

Título em Português:	Estudo da interação do coiled-coil de septinas Cdc3-Cdc12 com peptídeos de proteínas Gic
Título em Inglês:	study of septin cdc3-cdc12 coiled-coil interaction with gic protein peptides
Autor:	Pedro Masotti Moretti da Silveira
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Ana Paula Ulian de Araujo
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	CNPq - PIBIC

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

Pedro Masotti Moretti da Silveira¹

Ítalo Augusto Cavini¹

Ana Paula Ulian de Araújo¹

¹Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo

pmasotti@usp.br

Objetivos

Septinas são proteínas citoesqueléticas que formam heteroligômeros lineares e interagem com diversas outras proteínas. [1] Em humanos, as Borg, efetoras de Cdc42, interagem com oligômeros de septinas aumentando a estabilidade do *coiled-coil*. [2,3] Empregou-se espectroscopia de dicroísmo circular para verificar uma interação de mesmo tipo com análogos dessas proteínas em *S.cerevisiae* Gic1/Gic2, obtendo um aumento significativo da estabilidade do *coiled-coil* das septinas Cdc3 e Cdc12. Neste trabalho buscou-se verificar a interação entre Gic1 e Gic2 com os domínios C-terminais das septinas Cdc3 e Cdc12 de *S.cerevisiae*.

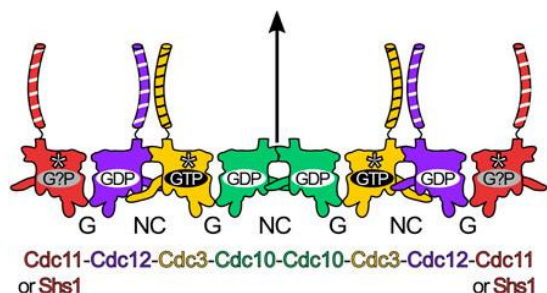


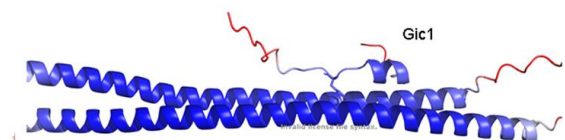
Figura 1: Esquemática da estrutura do octâmero de septinas em *S. cerevisiae*, com a sequência de subunidades indicada abaixo. As letras G e NC denotam a interface de interação entre subunidades adjacentes.

Métodos e Procedimentos

Empregou-se a modelagem por *AlphaFold2* (AF2) para identificar a possível região de interação entre o domínio C-terminal das septinas Cdc3 e Cdc12 (chamadas de Cdc3C e Cdc12C) e peptídeos Gic com seu domínio semelhante ao BD3 de Borg's. Experimentos de espectroscopia por dicroísmo circular (CD) foram empregados para análise comparativa da temperatura de *melting* (T_m) de diferentes ensaios contendo Cdc3 e Cdc12 a 5 μ M por meio da curva de desnaturação térmica como função da elipticidade. [3] Ensaios com mutação pontual do peptídeo Gic2-BD3 foram feitos para verificar o modelo de interação.

Resultados

Os modelos gerados por AF2 indicaram uma proximidade entre o domínio BD3 e o interior do *coiled-coil* numa região de resíduos FPS/FPT (em Gic1 e Gic2, respectivamente). O resíduo Phe304 foi visto inserido na cavidade do *coiled-coil*.



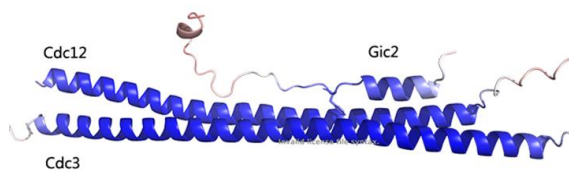


Figura 2: Modelos em *AlphaFold2* da interação entre Cdc3C-Cdc12C e Gic1-BD3 (A) e Gic2-BD3 (B), com cores seguindo a métrica de pLDDT, em escala crescente de vermelho-branco-azul.

A mutação em Gic2-BD3 F304A apresentou Tm igual ao ensaio de Cdc12C+Cdc3C ($0,6 \pm 0,8$ °C de diferença).

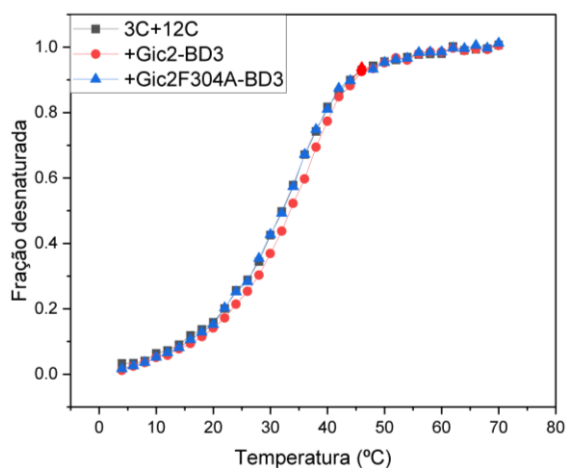


Figura 3: Fração desnaturada de proteínas no ensaio de desnaturação térmica em função da temperatura, para os ensaios Cdc3C-Cdc12C sozinhas (cinza); na presença de Gic2-BD3 (vermelho) e com Gic2-BD3 com a mutação F304A (azul).

Conclusões

A interação entre o domínio BD3 de Gic2 e o *coiled-coil* de Cdc3-Cdc12 aumenta sua estabilidade, de forma análoga ao que acontece no complexo em humanos, sendo que o resíduo de F304 é essencial para tal, portanto, o modelo de interação proposto foi validado.

Agradecimentos



Processo

135003/2022-9

Referências

- [1] CAVINI, I. A. *et al.* The structural biology of septins and their filaments: an update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 765085-1-765085-52, nov. 2021.; [2] 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; [3] CASTRO, D. K. S. V. *et al.* Dissecting the Binding Interface of the Septin Polymerization Enhancer Borg BD3. *J Mol Biol.* 2023 Jul 1;435(13):168132.

Study of septin Cdc3-Cdc12 *coiled-coil* interaction with Gic protein peptides

Pedro Masotti Moretti da Silveira¹

Ítalo Augusto Cavini¹

Ana Paula Ulian de Araújo¹

¹São Carlos Institute of Physics/University of São Paulo

pmasotti@usp.br

Objectives

Septins are cytoskeletal proteins able to form linear hetero-oligomers that interact with many other proteins. [1] In humans, Borg proteins, which are Cdc42 effectors, interact with septin oligomers increasing their *coiled-coil* stability. [2,3] Circular dichroism spectroscopy was used to verify a similar interaction between the analogues of these proteins in *S. cerevisiae* Gic1/Gic2, obtaining a significative increase in the septins Cdc3-Cdc12 *coiled-coil*. In this work we looked into an interaction between Gic1 and Gic2 with the C-terminal domains of *S. cerevisiae* septins Cdc3 and Cdc12.

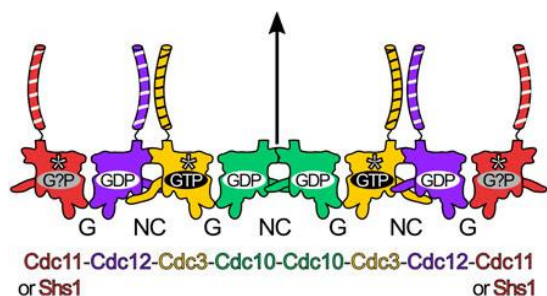


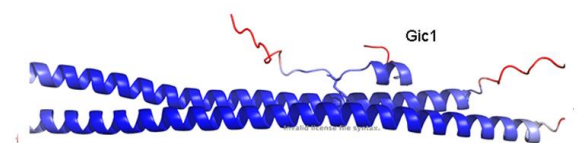
Figure 1: Scheme of the structure of the septin octamer in *S. cerevisiae*, with the subunit sequence indicated below. The letters G and NC refer to the interface of interaction between adjacent subunits.

Methods and Procedures

AlphaFold2 (AF2) was used to identify the potential region of interaction between the C-terminal domain of septins Cdc3 and Cdc12 (namely Cdc3C and Cdc12C) and Gic BD3-like domain peptides. Circular dichroism (CD) spectroscopy experiments were employed for comparative analysis of the melting temperature (T_m) of different assays containing Cdc3 and Cdc12 at 5 μ M, using its thermal denaturation curve as a function of ellipticity. [3] Assays with a point mutation on Gic2-BD3 peptide were made to verify the model of interaction.

Results

The AF2 generated models indicate a proximity between the BD3 domain and the coiled-coil core in a region formed by the residues FPS/FPT (in Gic1 and Gic2, respectively). The Phe304 residue were seen buried in the coiled-coil cavity.



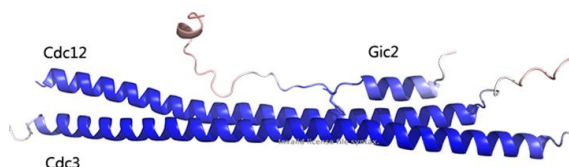


Figure 2: AlphaFold2 models of the Cdc3C-Cdc12C interaction with Gic1-BD3 (A) and Gic2-BD3 (B), with colors following the pLDDT value in growing order from red to white to blue.

The Gic-BD3 F304A mutation shown the same T_m as the Cdc3C+Cdc12C assay ($0,6 \pm 0,8$ °C difference).

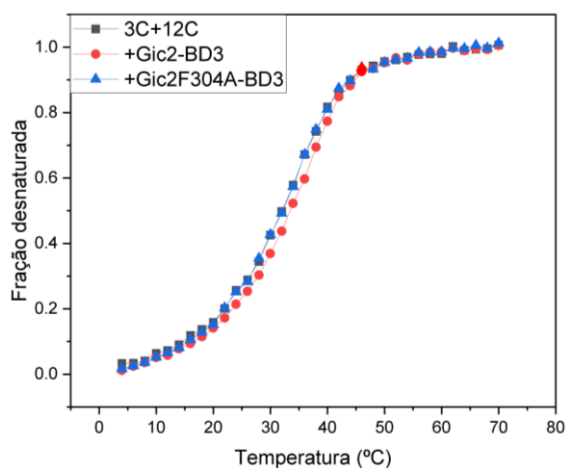


Figure 3: Denatured fraction of proteins in the thermal denaturation assay as a function of temperature for the assays Cdc3C-Cdc12C alone (grey); in presence of Gic2BD3 (red); and with Gic2-BD3 with F304A mutation (blue).

Conclusions

The interaction between Gic2 BD3 domain and Cdc3-Cdc12 coiled-coil increases its stability, in an analogous way as its occurs in the human complex. The F304 residue is essential for this interaction, thus, the proposed model of interaction was validated.

Acknowledgements



Processo

135003/2022-9

References

- [1] CAVINI, I. A. et al. *The structural biology of septins and their filaments: an update. Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 765085-1-765085-52, nov. 2021.;
- [2] 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;
- [3] CASTRO, D. K. S. V. et al. *Dissecting the Binding Interface of the Septin Polymerization Enhancer Borg BD3. J Mol Biol.* 2023 Jul 1;435(13):168132.