

Trabalho

Título em Português: Análise da interface SEPT9-SEPT9 em septinas humanas

Título em Inglês: Analysis of the SEPT9-SEPT9 interface in human septins

Autor: Caio Augusto Rits

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

Análise da interface SEPT9-SEPT9 em septinas humanas

Caio Augusto Rits

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Prof.Dr. Richard Charles Garratt

Universidade de São Paulo

Caioaugusto5678@usp.br

Objetivos

Produzir mutantes de da septina 9 (SEPT9), cujas mutações estão envolvidas na estabilidade da interface NC. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Avaliar a formação do homodímero nativo de SEPT9-SEPT9 e sua estabilidade utilizando técnicas biofísicas;
- Caracterizar os mutantes pontuais (com relação à formação da interface NC e estabilidade), a fim de avaliar a importância de resíduos específicos;
- Realizar ensaios de cristalização para as construções obtidas, variando a presença e o tipo de nucleotídeo ligado, visando determinar e analisar as estruturas.

Métodos e Procedimentos

Clonagem

As sequências codificantes das septinas estavam, em sua maioria, disponíveis no banco de plasmídeos do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural. Todos os procedimentos para clonagens e manipulação de DNA em geral foram conduzidos de acordo com as técnicas padrão, descritas em Sambrook *et al.*, 2001. Inicialmente, as construções das sequências

de interesse envolvendo a SEPT9, as construções truncadas (SEPT9HLA0GC) e os mutantes foram obtidas utilizando o método de *Gibson assembly* (Gibson, 2011).

Produção das Proteínas

As proteínas de interesse foram expressas em células de *E. coli* Rosetta (DE3). Resumidamente, o crescimento da cultura em meio seletivo monitorado e, no início da fase log de crescimento foi adicionado o agente indutor (IPTG) nas culturas. Após o tempo de incubação, as células foram coletadas por centrifugação e lisadas por ultrassonicação. As frações de proteínas solúveis e insolúveis foram separadas por nova etapa de centrifugação, sendo a fração solúvel submetida à cromatografia de afinidade (Ni-NTA). A seguir, as amostras eluídas contendo as proteínas de interesse foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200). Todo o procedimento de purificação e o grau de pureza das amostras foram monitorados por SDS-PAGE.

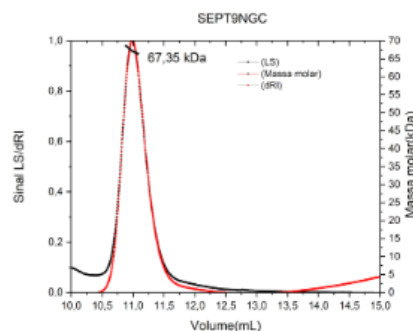
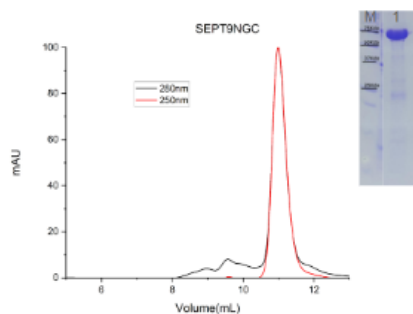
Análise de estado oligomérico

Dado que a formação da interface NC SEPT9-SEPT9 leva à formação de dímeros, experimentos de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a múltiplos ângulos (SEC-MALS) (aparato Wyatt;

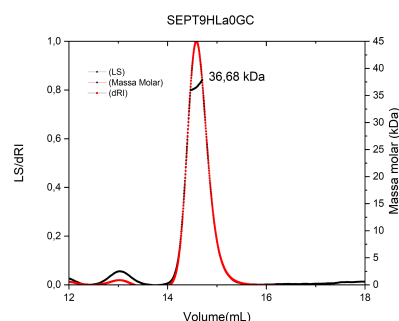
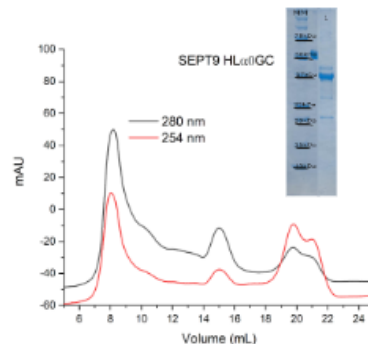
mini DAWN-TREOS e Optilab T-rEX) foram conduzidos para analisar a composição dos oligômeros presentes em cada amostra (nativa ou mutante) a fim de avaliar a dependência da condição de formação da interface NC com as mutações e a estabilidade dos homodímeros formados. Um tampão de corrida com alta concentração de sal, (tipicamente igual a 300 mM NaCl), foi empregado para favorecer a formação da interface.

Resultados

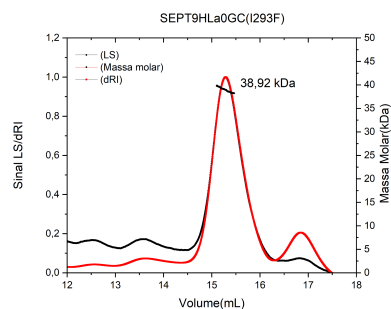
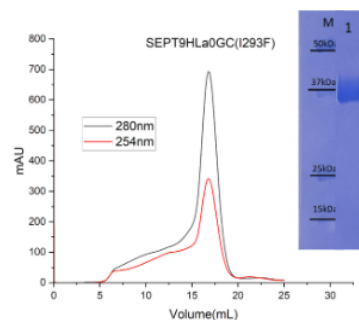
Seguem os principais resultados obtidos durante a fase experimental do trabalho desenvolvido:



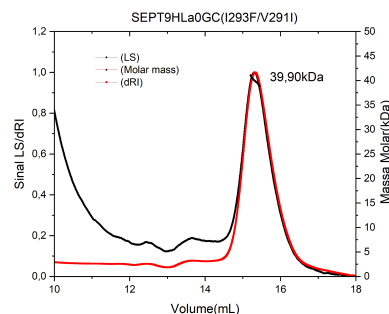
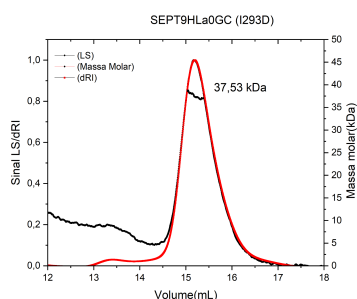
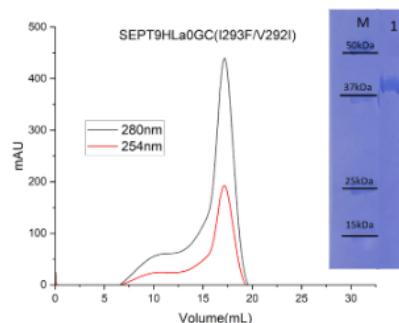
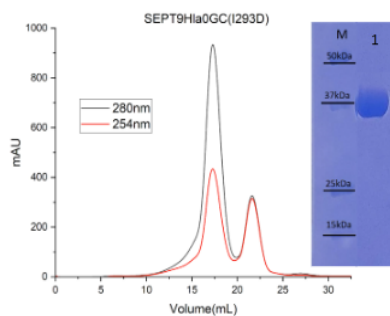
(A)



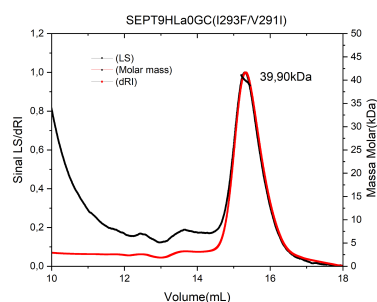
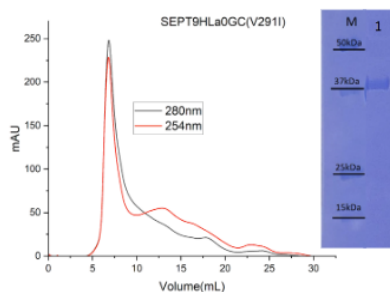
(B)



(C)



(D)



(E)

(F)

FIGURA 1: Cromatografia de exclusão molecular em *Superdex 200 10/300 GL* e avaliação da pureza por SDS-PAGE. Inseto mostrando (M) Padrão de massa molecular e (1) fração com maior pico de eluição. Análise do estado oligomérico via SEC-MALS (Imagem abaixo), sendo (A) SEPT9; (B) SEPT9HLA0GC; (C) Mutante I293F; (D) Mutante I293D; (E) Mutante V291I; (F) Duplo Mutante I293F/V291I.

Conclusões

Destaca-se o caráter monomérico das amostras, tanto para a sequência nativa (SEPT9) quanto para a construção truncada (SEPT9HLA0GC) e as construções mutantes com a exceção do mutante V291I, cujos resultados foram inconclusivos. A partir da análise dos resultados de SEC-MALS (Fig.1), foi confirmada a hipótese de conformação monomérica para todas as amostras. Para a

construção nativa (SEPT9) foi obtida uma massa de 67,35 kDa, compatível com o monômero. Para a construção truncada (SEPT9HLA0GC), com massa de 36,68 kDa e, e para os mutantes, exibindo a massa média de 38,78 kDa, também confirmaram o estado monomérico. Estes resultados mostram discrepância inferior a 1% comparado com os valores calculados a partir das sequências das amostras envolvidas.

A consequência prática da inexistência de dímeros foi que em nenhuma das situações houve formação da interface NC esperada, impedindo assim a avaliação das mutações em resíduos chave nesta interface. Lembrando que nos octâmeros de septinas humanas, a proteína SEPT9 interage com outra SEPT9 através de uma interface NC no centro do oligômero, esperava-se que a interface também ocorresse para a proteína SEPT9 isolada. Porém, homodímeros não foram observados nos experimentos descritos, nem mesmo quando utilizando a proteína nativa completa. Portanto, foi levantada a hipótese de que para a correta formação da interface NC SEPT9-SEPT9 in vitro, deve estar faltando algum elemento, provavelmente ter a outra interface (G) de SEPT9 formada. Sabemos hoje que as interfaces NC e G têm uma comunicação (Mendonça et al., 2024) e o próximo passo será testar se a inclusão da SEPT7 nos experimentos poderá alterar os estados oligoméricos já verificados.

Agradecimentos

Meus agradecimentos a toda equipe de técnicos do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural (BBE) “Sérgio Mascarenhas”, em especial à Dra. Andressa Patricia Alves Pinto pela paciência e auxílio com os experimentos e ensinamentos.

Meus agradecimentos ao Dr. Italo Augusto Cavini pela ajuda com o projeto, ensinamentos e técnicas laboratoriais.

Meus agradecimentos aos meus orientadores Prof.Dra. Ana Paula Ulian de Araújo e Prof. Dr.

Richard Charles Garratt pela orientação, confiança e ensinamentos.

Referências

- Gibson, D. G. (2011). “Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments,” in *Methods in Enzymology* (Elsevier), 349–361. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- Sambrook, J, Fritish, E. F., Maniatis, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Mendonça, D.C. et al. Structural Insights into *Ciona intestinalis* Septins: Complexes Suggest a Mechanism for Nucleotide-dependent Interfacial Cross-talk. J. Mol. Biol. Volume 436, Issue 16, 15 August 2024, 168693.

Analysis of the SEPT9-SEPT9 interface in humans septins

Caio Augusto Rits

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Prof.Dr. Richard Charles Garratt

University of São Paulo

Caioaugusto5678@usp.br

Objectives

To produce mutants of septin 9 (SEPT9) whose mutations are involved in the stability of the NC interface. The following specific objectives were outlined:

- Assess the formation and stability of the native SEPT9-SEPT9 homodimer using biophysical techniques;
- Characterize point mutants (with respect to the formation of the NC interface and stability) in order to evaluate the importance of specific residues;
- Conduct crystallization assays for the obtained constructs, varying the presence and type of bound nucleotide, with the aim of determining and analyzing the structures.

Materials and Methods

Cloning

The coding sequences of the septins were, for the most part, available in the plasmid repository of the Biophysics and Structural Biology Group. All procedures for cloning and general DNA manipulation were conducted according to standard techniques, as described in Sambrook et al., 2001. Initially, constructs of the sequences of interest involving SEPT9, truncated constructs (SEPT9HLA0GC), and

mutants were obtained using the Gibson assembly method (Gibson, 2011).

Protein production

The proteins of interest were expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. Briefly, the culture growth in selective medium was monitored, and at the beginning of the logarithmic growth phase, the inducer (IPTG) was added to the cultures. After the incubation period, the cells were collected by centrifugation and lysed by sonication. The soluble and insoluble protein fractions were separated by an additional centrifugation step, with the soluble fraction being subjected to affinity chromatography (Ni-NTA). Subsequently, the eluate samples containing the proteins of interest were further purified using size-exclusion chromatography (Superdex 200). The entire purification process and the purity of the samples were monitored by SDS-PAGE.

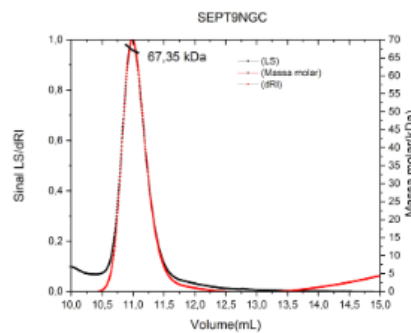
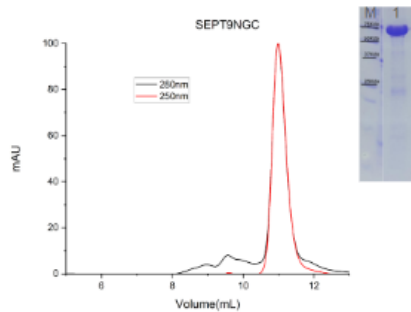
Oligomeric State Analysis

Given that the formation of the SEPT9-SEPT9 NC interface leads to the formation of dimers, experiments using size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) (Wyatt apparatus; mini DAWN-TREOS and Optilab T-rEX) were conducted to analyze the composition of the oligomers present in each sample (native or mutant) in order to evaluate the dependence of

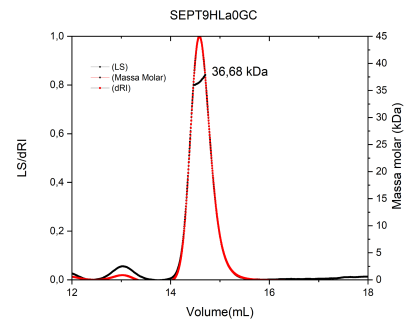
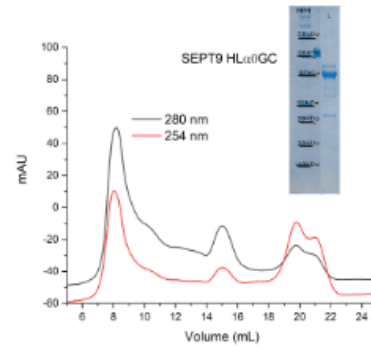
NC interface formation conditions on mutations and the stability of the formed homodimers. A running buffer with high salt concentration (typically 300 mM NaCl) was employed to promote the formation of the interface.

Results

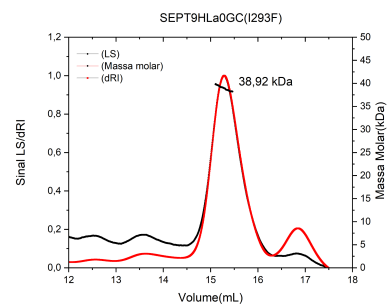
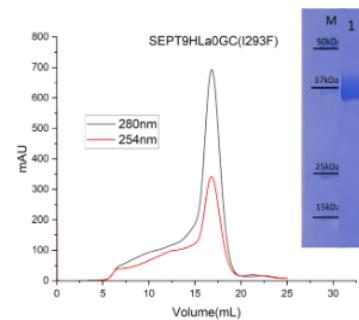
The following are the main results obtained during the experimental phase of the work conducted:



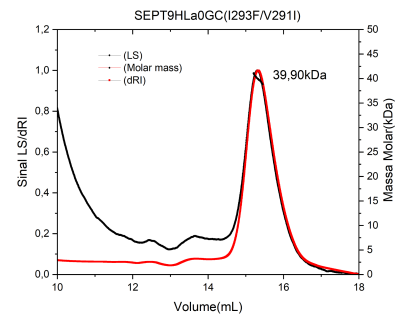
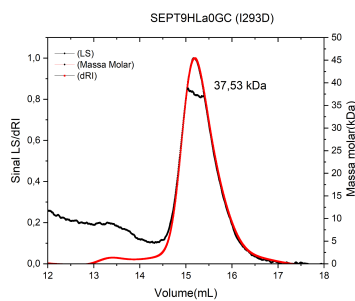
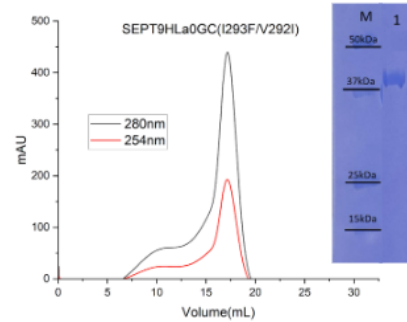
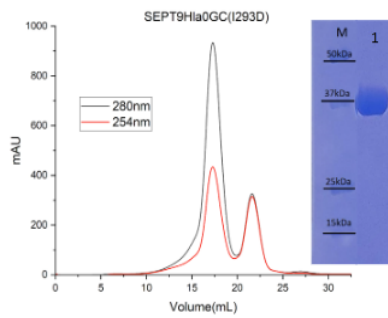
(A)



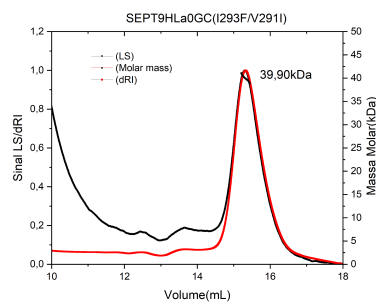
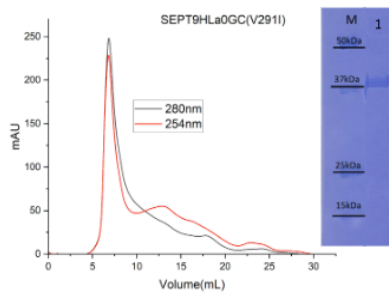
(B)



(C)



(D)



(E)

(F)

FIGURE 1: Size-exclusion chromatography on Superdex 200 10/300 GL and purity assessment by SDS-PAGE. Insert showing (M) Molecular weight marker and (1) fraction with the highest elution peak. Analysis of the oligomeric state via SEC-MALS (image below), with (A) SEPT9; (B) SEPT9HLa0GC; (C) Mutant I293F; (D) Mutant I293D; (E) Mutant V291I; (F) Double Mutant I293F/V291I.

Conclusions

The monomeric nature of the samples was evident for both the native sequence (SEPT9) and the truncated construct (SEPT9HLa0GC), as well as for the mutant constructs, with the exception of the V291I mutant, for which results were inconclusive. Analysis of the SEC-MALS

results (Fig. 1) confirmed the monomeric conformation hypothesis for all samples. The native construct (SEPT9) showed a mass of 67.35 kDa, consistent with the monomer. The truncated construct (SEPT9HLA0GC) exhibited a mass of 36.68 kDa, and the mutants, with an average mass of 38.78 kDa, also confirmed the monomeric state. These results show a discrepancy of less than 1% compared to the values calculated from the sample sequences.

The practical consequence of the absence of dimers was that no NC interface formation was observed in any of the conditions. It is noted that in human septin octamers, the SEPT9 protein forms this native NC interface at the center of the oligomer, which would also be expected for isolated SEPT9 protein. However, homodimers were not observed in the described experiments, even with the full native protein. Therefore, the hypothesis is that some additional element may be missing for the correct formation of the SEPT9-SEPT9 NC interface, likely requiring the formation of the other interface (G). It is now known that the NC and G interfaces communicate (Mendonça et al., 2024), and the next step will be to test whether the inclusion of SEPT7 in the experiments could alter the oligomeric states already observed.

Acknowledgements

I extend my gratitude to the entire technical team of the Biophysics and Structural Biology Group (BBE) "Sérgio Mascarenhas," especially to Dr. Andressa Patricia Alves Pinto for her patience, assistance with the experiments, and guidance.

I also wish to thank Dr. Italo Augusto Cavini for his help with the project, as well as for his instruction and laboratory techniques.

My sincere appreciation goes to my advisors, Prof. Dr. Ana Paula Ulian de Araújo and Prof. Dr. Richard Charles Garratt, for their guidance, trust, and instruction.

References

- Gibson, D. G. (2011). "Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments," in *Methods in Enzymology* (Elsevier), 349–361. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- Sambrook, J, Fritish, E. F., Maniatis, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Mendonça, D.C. et al. Structural Insights into *Ciona intestinalis* Septins: Complexes Suggest a Mechanism for Nucleotide-dependent Interfacial Cross-talk. J. Mol. Biol. Volume 436, Issue 16, 15 August 2024, 168693.