundidade graças à alta resolução obtida pela criomicroscopia eletrônica.

A observação da cavidade na interface-NC e das importantes interações que hélice $\alpha 0$ realiza com a subunidade vizinha proporcionou uma compreensão mais profunda sobre como essa interface é capaz de acomodar mudanças conformacionais. Em particular, as interações da hélice $\alpha 0$ com o cotovelo formado entre as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$, mediadas pela região polibásica e pela glutamina conservada (Glu($\alpha 0$)), bem como a fenilalanina da região do Hook-loop (Phe(HL)), foram identificadas como elementos-chave para a estabilidade da hélice $\alpha 0$ dentro da interface.

A obtenção de informações estruturais dos octâmeros de septinas tem sido desafiadora devido à sua flexibilidade e instabilidade uma abordagem promissora é o estudo dos tetrâmeros centrais, compostos por SEPT7 e SEPT9. Dessa forma, as informações estruturais desses tetrâmeros, combinadas com as estruturas dos hexâmeros, permitem obter a informação completa de um octâmero.

De maneira geral, a utilização da técnica de Crio-ME pela primeira vez no estudo das septinas mostrou-se altamente eficiente e pode ser aplicada sempre que for necessária uma visualização detalhada do complexo como um todo. Neste documento, destaca-se a observação dos complexos de septinas de vários organismos que mostram a exposição da interface-NC na extremidade dos complexos. No entanto, contrariando essa tendência, foi sugerido na literatura que o tetrâmero do organismo *C. elegans* expõe uma interface-G. A utilização da técnica de Crio-ME, que não estava disponível na época da realização desse estudo, pode agora ser utilizada para compreender a razão por trás dessa diferença no complexo em relação aos demais organismos, ou verificar se o modelo descrito na literatura está correto.

A técnica também pode ser empregada no estudo da influência de mutações relacionadas a doenças na montagem do complexo, bem como em investigações

sobre mudanças conformacionais decorrentes da troca de nucleotídeos, interações com moléculas parceiras e possíveis alterações causadas por modificações pós-traducionais.

Recentemente, a técnica de criotomografia eletrônica (Crio-ET) tem avançado no campo da visualização de complexos proteicos e na obtenção de estruturas tridimensionais diretamente no ambiente celular. Existem muitos estudos que visam compreender, por exemplo, como os filamentos de septinas interagem entre si para a formação de estruturas mais complexas. A aplicação da técnica de Crio-ET poderia ser uma solução para desvendar os detalhes moleculares envolvidos nessa dinâmica de formação de estruturas como anéis e redes, que são cruciais para que as septinas desempenhem seu papel em diversos processos celulares. Além disso, seria de grande interesse investigar a interação das septinas com as membranas celulares e outros componentes do citoesqueleto, como actina e microtúbulos. A Crio-ET apresenta um potencial promissor para revelar os detalhes dessas interações em sua configuração nativa, proporcionando uma compreensão mais completa das funções das septinas e sua relevância biológica.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. 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.
- 2 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.
- 3 HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678–3687, 1987.
- 4 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: Localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. **Developmental Genetics**, v. 112, n. 4, p. 535–544, 1991.
- 5 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother – bud neck. **Current Opinion Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001.
- 6 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012.
- 7 IVANOV, A. I. *et al.* Novel functions of the septin cytoskeleton: shaping up tissue inflammation and fibrosis. **American Journal of Pathology**, v. 191, n. 1, p. 40–51, 2021.
- 8 CAUDRON, F.; BARRAL, Y. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. **Developmental Cell**, v. 16, n. 4, p. 493–506, 2009.
- 9 MCMURRAY, M. A.; THORNER, J. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. **Cell Division**, v. 4, p. 18, 2009. DOI: 10.1186/1747-1028-4-18.
- 10 ANGELIS, D.; SPILLOTIS, E. T. Septin mutations in human cancers. **Frontiers in Cell Developmental Biology**, v. 4, n. 122, p. 1–17, 2016.
- 11 DOLAT, L.; HU, Q.; SPILLOTIS, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 123–141, 2016.
- 12 MOSTOWY, S. *et al.* Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 5, p. 433–444, 2010.
- 13 MOSTOWY, S. Multiple roles of the cytoskeleton in bacterial autophagy. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1–7, 2014.
- 14 LEIPE, D. D. *et al.* Classification and evolution of P-loop GTPases and related

ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41–72, 2002. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5378.

15 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 478–89, 2008.

16 CAVINI, I. A. *et al.* The structural biology of septins and their filaments : an update. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 1–25, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.765085

17 VALADARES, N. F. *et al.* Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, p. 481–500, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0320-4.

18 ZHANG, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458–1467, 1999.

19 SIRAJUDDIN, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311–317, 2007.

20 GRUPP, B.; GRONEMEYER, T. A biochemical view on the septins, a less known component of the cytoskeleton. **Biological Chemistry**, 2022. DOI: 10.1515/hsz-2022-0263.

21 SIRAJUDDIN, M. *et al.* GTP-induced conformational changes in septins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009.

22 CASTRO, D. K. S. V. *et al.* A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. **IUCrJ**, v. 7, Pte 3, p. 462–479, 2020.

23 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, p. 1–17, 2007.

24 BERTIN, A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* septins : supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.

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

26 SIRAJUDDIN, M. Structural studies on mammalian septins – new insights into filament formation. 2007. PhD Thesis (Doctor) - Universität Dortmund, Dortmund, 2007).

27 CANNON, K. S. *et al.* An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 4, p. 1128–1137, 2019.

- 28 ZERAIK, A. E. *et al.* Biophysical dissection of schistosome septins: insights into oligomerization and membrane binding. **Biochimie**, v. 131, p. 96–105, 2016. DOI:10.1016/j.biochi.2016.09.014.
- 29 LI, H. *et al.* Zika virus protease cleavage of host protein septin-2 mediates mitotic defects in neural progenitors. **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 1089-1098.e4, 2019.
- 30 BROGNARA, G. **Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.
- 31 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.
- 32 ROSA, H. V. D. *et al.* Molecular recognition at septin interfaces: the switches hold the key. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 21, p. 5784–5801, 2020.
- 33 OMRANE, M. *et al.* Septin 9 has two polybasic domains critical to septin filament assembly and golgi integrity. **iScience**, v. 13, p. 138–153, 2019. DOI: 10.1016/j.isci.2019.02.015.
- 34 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, p. 1–17, 2007.
- 35 MCILHATTON, M. A. *et al.* Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. **Oncogene**, v. 20, n. 41, p. 5930–9, 2001.
- 36 HALL, P. A. *et al.* Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.
- 37 CAO, L. *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5526–5532, 2007.
- 38 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003.
- 39 CABREJOS, D. A. L. **Determinantes estruturais para a especificidade de interação nas interfaces G e NC de septinas:** validando as regras de substituição na montagem do filamento. 2020. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São carlos, 2020.
- 40 KIM, M. S. *et al.* 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.
- 41 SELLIN, M. E. *et al.* Deciphering the rules governing assembly order of mammalian

septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 17, p. 3152–3164, 2011.

42 SELLIN, M. E.; STENMARK, S. & GULLBERG, M. Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 10, p. 1594–1607, 2014.

43 MENDONÇA, D. C. **Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica de transmissão**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

44 MENDONÇA, D. C. *et al.* A revised order of subunits in mammalian septin complexes. **Cytoskeleton**, v.76, n. 9-10, p.457-466. 2019

45 FRAZIER, J. A. *et al.* Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 737–749, 1998.

46 SZUBA, A. *et al.* Membrane binding controls ordered self-assembly of animal septins. **Elife**, v. 10, n. e63349, p. 1–35, 2021.

47 JOHN, C. M. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296–3307, 2007.

48 PINTO, A. P. A. *et al.* Filaments and fingers: novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 26, p. 10899–10911, 2017.

49 SZUBA, A. *et al.* Membrane binding controls ordered self-assembly of animal septins. **eLife**, v. 10, p. e63349, 2021. DOI: 10.7554/eLife.63349

50 KHAN, A. *et al.* Control of septin filament flexibility and bundling by subunit composition and nucleotide interactions. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 6, p. 702–712, 2018.

51 GARCIA, G. I. *et al.* 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.

52 JOBERTY, G. *et al.* Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 3, n.10, p. 861–866, 2001.

53 SADIAN, Y. *et al.* The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–26, 2013.

54 BERTIN, A. *et al.* SI: phosphatidylinositol-4, 5- bis phosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 404, n. 4, p. 711–731, 2010.

55 GLAESER, R. M.; NOGALES, E.; CHIU, W. Single-particle Cryo-EM of biological macromolecules. Bristol: IPP, 2021.

56 FRANK, J. **Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies**. Berlin: Elsevier, 2006.

57 MENDONÇA, D. C. *et al.* A revised order of subunits in mammalian septin complexes. **Cytoskeleton**, v. 76, n. 9–10, p. 457–466, 2019.

58 PENCZEK, P. A. Fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections. **Methods in Enzymology**, v. 482, n. C, p. 1–33, 2010.

59 SOROOR, F. *et al.* 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.

60 MENDONÇA, D. C. *et al.* An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 15, p. 167096, 2021.

61 DUBACH, V. R. A.; GUSKOV, A. The resolution in x-ray crystallography and single-particle cryogenic electron microscopy. **Crystals**, v. 10, n. 7, p. 1–13, 2020.

62 BARAD, B. A. *et al.* EMRinger: side chain-directed model and map validation for 3D cryo-electron microscopy. **Nature Methods**, v. 12, n. 10, p. 943–946, 2015.

63 DIMAIO, F.; CHIU, W. Tools for model building and optimization into near-atomic resolution electron cryo-microscopy density maps. **Methods in Enzymology**, v. 579, p. 255-276, 2016. DOI: 10.1016/bs.mie.2016.06.003.

64 MARQUES, M. A.; PURDY, M. D.; YEAGER, M. CryoEM maps are full of potential. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 58, n. 3, p. 214–223, 2019.

65 BEBER, A. *et al.* Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-08344-5.

66 BRIDGES, A. A. *et al.* Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 1, p. 23–32, 2016.

67 CHOTHIA, C.; LEVITT, M.; RICHARDSON, D. Helix to helix packing in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 145, n. 1, p. 215–250, 1981.

68 MORAIS, S. T. D. B. **Septinas de *Ciona intestinalis*: estudos voltados à formação de heterocomplexos**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

69 IV, F. *et al.* Insights into animal septins using recombinant human septin octamers with distinct SEPT9 isoforms. **Journal of Cell Science**, v. 134, n. 15, 2021.

70. JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

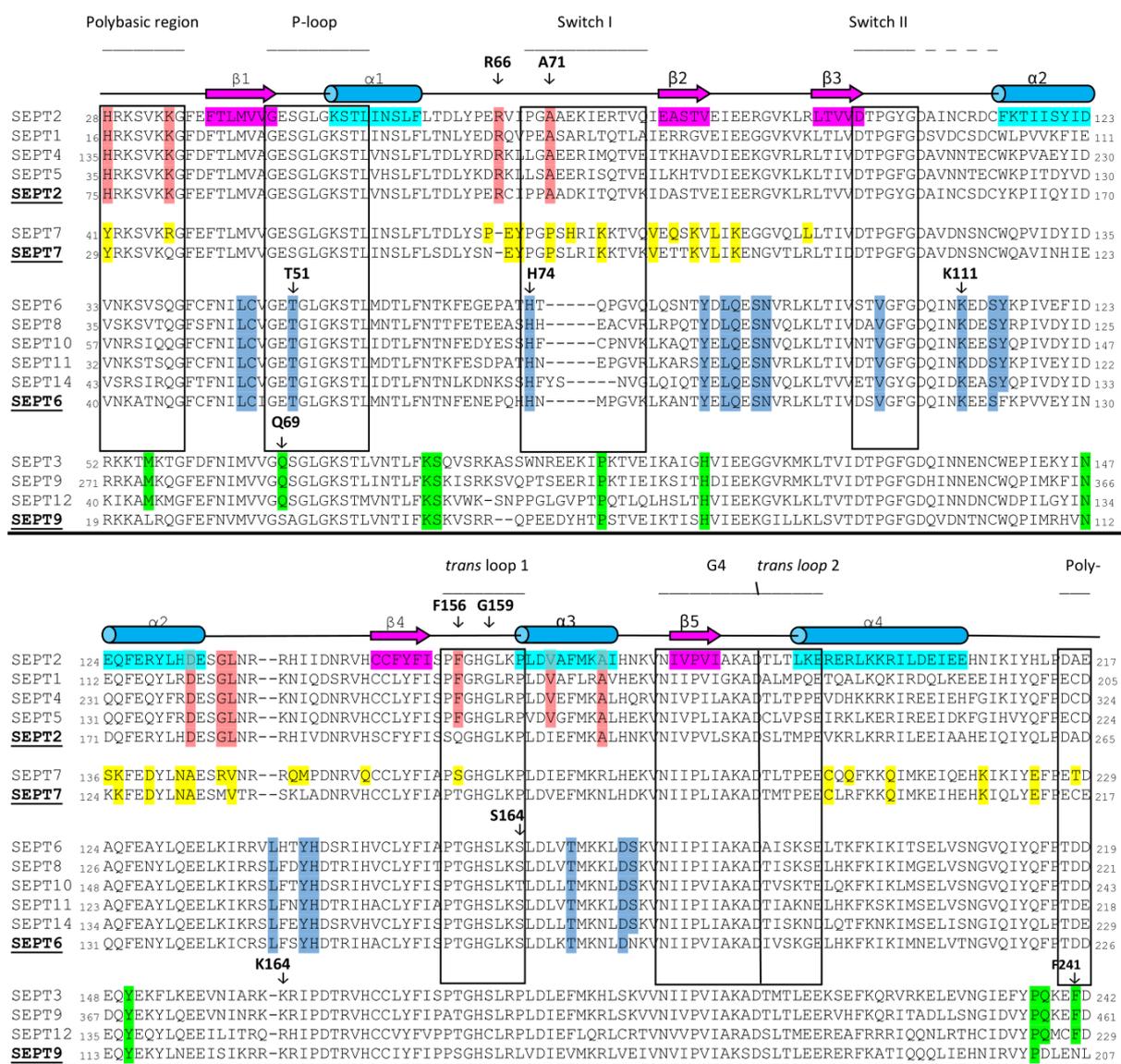
71. BRAUSEMANN, A. *et al.* Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Structural Biology**, v. 193, n. 3, p. 157–161,

2016.

72. DA SILVA, R. M. Caracterização estrutural das septinas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12. (Universidade de São Paulo, 2022).

ANEXOS

Alinhamento do domínio G das septinas analisadas nesse trabalho (Humanas e de *Ciona intestinalis*) segue abaixo. As septinas de *C. intestinalis* estão representadas em negrito.



Os artigos científicos que incluem os resultados discutidos seguem abaixo.

Artigo 1

Received: 14 April 2019 | Revised: 18 September 2019 | Accepted: 19 September 2019
DOI: 10.1002/cm.21569



SHORT REPORT



A revised order of subunits in mammalian septin complexes

Deborah C. Mendonça^{1†} | Joci N. Macedo^{1,2†} | Samuel L. Guimarães¹ |
Fernando L. Barroso da Silva^{3,4} | Alexandre Cassago⁵ | Richard C. Garratt¹ |
Rodrigo V. Portugal⁵ | Ana P. U. Araujo¹

¹São Carlos Institute of Physics, USP, São Carlos, SP, Brazil

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Rondonia

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴UMR_S 1134, Université Paris Diderot, Paris, France

⁵Brazilian Nanotechnology National Laboratory, CNPEM, Campinas, SP, Brazil

Correspondence

Rodrigo V. Portugal, Brazilian Nanotechnology National Laboratory, CNPEM, Campinas, SP, Brazil.
Email: rodrigo.portugal@innano.cnpem.br

Ana P. U. Araujo, São Carlos Institute of Physics, USP, São Carlos, SP, Brazil.
Email: anapaula@ifsc.usp.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2014/15546-1, 2015/16116-3, 2017/15340-2

Abstract

Septins are GTP binding proteins considered to be novel components of the cytoskeleton. They polymerize into filaments based on hexameric or octameric core particles in which two copies of either three or four different septins, respectively, assemble into a specific sequence. Viable combinations of the 13 human septins are believed to obey substitution rules in which the different septins involved must come from distinct subgroups. The hexameric assembly, for example, has been reported to be SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. Here, we have replaced SEPT2 by SEPT5 according to the substitution rules and used transmission electron microscopy to demonstrate that the resulting recombinant complex assembles into hexameric particles which are inverted with respect that predicted previously. MBP-SEPT5 constructs and immunostaining show that SEPT5 occupies the terminal positions of the hexamer. We further show that this is also true for the assembly including SEPT2, in direct contradiction with that reported previously. Consequently, both complexes expose an NC interface, as reported for yeast, which we show to be more susceptible to high salt concentrations. The correct assembly for the canonical combination of septins 2-6-7 is therefore established to be SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2, implying the need for revision of the mechanisms involved in filament assembly.

KEYWORDS

core particle complex, NC interface, septin, TEM

1 | INTRODUCTION

Septins belong to the family of P-loop GTPases (Weirich, Erzberger, & Barral, 2008). They differ from most other members in their ability to polymerize into filaments, a property which is the result of a characteristic sequence known as the Septin Unique Element (Valadares, Pereira, Araujo, & Garratt, 2017; Versele et al., 2004). Septins have been classically described to participate in cytokinesis, but also play roles in other important intracellular processes. These include acting

as scaffolds in the recruitment of binding partners; as diffusion barriers in the compartmentalization of membrane proteins; in host-microorganism interaction and even in mechanotransduction (Caudron & Barral, 2009; Gladfelter, Pringle, & Lew, 2001; Lam & Calvo, 2018; Mostowy & Cossart, 2012).

Structurally, septins are divided into three principal domains: the N-terminal (N), GTP-binding (G), and C-terminal (C) domains. The central, G domain, is the most conserved and its ability to bind GTP is important for the interaction between septins within filaments and is fundamental to ensure structural integrity (Valadares et al., 2017; Zent & Wittinghofer, 2014; Zeraik et al., 2014). Based on sequence

[†]Deborah C. Mendonça and Joci N. Macedo contributed equally to this work.



An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM

Deborah C. Mendonça¹, Samuel L. Guimarães¹, Humberto D'Muniz Pereira¹,
Andressa A. Pinto¹, Marcelo A. de Farias², Andre S. de Godoy¹, Ana P. U. Araujo¹,
Marin van Heel², Rodrigo V. Portugal^{2*} and Richard C. Garratt^{1*}

¹ - São Carlos Institute of Physics, USP, São Carlos, SP, Brazil

² - Brazilian Nanotechnology National Laboratory, CNPEM, Campinas, SP, Brazil

Correspondences to Rodrigo V. Portugal and Richard C. Garratt: rodrigo.portugal@innano.cnpem.br (R.V. Portugal), richard@ifsc.usp.br (R.C. Garratt)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167096>

Edited by James Sellers

Abstract

In order to form functional filaments, human septins must assemble into hetero-oligomeric rod-like particles which polymerize end-to-end. The rules governing the assembly of these particles and the subsequent filaments are incompletely understood. Although crystallographic approaches have been successful in studying the separate components of the system, there has been difficulty in obtaining high resolution structures of the full particle. Here we report a first cryo-EM structure for a hexameric rod composed of human septins 2, 6 and 7 with a global resolution of ~ 3.6 Å and a local resolution of between ~ 3.0 Å and ~ 5.0 Å. By fitting the previously determined high-resolution crystal structures of the component subunits into the cryo-EM map, we are able to provide an essentially complete model for the particle. This exposes SEPT2 NC-interfaces at the termini of the hexamer and leaves internal cavities between the SEPT6-SEPT7 pairs. The floor of the cavity is formed by the two α_0 helices including their polybasic regions. These are locked into place between the two subunits by interactions made with the α_5 and α_6 helices of the neighbouring monomer together with its polyacidic region. The cavity may serve to provide space allowing the subunits to move with respect to one another. The elongated particle shows a tendency to bend at its centre where two copies of SEPT7 form a homodimeric G-interface. Such bending is almost certainly related to the ability of septin filaments to recognize and even induce membrane curvature.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Septins have been widely considered to be the fourth component of the cytoskeleton.¹ Unlike microtubules and F-actin, they form apolar filaments whose interactions with other cellular components and with the plasma membrane are associated with their roles in cell division, exocytosis and vesicle trafficking,²⁻⁸ as well as in establishing cell polarity and asymmetry.⁹ Furthermore,

more passive roles have also been attributed to septins such as in microbial entrapment, barrier formation and as molecular scaffolds.^{1,10-13} The filaments which septins form appear to be unique within the cytoskeleton since their lack of polarity arises from the alternating orientation of their component subunits and not from the anti-parallel arrangement of pairs of dimers, as seen in intermediate filaments.