

PRODUÇÃO DE COMPLEXOS DE SEPTINAS DE *CIONA INTESTINALIS*

Heitor Strozi

Ana Paula Ulian de Araujo

Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

heitor.strozi@usp.br

Objetivos

Co-expressar e co-purificar as construções de septinas de *Ciona intestinalis* (*Ci*SEPT2/6/7, *Ci*SEPT6/7/9 e *Ci*SEPT2/6/7/9), visando o estudo estrutural dos complexos formados e analisar o estado oligomérico dos heterocomplexos de septinas por SEC-MALS.

Métodos e Procedimentos

As construções para cada septina de *C. intestinalis* idealizadas durante o doutoramento da Sinara T. do Brasil Morais foram combinadas de formas diferentes para transformar células de *E. coli* da linhagem Rosetta (DE3) para a produção dos complexos. A co-expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 0,4mM de IPTG, sendo as células incubadas a 18°C durante 18hs. Em seguida, realizou-se a lise celular por sonicação. A co-purificação dos heterocomplexos foi realizada por cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de exclusão molecular. Os heterocomplexos foram analisados por SDS-PAGE a 12% após cada etapa de purificação. Na sequência, realizaram-se estudos biofísicos dos heterocomplexos 6/7/9 e 2/6/7/9 através da SEC-MALS. Também foram realizados ensaios de cristalização. Os cristais obtidos foram crioprotetidos e testados na linha I04-1, no síncrotron Diamond (Reino Unido).

Resultados

A purificação dos complexos resultou em amostras com um nível bom de pureza, aceitável para experimentos de cristalização e do estado oligomérico. O SDS-PAGE permitiu relacionar cada septina à sua respectiva banda, confirmando a expressão do complexo. Para a

SEC-MALS do complexo 2/6/7/9 foram consideradas as frações do pico 1 e 2 eluídos da coluna de superose. A partir do pico 1, identificou-se 2 massas diferentes: (~466 kDa e ~324 kDa). No pico 2, foram detectadas 2 massas novamente, um pico apresentou ~229,6 KDa ($\pm 0,024\%$) e o outro pico apresentou ~187,6 kDa ($\pm 0,025\%$). Na SEC-MALS do complexo 6/7/9 foram observadas 2 massas: ~225,2 kDa ($\pm 0,015\%$) e ~183,5 kDa ($\pm 0,032\%$). Nos ensaios de cristalização, foram obtidos cristais do complexo 2/6/7/9, os quais difrataram, mas com baixíssima resolução.

Conclusões

As estratégias de co-expressão e co-purificação se mostraram adequadas para obtenção dos complexos para ensaios de cristalização, mas a baixa resolução da difração impediu sua resolução de sua estrutura. Na análise biofísica, o heterocomplexo 6/7/9 mostrou-se mais heterogêneo, com praticamente 50% de sua fração composta por pelas septinas 7/9. Porém, o complexo *Ci*SEPT2/6/7/9 mostrou uma fração majoritária correspondente a massa esperada para um octâmero, o que permitirá a continuidade de sua caracterização.

Referências Bibliográficas

- VALADARES, N.F. et al. Septin structure and filament assembly. *Biophys Rev*, v.9, n.5, 481–500 (2017).
- KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 4, p. 491-496, Oct 2003.