

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Pedro Masotti Moretti da Silveira

**Estudo da interação do *coiled-coil* de
septinas Cdc3-Cdc12 com peptídeos de
proteínas Gic**

São Carlos

2022

Pedro Masotti Moretti da Silveira

**Estudo da interação do *coiled-coil* de
septinas Cdc3-Cdc12 com peptídeos de
proteínas Gic**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa
de Gra- duação em Física do Instituto de Física de São
Carlos da Universi- dade de São Paulo, para obtenção do
título de Bacharel em Fisica Biomolecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian
de Araújo

Co-orientador: Dr. Ítalo Augusto Cavini

São Carlos
2022

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

silveira, Pedro Masotti Moretti da
Estudo da interação do *coiled-coil* de septinas Cdc3-
Cdc12 com peptídeos de proteínas Gic / Pedro Masotti
Moretti da Silveira; orientador Ana Paula Ulian de
Araujo; co-orientador Italo Augusto Cavini -- São Carlos,
2022.
26 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências
Físicas e Biomoleculares) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Septinas. 2. Coiled-coil. 3. Espectroscopia de
dicroísmo circular. I. Araujo, Ana Paula Ulian de, orient.
II. Cavini, Italo Augusto, co-orient. III. Título.

Resumo

Septinas são proteínas citoesqueléticas capazes de se ligar a nucleotídeos de guanina e participam de funções celulares diversas como exocitose, fagocitose, citocinese, entre outras, com presença em todos os metazoários e fungos. Estruturalmente as septinas se destacam pela organização em complexos heteroligoméricos lineares que se unem em filamentos e em estruturas de maior complexidade. Em leveduras, temos o octâmero composto por Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11, do qual as septinas Cdc3-Cdc12 estão associadas por uma interface do tipo NC, de forma que uma porção de seus domínios C-terminais forma um *coiled-coil* supostamente paralelo e heterodimérico. É fato que septinas interagem com outras proteínas, como as proteínas BORG's humanas, membros da família das efetoras da Cdc42, responsáveis por regular diversos processos do ciclo celular. Essas proteínas ligam-se ao coiled-coil da SEPT6-SEPT7, análogo ao da Cdc3-Cdc12, por um domínio chamado BD3. As homólogas funcionais de BORG's em levedura são as chamadas Gic1 e Gic2. Desta forma, neste trabalho buscou-se estudar a interação entre o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12 com as Gic's, predita pela modelagem do complexo em AlphaFold2. Para isso, a interação dos domínios C-terminais das septinas Cdc3-Cdc12 com a região BD3 das Gic's foi explorada por meio de espectroscopia por dicroísmo circular, utilizando uma análise comparativa da temperatura de melting dos complexos. Os experimentos de desnaturação térmica foram conduzidos em diferentes ensaios, envolvendo também peptídeos mutados a fim de validar o modelo de interação.

Palavras chave: Septinas. *Coiled-coil*. Espectroscopia de dicroísmo circular.

SUMÁRIO

1	Introdução	7
1.1	Domínios G e N-terminal	8
1.2	Domínio C-terminal	9
1.3	<i>Coiled-coils</i>	9
1.4	As proteínas Gic	10
2	Metodologia	13
2.1	Obtenção das amostras	13
2.1.1	Clonagens e expressão	13
2.1.2	Síntese química dos peptídeos Gic-BD3	13
	Modelagem por AlphaFold 7	
2.2	Espectroscopia de dicroísmo circular	14
3	Resultados	17
3.1	Obtenção das amostras	17
3.1.1	Expressao	17
3.2	Modelagem por AlphaFold	17
3.3	Espectroscopia de dicroísmo circular	19
3.3.1	Heterodimerização dos C-terminais	21
3.3.2	Interação com Gic	21
3.3.3	Mutação no domínio BD3	23
4	Conclusões e considerações finais	25
	Referências	27

1 Introdução

Septinas são proteínas descobertas por Hartwell no final dos anos 60 no septo formado em células de *S.cerevisiae* em divisão celular.¹ Mais tarde foi identificada a presença de tais proteínas em vários eucariotos como outros fungos, humanos e algas, exceto em plantas.² Atualmente sabe-se que septinas estão envolvidas em diversos processos celulares como a citocinese, fagocitose, ciliogênese, polarização celular, entre outras, e por isso são consideradas o quarto componente do citoesqueleto juntamente de filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.³

Em função do envolvimento de septinas em tais processos celulares, disfunções na expressão dessas proteínas já foram muitas vezes associadas com certas patologias, como infertilidade masculina, doenças neurodegenerativas e câncer.⁴ Ainda, mais recentemente, um estudo mostrou a clivagem da septina 2 humana pela protease NS2B-NS3 do vírus Zika como mecanismo neurotóxico.⁵ Assim, entender os mecanismos estruturais das septinas pode abrir caminho para compreender seus variados papéis biológicos e interações com outros componentes celulares e de que forma se associam com doenças, o que é possível à luz da biologia estrutural.

A execução das funções celulares das septinas se dá na forma de estruturas complexas como feixes e anéis, todos construídos a partir de filamentos de septinas polimerizados a partir de hetero-oligômeros lineares não polares unidos por suas extremidades. Os oligômeros são estabelecidos por interações laterais entre subunidades que podem ser da forma G ou NC, intercaladas na sequência palindrômica de subunidades (Figura 1).

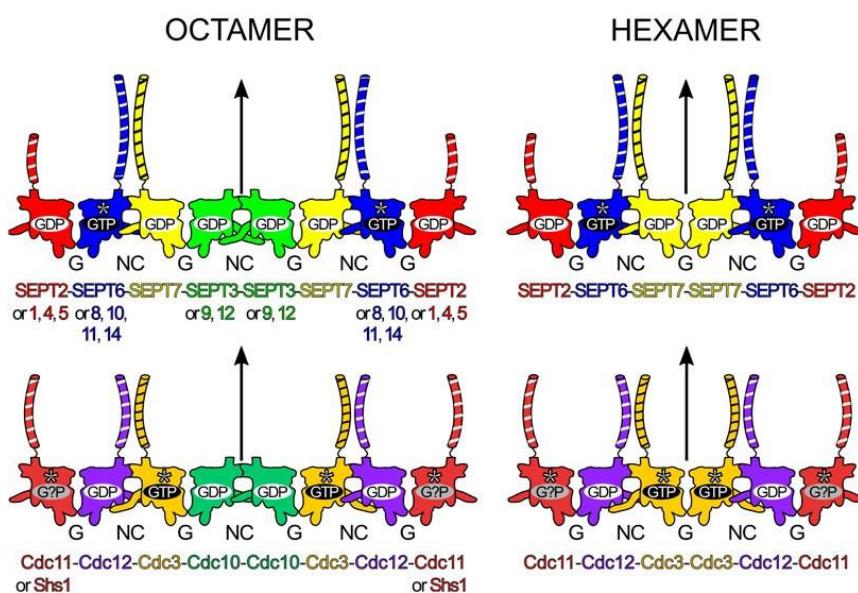


Figura 1 – Octâmeros (à esquerda) e hexâmeros (à direita) de septinas presentes em humanos (acima) e em leveduras (abaixo), com suas interfaces, e nucleotídeo de guanina ligado devidamente indicados. As cores referem-se a grupos de septinas como descrito em Kinoshita.⁶

Fonte: CAVINI *et al.*⁷

Na Figura 1, são mostrados os octâmeros e hexâmeros de septinas de humanos e leveduras e suas respectivas subunidades. A homologia entre septinas de mamíferos permitiu separá-las nos quatro grupos de Kinoshita;⁶ no mais há a classificação descrita no trabalho de Momany *et al.* que contempla a filogenia entre organismos modelo⁸ (Figura 2).

Momany Group ¹	Kinoshita Group ²	Hs ³	Dm	Sm	Ce	Sc	An	Mo	Tt	Cr
1a	SEPT3	SEPT3 SEPT9 SEPT12				Cdc10	AspD	Sep4		
1b	SEPT6	SEPT6 SEPT8 SEPT10 SEPT11 SEPT14	Sep2 Sep5	SEPT10	UNC61					
2a						Cdc3	AspB	Sep3		
2b	SEPT2	SEPT1 SEPT2 SEPT4 SEPT5	Sep1 Sep4	SEPT5						
	SEPT7	SEPT7	Pnut	SEPT7.1 SEPT7.2	UNC59					
3						Cdc11 Shs1 Spr28	AspA	Sep5		
4						Cdc12 Spr3	AspC	Sep6		
5							AspE	Sep7	Sep2 Sep3	Sep1

Figura 2 – Divisão de septinas de organismos modelo em grupos de Momany e Kinoshita (para mamíferos). Hs, *Homo sapiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Sm, *Schistosoma mansoni*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; An, *Aspergillus nidulans*; Mo, *Magnaporthe oryzae*; Tt, *Tetrahymena thermophila*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Fonte: SHUMAN; MOMANY.⁸

1.1 Domínios G e N-terminal

O domínio G de septinas (Figura 3) é a maior e mais conservada porção desta família de proteínas. Sua estrutura se assemelha à de Ras-GTPases composta por um conjunto de fitas-β envoltas por hélices-α, contudo, as septinas apresentam variações estruturais intimamente relacionadas com sua polimerização: o *switch 2* (Sw2) alongado, a região poliácida (PAR) da hélice adicional α5', a região polibásica (PB2) contida no *loop* alongado que conecta a fita β4

à hélice α2 e a própria hélice α2 alongada.⁷ Finalmente, há a presença da região do *septin unique element* (SUE), uma sequência de aproximadamente 60 resíduos que atravessa todo o domínio G, desta forma participando dos dois tipos de interface. Não apenas isso, o SUE é estritamente necessário nas interfaces promovendo a estabilização dos elementos interagentes entre subunidades, de forma que é responsável por permitir a polimerização de septinas.⁷

O domínio N-terminal no geral é o mais curto e em grande extensão desestruturado, a menos de uma hélice (α0), potencialmente envolvida em interações de membrana e

que contém outra região polibásica (PB1); e o “hook-loop”, presente na interface NC.⁷

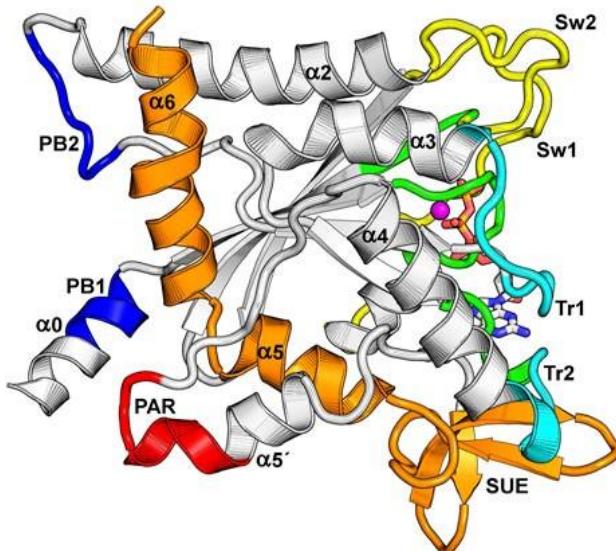


Figura 3 – Domínio G de septinas visto na direção perpendicular ao eixo de simetria do oligômero. As principais estruturas presentes descritas no texto estão coloridas.

Fonte: CAVINI *et al.*⁷

1.2 Domínio C-terminal

A característica mais marcante do domínio C-terminal de septinas é a região com predição de formar *coiled-coil*, não encontrada em Cdc10, nem no grupo da SEPT3 humana. Adicionalmente há a presença de uma região N-terminal (Cn) e C-terminal (Cc) flanqueando a região de *coiled-coil*: a primeira confere grande flexibilidade ao domínio C-terminal em relação ao domínio G a partir da hélice α 6, e a última pode possuir uma região polibásica da qual especula-se seu envolvimento em interações com a membrana celular.

Nos oligômeros de septinas, nas subunidades unidas por interfaces do tipo NC há a formação de *coiled-coils* paralelos, como o de SEPT6-SEPT7 e Cdc3-Cdc12 mostrados na Figura 1. Além destes, na polimerização de oligômeros tem-se *coiled-coil* s homodiméricos de SEPT2 e Cdc11 devido sua localização nas extremidades dos octâmeros, unindo-se a vizinhos também por interfaces NC.

1.3 Coiled-coils

Coiled-coils ou superhélices são motivos estruturais formados por duas ou mais hélices- α enroladas entre si, estabelecendo uma superfície de contato hidrofóbica em seu interior. Para que isso ocorra as cadeias laterais dos resíduos internos ficam dispostas na forma *knobs-into-holes*, isto é, a cadeia lateral do resíduo de uma hélice encaixa no espaço formado pelas cadeias laterais dos quatro resíduos próximos da outra hélice.⁹

Refletindo a propriedade de um número fixo de resíduos por volta das hélices, *coiled coils* possuem na maior parte das vezes uma periodicidade heptamérica (3,5 resíduos por volta, 7/2)

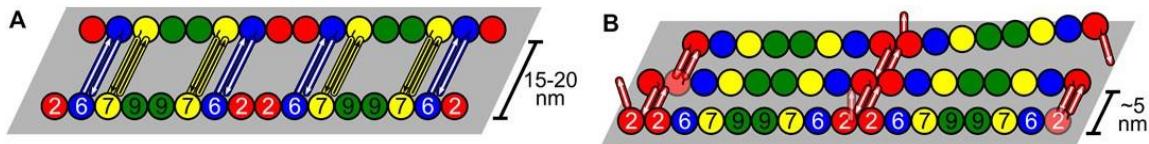


Figura 4 – Ilustração das distâncias entre filamentos de septinas longa (A) e curta (B), de acordo com o tipo de *coiled-coil* formado.

Fonte: CAVINI *et al.*⁷

na sequência primária, sendo os resíduos usualmente nomeados *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, com as posições *a* e *d* usualmente ocupadas por resíduos hidrofóbicos. Na prática, duas voltas de uma hélice não correspondem à repetição heptamérica, de forma que as hélices se entrelaçam com torção de mão esquerda.¹⁰

Os demais resíduos são hidrofílicos no geral, com destaque para *e* e *g*, que podem estabelecer interações eletrostáticas intercadeias, estabilizando a estrutura. Os resíduos em *a* e *d* formam camadas na forma *a-a/d-d* (estrutura paralelas) ou *a-d* (estruturas antiparalelas).

Podem existir descontinuidades no padrão heptamérico por inserções de resíduos, provocando mudanças estruturais na superhélice, o que é visto pela mudança no ângulo de empacotamento. Inserções de 1, 3 e 4 resíduos são chamadas de *skips*, *stammers* e *stutters*. *Stutters* geram desenrolamento da superhélice, *stammers* o contrário.⁹

Apesar do padrão hidrofóbico em posições *a* e *d* em *coiled-coils* canônicos, a presença de aminoácidos polares no centro da superhélice aponta para eventual especificidade na orientação, como é visto em septinas. Acredita-se que *coiled-coils* de septinas estejam envolvidos em interações interfilamentos, na orientação antiparalela, e há reportado duas distâncias entre filamentos, que acredita-se ser dos diferentes *coiled-coils* presentes nos octâmeros: a mais curta (5 nm) associada à SEPT2 humana e a mais longa (15-20 nm) associada ao *coiled-coil* de SEPT6-SEPT7.¹¹

1.4 As proteínas Gic

Antes da divisão celular, a célula polariza o citoesqueleto de actina e o anel de septinas é montado no futuro sítio de divisão. Este processo depende do recrutamento das septinas, que é efetuado a partir da Cdc42, seus fatores GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) e GAP (*GTPase activating protein*) e outras proteínas efetoras. Em leveduras, sabe-se que duas proteínas efetoras da Cdc42, Gic1 e Gic2, interagem com

septinas, e propôs-se um modelo no qual as Gic's atuam como uma ponte entre septinas e Cdc42, uma vez que esta não interage diretamente com as primeiras mas sim com as Gic's, que possuem um domínio CRIB pelo qual a Cdc42 se liga.¹²

O mecanismo descrito atua também em mamíferos, mas mediado pela família das proteínas BORG, compostas por cinco membros, capazes de interagir com septinas por seus domínios conservados CRIB, BD1, BD2 e BD3.¹³ O alinhamento entre as BORG's e Gic's mostra que Gic1 e Gic2 possuem o domínio CRIB (consenso ISXPLGDFRHTXH(I/V)G) e BD3 (consenso SLLSXXLX(L/V)DLGPSXLX(V/L)LX(V/I)MD) com baixa similaridade (Figura 5).

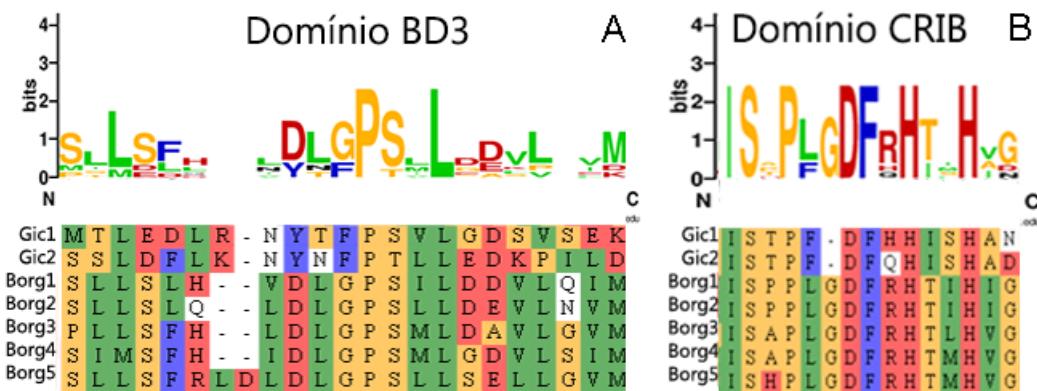


Figura 5 – Alinhamento das Gic's e BORG's humanas na região do domínio BD3 (A) e CRIB (B), destacando resíduos conservados pelo formato WebLogo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Sabe-se que as BORG's interagem especificamente com a SEPT6-SEPT7, conectadas por uma interface NC,¹⁴ e recentemente foi determinado que as BORG's se ligam ao *coiled-coil* estabelecido pelas septinas a partir da região BD3 e esta interação é verificada quantitativamente pelo aumento da temperatura de *melting* do complexo *coiled-coil* +BD3, o que significa um aumento na estabilidade (dados do grupo, ainda não publicados). Assim, devido à presença do domínio semelhante ao BD3 nas Gic's e sua conhecida interação com septinas, era esperado ver uma situação análoga em leveduras, na qual temos o *coiled-coil* de Cdc3 e Cdc12. No entanto, temos reportada na literatura a interação entre Gic1 e Cdc10, que fica no centro do octâmero.¹⁵ Por isso, estudar a interação entre Gic e o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12 pode expandir o modelo atual, mostrando que as Gic's fazem contatos com múltiplas subunidades do filamento.

2 Metodologia

2.1 Obtenção das amostras

2.1.1 Clonagens e expressão

Dada a disponibilidade das sequências codificantes para Cdc3C (domínio C-terminal de Cdc3, Uniprot:P32457, coordenadas 413-520) e Cdc12C (domínio C-terminal de Cdc12, Uniprot:P32468, coordenadas 316-407) nos laboratórios do Grupo de Biofísica Molecular, essas Cdcs foram inseridas nos vetores pETSUMO e pET28a, respectivamente. As clonagens e manipulações de DNA foram realizadas segundo as técnicas padrão descritas por Sambrook *et al.* e a confirmação das sequências feita por sequenciamento automático de DNA.

A expressão proteica foi feita na linhagem de *E.coli* Rosetta(DE3), após adição de agente indutor (IPTG) nas culturas, e coleta das células por centrifugação, ressuspensão em tampão 20 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl, 10% glicerol, 10 mM imidazol e ultrasonicação para lise celular. Separou-se as frações solúveis e insolúveis por centrifugação, a fim de realizar cromatografia por afinidade. Finalmente, empregou-se cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL em tampão 20 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol para separar as proteínas de interesse, com verificação da purificação e grau de pureza das amostras por tricina-SDS-PAGE.

2.1.2 Síntese química dos peptídeos Gic-BD3

Os peptídeos Gic1-BD3 (Uniprot:P38785, coordenadas 223-244), Gic2-BD3 (Uniprot:Q06648, coordenadas 278-305)e Gic2-BD3(F304A) foram produzidos pela técnica de laboratório Derminda Isabel de Moraes usando síntese orgânica em fase sólida. Empregou-se o uso de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarboxila), grupo químico que protege temporariamente a região N-terminal do aminoácido, permitindo que a síntese ocorra sob condições reacionais brandas, na direção do C- para o N-terminal. Como suporte polimérico, foi utilizada resina Rink-Amida. Após cada etapa de acoplamento, realizou-se o teste de ninidrina e, em caso positivo (i.e., não-acoplamento), a reação foi repetida. Ao final da síntese, o material foi clivado da resina usando solução contendo ácido trifluoracético (TFA) e, posteriormente, foi realizada a precipitação do material com éter etílico gelado, centrifugado por 5 minutos para retirar os restos de síntese. No precipitado ficava resina e o peptídeo, e após 3 lavagens o precipitado foi seco.

A extração foi feita com TFA 0,1% e acetonitrila (ACN) 90% com 0,1% de TFA (50% v/v), seguido de centrifugação com 3 repetições, para separar os peptídeos livres e resina (material depositado). Uma vez extraídas, as amostras contendo o peptídeo foram lyophilizadas e solubilizados no mesmo tampão de eluição. O material

obtido foi purificado usando coluna de exclusão molecular Superdex Peptide em tampão 25% de ACN 0,1% TFA. As massas dos peptídeos obtidos foram confirmadas por espectrometria de massas em equipamento eletrospray Bruker qTOF-II.

2.2 Modelagem por *AlphaFold*

Como não há estruturas cristalográficas determinadas para o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12, utilizou-se o software AlphaFold¹⁶ para modelar o *coiled-coil* e também complexos deste com Gic1-BD3 e Gic2-BD3 por meio de plataforma colaborativa.¹⁷

Na elaboração dos modelos utilizou-se as sequências de Cdc3C, Cdc12C e Gic1-BD3 ou Gic2-BD3. Para validar as estruturas utilizou-se uma métrica do AlphaFold chamada pLDDT (*predicted local-distance difference test*), reportada na forma de um score indicando a confiabilidade resíduo a resíduo. Ademais, há outro score que avalia globalmente a modelagem, chamado pTM (de *template modelling*).¹⁶

Após produção dos modelos, a ferramenta selecionou o melhor deles a partir do maior pTM e efetuou um passo de relaxação de sua estrutura utilizando o campo de força Amber, de forma a posicionar adequadamente os rotâmeros.

2.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

As medidas de espectroscopia por dicroísmo circular foram realizadas num espetropolarímetro JASCO J-815. As interações foram avaliadas em tampão fosfato de sódio (NaP) 20 mM, contendo NaCl 50 mM e concentrações variadas de glicerol e diferentes pH. Foram utilizadas três condições de tampão, denominadas A (10% glicerol, pH 7,5), B (10% glicerol, pH 6,0) e posteriormente A2 (5% glicerol, pH 7,5). A concentração de C-terminais de septinas e Gic-BD3 foi mantida 5 μ M cada, exceto numa condição em 10 μ M para os casos em que apenas uma espécie de C-terminal estava presente. Para todos os experimentos, conduzidos em duplicata, foram feitos espectros de varredura de 195 a 260 nm à temperatura de 4°C com seis escaneamentos; espectros de desnaturação térmica conduzidos de 4°C a 70 °C com variação de temperatura de 1 °C/min, monitorados a 222 nm;¹⁸ e finalmente nova varredura nas mesmas condições da primeira, agora com apenas um escaneamento, a fim de verificar a integridade das amostras após desnaturação.

Os espectros coletados foram analisados pela ferramenta CDtool,¹⁹ e as curvas de desnaturação tratadas no software gráfico Origin (Microcal). Pelo CDtool foi possível verificar a qualidade das amostras pela razão da elipticidade medida em 222 e 208 nm, esperada num valor próximo a 1. As temperaturas de melting foram obtidas a partir do fitting de uma curva do tipo Boltzmann (Double Boltzmann) da média das normalizações para cada medida das duplicatas.

3 Resultados

3.1 Obtenção das amostras

3.1.1 Expressão

Após a clivagem das proteínas de fusão com SUMO protease e trombina, purificação e concentração obteve-se Cdc3C e Cdc12C nas concentrações de 1,9 mM e 2,2 mM, com rendimentos aproximados de 2 e 10 mg/L de cultura. Observando o gel ao final da eletroforese (Figura 6), foi possível verificar que as bandas obtidas são compatíveis com o peso molecular esperado (aproximadamente 12,8 kDa para Cdc3C e 11,3 kDa para Cdc12C).

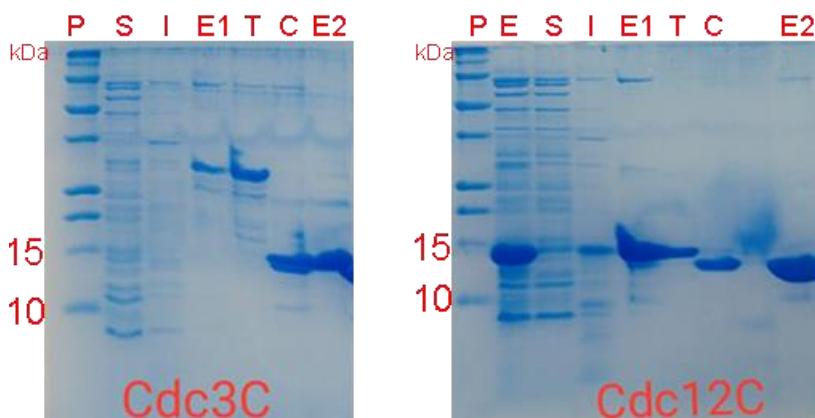


Figura 6 – Expressão e purificação de Cdc3C e Cdc12C. Eletroforese em gel de tricina mostrando: padrão de massa molecular (P); fração solúvel (E); saída da coluna (S) e insolúvel (I) do extrato celular; amostra eluída da coluna de afinidade com 40 mM e 200 mM de imidazol (E1 e T, respectivamente); clivagem das proteínas de fusão (C); saída da segunda purificação (amostra final) (E2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Modelagem por AlphaFold

A modelagem mostrou alta confiança no *coiled-coil* nativo, determinado pelo valor de LDDT reportado na Figura 7. Ainda, vemos no gráfico que as duas regiões de maior score são respectivamente as hélices do *coiled-coil*.

Introduzindo as Gic's no modelo foi possível ver que a região FPS/T se liga à fenda da superhélice, estabelecendo localmente uma estrutura semelhante a um *coiled-coil* trimérico, com o resíduo de Phe304 da região mencionada inserido em uma cavidade do *coiled-coil* (Figura 8). Além disso, em ambos os modelos, existem resíduos adjacentes à região FPS/T que também se ancoram, cujos contatos são mais evidentes no modelo com Gic2-BD3.

Foram elaborados modelos com mutações para Ala no resíduo de Phe das regiões FPS/T das respectivas Gic, e foi visto que nos dois modelos houve um afastamento do

peptídeo em relação

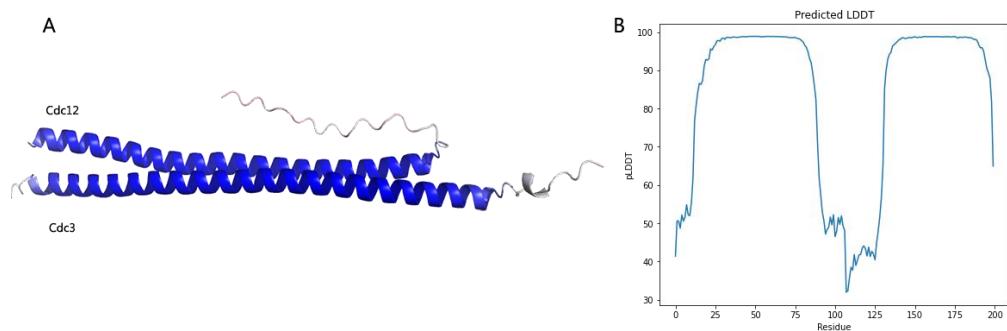


Figura 7 – Em (A), modelo do *coiled-coil* colorido em relação ao LDDT, e em (B) o valor de LDDT predito para cada um dos resíduos. A estrutura está colorida conforme o LDDT (vermelho = 0, branco = 50, azul = 100).

Fonte: Elaborada pelo autor.

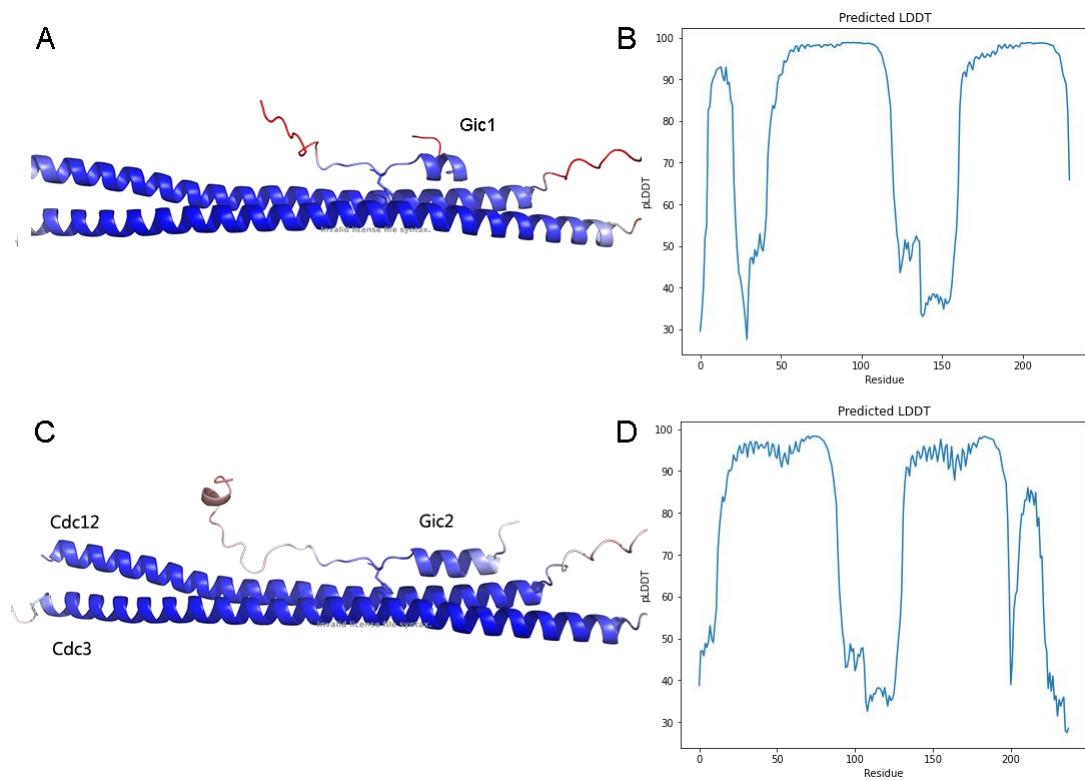


Figura 8 – Modelos e gráficos de LDDT por resíduo de Gic1-BD3 (A e B) e Gic2-BD3 (C e D). As estruturas estão coloridas conforme o LDDT (vermelho = 0, branco = 50, azul = 100).

Fonte: Elaborada pelo autor.

ao *coiled-coil* e uma queda na confiança da modelagem, sugerindo uma interação reduzida (Figura 9).

3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

A seleção dos tampões se deu a princípio comparando os espectros de CD a 4°C para os tampões A e B com o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12 nativo (Figura 10). Em tampão B, o sinal

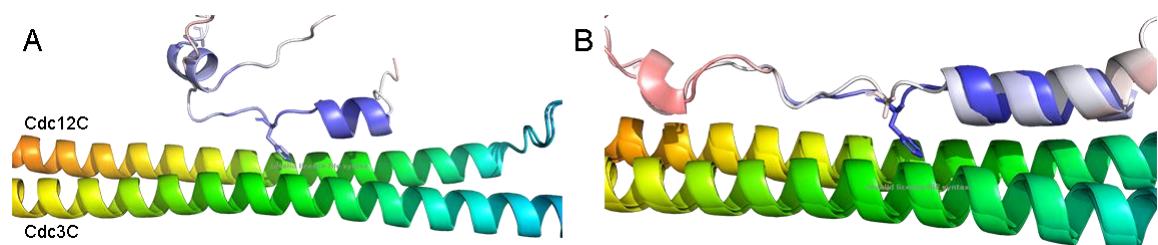


Figura 9 – Comparação entre os modelos de Gic1-BD3 (A) e Gic2-BD3 (B) nativas com o resíduo de Phe mutado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

de CD foi reduzido, provavelmente devido ao seu pH mais ácido desestabilizar as amostras. Desta forma, o tampão A2, feito a partir das condições do tampão A, mas com menos glicerol, no intuito de favorecer interações entre as proteínas do sistema, foi escolhido para os demais experimentos.

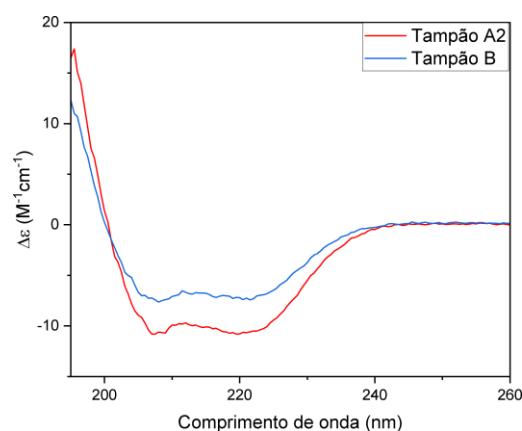


Figura 10 – Espectro de CD normalizado para Cdc3C+Cdc12C em tampão A2 e tampão B. Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos dois tampões obtiveram-se curvas apresentando uma transição entre um estado enovelado para um desenovelado, típico de uma desnaturação térmica. No caso de uma amostra mais estável, a temperatura de desnaturação é mais elevada. Esse fenômeno foi utilizado no trabalho para avaliar a formação de complexos entre peptídeos interagentes.

3.3.1 Heterodimerização dos C-terminais

Foram conduzidos experimentos com cada espécie de septina separadamente, a 10 μ M. Quando isolada, a Cdc3C tem somente uma leve tendência a formar dímeros, o que é indicado pelo espectro de varredura (Figura 11), que possui baixa razão 222/208 nm, igual a 0,92 (que deve ser maior ou igual a 1 no caso de *coiled-coils*).²⁰

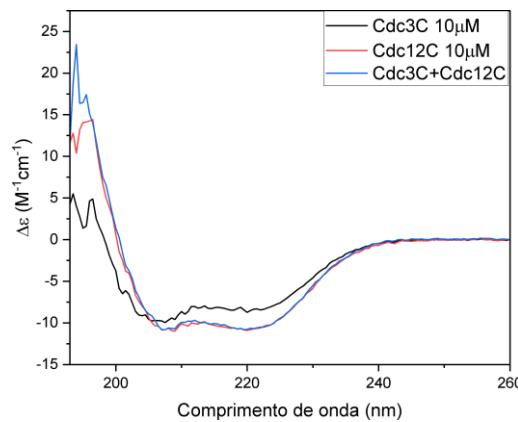


Figura 11 – Espectro de CD normalizado de Cdc3C e Cdc12C isoladas e juntas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A curva de desnaturação térmica de Cdc3C indica uma amostra pouco estável pela ausência de platô inicial e pela ampla faixa de transição. No caso de Cdc12C isolada e da mostura equimolar das septinas as curvas possuem dois platôs bem definidos (Figura 12).

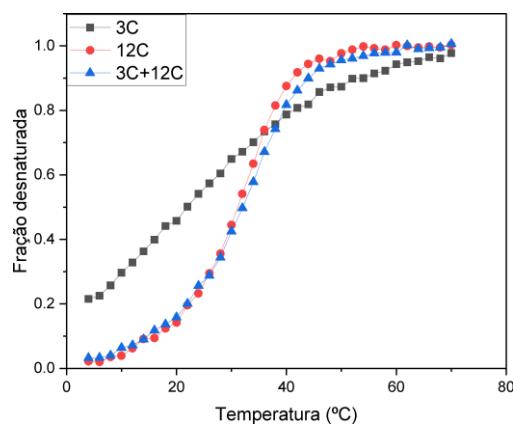


Figura 12 – Comparaçao das curvas de desnaturação de Cdc3C e Cdc12C isoladas (*coiled-coil* homodiméricos) com estas espécies juntas (*coiled-coil* heterodimérico).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi calculada uma curva teórica para uma mistura de *coiled-coils* de Cdc3 e

Cdc12 a partir de suas transições quando isoladas para comparar com o experimento com o *coiled-coil* heterodímerico (Figura 13), observando-se um aumento de Tm de $2,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$. Apesar do pequeno aumento, o espectro da mistura é compatível com um heterodímero, pois tem razão 222/208 nm de 0,98 a 4°C .

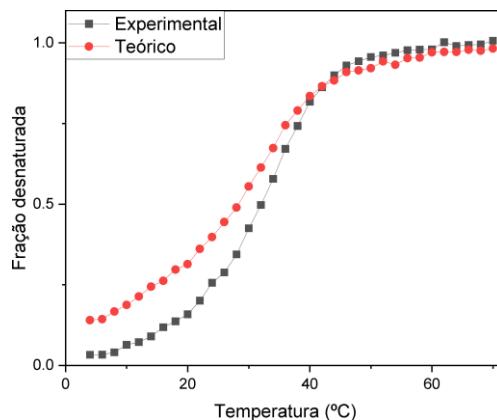


Figura 13 – Comparação entre a curva de desnaturação experimentalmente obtida para Cdc3C+Cdc12C e uma curva teórica calculada a partir das curvas de desnaturação de Cdc3C e Cdc12C individuais, assumindo a não-interação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.2 Interação com Gic

Após a análise dos *coiled-coil*, introduziu-se as Gic-BD3 nos ensaios. O complexo com Gic2- BD3 apresentou aumento significativo de Tm (igual a $2,0 \pm 0,7^\circ\text{C}$), enquanto que o complexo de Cdc3C+Cdc12C+Gic1-BD3 não apresentou aumento de Tm significativo (Figura 14). Esse resultado foi, de certa forma, antecipado pelo modelo de AlphaFold, que indicava uma região de interação reduzida em Gic1-BD3. Por estas razões, nos demais experimentos apenas a Gic2-BD3 foi utilizada.

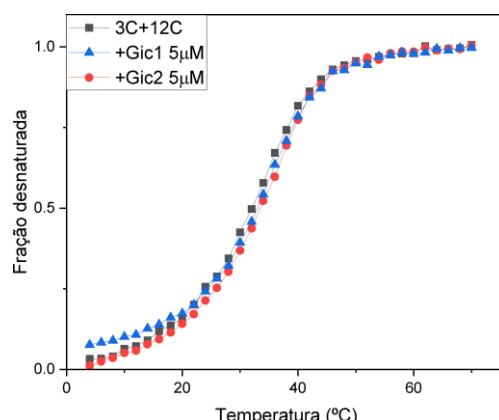


Figura 14 – Curvas de desnaturação de Cdc3C+Cdc12C sozinhas em amostra e na presença de Gic1-BD3 e Gic2-BD3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para reiterar a especificidade da Gic2-BD3 pelo *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12, comparou-se a Tm das amostras de Cdc3C e Cdc12C individualizadas na presença e ausência de Gic2-BD3 (Figura 15).

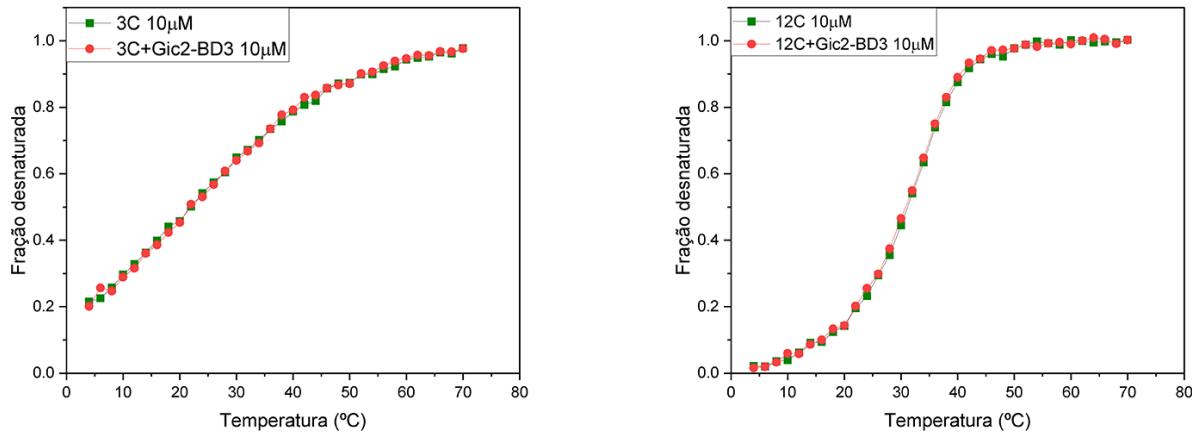


Figura 15 – Curvas de desnaturação de Cdc3C homodimérica com e sem Gic2-BD3 (esquerda) e a mesma comparação para apenas Cdc12C (direita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Verificou-se que a presença de Gic2-BD3 não aumenta a Tm significativamente quando apenas uma espécie de C-terminal de septina está presente na amostra, contrariamente ao que observou-se para o *coiled-coil* heterodimérico.

Aumentando a concentração de Gic2-BD3 para 10 μM (razão molar de 1:1:2), não foi visto um aumento significativo ainda maior de Tm (variação de $1,7 \pm 0,7$ $^{\circ}\text{C}$, Figura 16), indicando que a estequiometria é muito próxima de 1:1:1, ou seja, uma molécula de Gic2-BD3 liga-se ao *coiled-coil* heterodimérico.

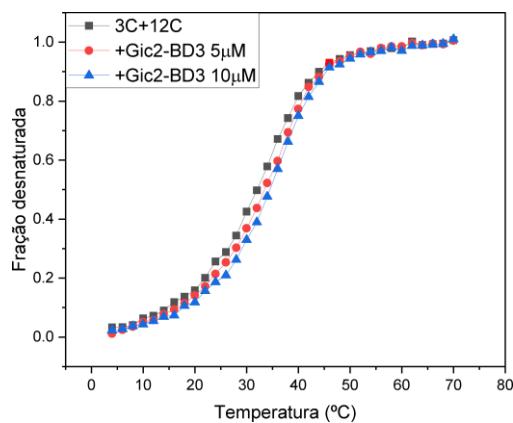


Figura 16 – Comparação entre amostras contendo Cdc3C-Cdc12C na presença de Gic2-BD3 na concentração de 5 μM , 10 μM e ausente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.3 Mutação no domínio BD3

Concluindo o estudo da interação da Gic2-BD3 com o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12 foi feita uma mutação sítio-dirigida na região FPT da Gic2, trocando o resíduo de Phe304 por uma Ala, com o propósito de barrar a interação entre Gic2 e o *coiled-coil*, tendo em vista a hipótese de que esta região do peptídeo seria responsável por estabelecer e estabilizar o complexo.

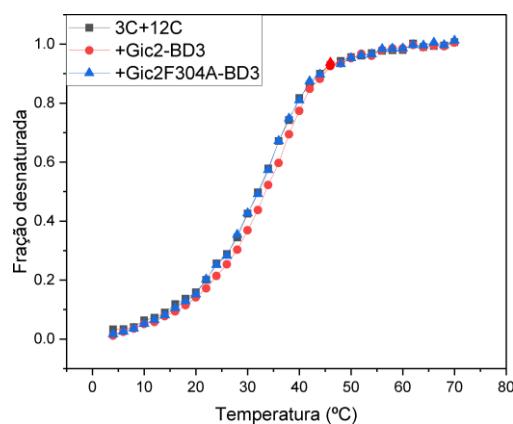


Figura 17 – Curvas de desnaturação do complexo *coiled-coil*+Gic2-BD3 nativa e Gic2F304A. Fonte: Elaborada pelo autor.

A mistura do *coiled-coil* com Gic2F304A-BD3 não mostrou alteração da Tm quando comparada com *coiled-coil* apenas (Figura 17), validando a hipótese feita, na medida que o resíduo de Ala deveria ser uma mutação que não produzisse outro tipo de interação ou uma equivalente ao resíduo original com o *coiled-coil*. Conclui-se que a região FPT da Gic2, sobretudo o resíduo de Phe304, é necessário para que o peptídeo ligue-se ao C-terminal de septinas Cdc3-Cdc12.

Os valores de Tm obtidos estão organizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Tm calculada das amostras e variações relevantes.

Amostra comparativa→		3C 10 μM	12C 10 μ	3C + 12C 5+5 μM	3C +12C +Gic2-BD3 5+5+5 μM
Amostra	Tm (°C)	20,3 ± 0,7	33,3 ± 0,4	34,8 ± 0,4	36,8 ± 0,3
3C 10 μM	20,3 ± 0,7	-			
12C 10 μM	33,3 ± 0,4		-		
3C +Gic2-BD3 10+10 μM	20 ± 1	0 ± 2			
12C +Gic2-BD3 10+10 μM	33,6 ± 0,4		0,3 ± 0,8		
3C+12C 5+5 μM	34,8 ± 0,4			(2,0 ± 0,8)*	
3C+12C +Gic1-BD3 5+5+5 μM	35,2 ± 0,3			0,4 ± 0,7	
3C+12C +Gic2-BD3 5+5+5 μM	36,8 ± 0,3			2,0 ± 0,7	-
3C+12C +Gic2-BD3 5+5+10 μM	36,5 ± 0,3			1,7 ± 0,7	-0,3 ± 0,6
3C+12C +Gic2F304A-BD3 5+5+10 μM	35,4 ± 0,4			0,6 ± 0,8	-1,4 ± 0,7

Tm calculadas para todas as amostras analisadas em tampão A2, e a variação de Tm entre algumas amostras de referência. *Diferença de Tm entre experimental e teórica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4 Conclusões e considerações finais

Neste trabalho estudou-se a interação entre a região BD3 das proteínas Gic1 e Gic2 com o *coiled-coil* estabelecido pelos domínios terminais de septinas Cdc3 e Cdc12 de leveduras, observando que a Gic2-BD3 provoca um aumento na temperatura de *melting* do *coiled-coil*. O resíduo de Phe304 da região FPT foi visto como essencial para estabelecer tal interação. Desta forma, mostramos que a Gic2-BD3 de fato interage de forma análoga às BORG's humanas, mas não foi possível mostrar o mesmo para sua homóloga Gic1-BD3. A interação de Gic2-BD3 com o *coiled-coil* heterodimérico de septinas de levedura é um resultado inédito, contrapondo-se ao que foi observado por Sadian *et al.* para a interação entre Cdc10 e Gic1, sua homóloga. Uma hipótese que explicaria ambos os resultados experimentais seria a de que as Gic's interagem com diferentes subunidades de Cdcs, podendo assim, a princípio, ter a capacidade de distinguir entre Cdcs livres de Cdcs polimerizadas. Isso seria útil num possível mecanismo de regulação de estruturas de septinas mediado por Gic's.

Em estudos futuros pretende-se explorar mutações sítio-dirigidas em Cdc3C e Cdc12C e avaliar seus impactos na interação com os peptídeos Gic-BD3. Complementarmente, para fins de completeza, pode-se estudar também a interação de Gic-BD3 com as septinas completas e/ou com os domínios C-terminais de outras septinas de levedura (Cdc10, Cdc11 e Shs1).

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Journal of Molecular Biology*, v. 59, n. 1, p. 183–194, 1971.
- 2 MOMANY, M.; PAN, F.; MALMBERG, R. L. Evolution and conserved domains of theseptins. In: HALL, P. A.; HILARY RUSSELL, S. E.; PRINGLE, J. R.(ed.). *The Septins*. Hoboken: Wiley, 2008. p. 35–45.
- 3 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *NatureReviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012.
- 4 PETERSON, E.; PETTY, E. Conquering the complex world of human septins: implicationsfor health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n. 6, p. 511–524, 2010.
- 5 LI, H. *et al.* Zika virus protease cleavage of host protein septin-2 mediates mitotic defects inneural progenitors. *Neuron*, v. 101, n. 6, 2019.
- 6 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p.491–496, 2003.
- 7 CAVINI, I. A. *et al.* The structural biology of septins and their filaments: an update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 765085, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.765085.
- 8 SHUMAN, B.; MOMANY, M. Septins from protists to people. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 824850, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2021.824850.
- 9 MARQUES, I. A. *Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas*. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 10 LUPAS, A. N.; BASSLER, J. Coiled coils – a model system for the 21st century. *Trends inBiochemical Sciences*, v. 42, n. 2, p. 130–140, 2017.
- 11 LEONARDO, D. A. *et al.* Orientational ambiguity in septin coiled coils and its structuralbasis. *Journal of Molecular Biology*, v. 433, n. 9, p. 166889, 2021.
- 12 IWASE, M. *et al.* Role of a cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to thepresumptive bud site. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 3, p. 1110–1125, 2006.
- 13 GERARD, J.; PERLUNGHER, R. R.; MACARA, I. G. The borgs, a new family of cdc42 and tc10 gtpase-interacting proteins. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, n. 10, p. 6585–6597,1999.
- 14 SHEFFIELD, P. J. *et al.* Borg/septin interactions and the assembly of mammalian

- septin heterodimers, trimers, and filaments. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 5, p. 3483–3488, 2003.
- 15 SADIAN, Y. *et al.* The role of cdc42 and gic1 in the regulation of septin filament formationand dissociation. *eLife*, v. 2, 2013.
- 16 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *Nature*,v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- 17 MIRDITA, M. *et al.* Colabfold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*,v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.
- 18 SALA, F. A. *et al.* Heterotypic coiled-coil formation is essential for the correct assembly ofthe septin heterofilament. *Biophysical Journal*, v. 111, n. 12, p. 2608–2619, 2016.
- 19 LEES, J. *et al.* Cdtool—an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004.
- 20 COOPER, T. M.; WOODY, R. W. The effect of conformation on the cd of interacting helices:A theoretical study of tropomyosin. *Biopolymers*, v. 30, n. 7-8, p. 657–676, 1990.