

Trabalho



Título em Português:	Produção e caracterização de NtDDX35, uma helicase de tabaco envolvida em splicing
Título em Inglês:	Production and characterization of NtDDX35, a tobacco helicase involved in splicing
Autor:	Lucas Rafael Oliveira Santos Eugênio
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



PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NtDDX35, UMA HELICASE DE TABACO ENVOLVIDA EM *SPLICING*

Lucas Rafael Oliveira Santos Eugênio

Andressa Patrícia Alves Pinto

Profa. Dra. Ana Paula Ulian Araújo

Instituto de Física de São Carlos, USP

lucasrafael@usp.br

Objetivos

Os objetivos desse trabalho foram expressar e purificar NtDDX35 para estudos estruturais, avaliar seu estado oligomérico por SEC-MALS, definir o domínio helicase via AlphaFold para cristalização, e produzir SCI1 recombinante para ensaios de interação e co-cristalização.

Métodos e Procedimentos

Todos os procedimentos para clonagens, subclonagens e manipulação de DNA em geral foram conduzidos de acordo com as técnicas padrão de clonagem molecular e *Gibson assembly*¹. Modelos gerados pelo *AlphaFold*² foram usados para definir as construções parciais, envolvendo os domínios isolados de interação. Proteínas recombinantes His-SCI1 e His-NtDDX35 foram expressas em *E. coli* Rosetta 2 (DE3) cultivadas em meio LB seletivo. Após lise por sonicação em tampão de alto sal e agente redutor, a fração solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade Ni-NTA, seguida de exclusão molecular (Superdex 200 ou 75, *AKTA Purifier*). Para o complexo proteico, culturas de cada proteína foram combinadas e processadas nas mesmas condições. A pureza das amostras foi avaliada

por SDS-PAGE 12%. A estrutura secundária foi analisada por dicroísmo circular (CD) em espectropolarímetro *Jasco J-815*, com tratamento e análise dos dados pelo *CDToolX*³.

Resultados

A purificação da NtDDX35 na coluna de afinidade foi otimizada em tampão com 500 mM de NaCl, 10% glicerol e 0.5 mM de TCEP, seguida de SEC em condições ajustadas de força iônica e glicerol (Figura 1). SCI1 foi purificada em mesmo tampão, sem TCEP. O complexo NtDDX35-SCI1 foi obtido por co-purificação e confirmado por SEC-MALS.

Espectros de CD (Figura 2) indicaram predominância de α -hélices na NtDDX35 e estrutura desordenada na SCI1, em concordância com previsões *in silico*. O complexo apresentou perfil semelhante ao da NtDDX35, mas com mínimo em 222 nm mais negativo que o teórico, sugerindo possível alteração conformacional.

Foram obtidas construções truncadas da NtDDX35 (domínio helicase) e da SCI1 (região C-terminal) em vetor pSUMO, via Gibson Assembly. As construções foram confirmadas por análise de restrição e sequenciamento. Ensaios de expressão mostraram as proteínas truncadas também solúveis.

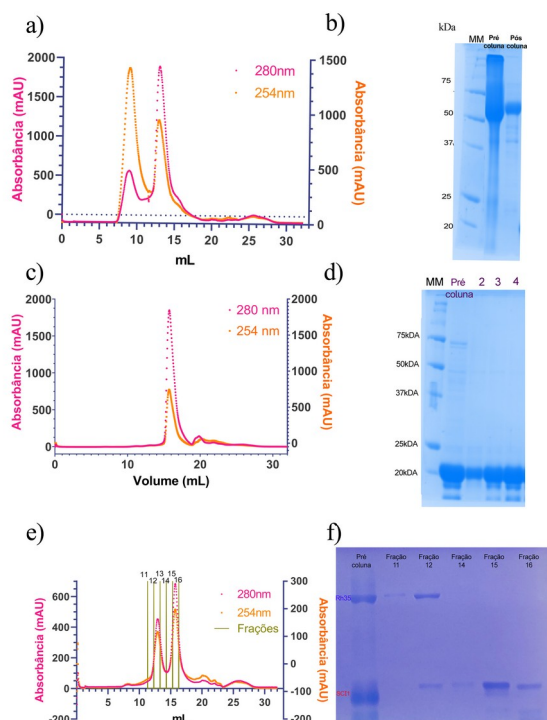


Figura 1: Cromatogramas e SDS-PAGE para NtDDX35 (a,b), SCI1 (c,d) e complexo (e,f).

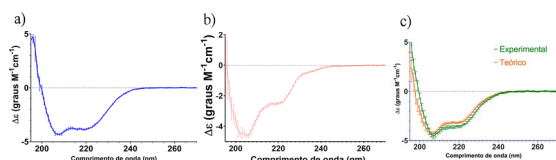


Figura 2 - Análises de CD para as proteínas. Espectro da a) NtDDX35 em uma concentração de 0,2 mg/mL, b) SCI1 em concentração de 0,23 mg/mL e c) do complexo a 0,166 mg/mL. Todas as medidas foram a 4°C, em fosfato de sódio 20 mM contendo 125 mM de NaCl, em uma cubeta de caminho óptico de 1 mm.

Conclusões

As condições de expressão de NtDDX35 e SCI1 foram otimizadas, permitindo a purificação e obtenção das proteínas, bem como do complexo. Para a SCI1, as predições *in silico* aliadas aos resultados de dicroísmo circular confirmam tratar-se de uma proteína intrinsecamente desordenada, compatível com seu papel na proliferação celular com diversos interatores.⁴ O complexo NtDDX35–SCI1 foi confirmado por SEC-MALS, e a interação mostrou-se independente da presença de nucleotídeos ou RNA, mantendo-se estável mesmo sob alta força iônica, o que indica forte interação entre as proteínas. O projeto continua em andamento atualmente para caracterizar a atividade enzimática da NtDDX35 e possíveis efeitos da SCI1, além de dar seguimento à obtenção das estruturas dos domínios de interação.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

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;
- ABRAMSON, Josh et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 2024. Springer. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- MILES, Andrew J.; WALLACE, B. A. CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, v. 27, n. 9, p. 1717-1722. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3474> ;
- PINOTI, Vitor F et al. SCI1, a flower regulator of cell proliferation, and its partners NtCDKG2 and NtRH35 interact with the splicing machinery. *Journal Of Experimental Botany*, 2024. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erae337> ;

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NtDDX35, A SPLICING-RELATED TOBACCO PROTEIN

Lucas Rafael Oliveira Santos Eugênio

Andressa Patrícia Alves Pinto

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Physics Institute of São Carlos, USP

lucasrafael@usp.br

Objectives

The objective of the present study is to express and purify NtDDX35 for structural studies, to evaluate its oligomeric state by SEC-MALS, to define the helicase domain via AlphaFold for crystallization, and to produce recombinant SCI1 for interaction and co-crystallization assays.

Materials and Methods

Cloning, subcloning, and general DNA manipulations were carried out following standard molecular cloning procedures and Gibson assembly¹. Structural models generated with AlphaFold² guided the design of partial constructs containing isolated interaction domains. Recombinant His-SCI1 and His-NtDDX35 were expressed in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) cultured in selective LB medium. Cells were lysed by sonication in high-salt buffer supplemented with a reducing agent, and the soluble fraction was purified by Ni-NTA affinity chromatography followed by size-exclusion chromatography (Superdex 200 or 75; ÄKTA Purifier). For complex formation, cultures

expressing each protein were combined and processed identically. Protein purity was assessed by 12% SDS-PAGE. Secondary structure was analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy using a Jasco J-815 spectropolarimeter, with the data processing using CDTToolX³.

Results

Purification of NtDDX35 was optimized using buffer supplemented with 500 mM NaCl, 10% glycerol and 0.5 mM TCEP to minimize contaminants, followed by size-exclusion chromatography (SEC) under adjusted ionic strength and glycerol conditions (Figure 1). SCI1 was purified in the same buffer without TCEP. The complex was obtained by co-purification and validated by SEC-MALS. CD spectra (Figure 2) indicated a predominance of α -helical content in NtDDX35 and a disordered structure in SCI1, consistent with in silico predictions. The complex displayed a profile similar to NtDDX35 but with a more negative minimum at 222 nm than expected theoretically, suggesting a potential conformational change. Truncated constructs of NtDDX35 (helicase domain) and SCI1 (C-terminal region) were generated by cloning into pSUMO using Gibson Assembly. Restriction analysis and sequencing

confirmed the cloning. Expressions tests showed soluble truncated proteins.

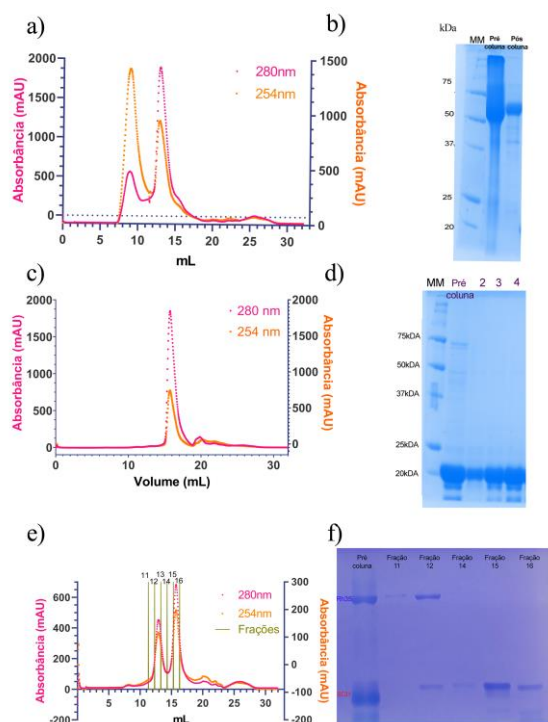


Figure 1. Chromatograms and SDS-PAGE analysis of NtDDX35 (a,b), SCI1 (c,d), and the complex (e,f).

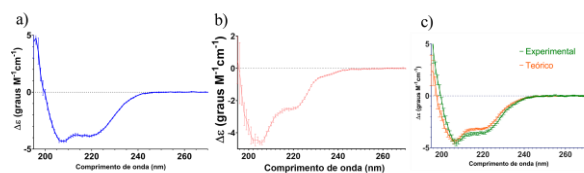


Figure 2. Circular dichroism (CD) analysis of proteins. Spectra of (a) NtDDX35 at 0.2 mg/mL, (b) SCI1 at 0.23 mg/mL, and (c) the complex at 0.166 mg/mL. All measurements were performed at 4 °C in 20 mM sodium phosphate buffer containing 125 mM NaCl, using a 1 mm path-length cuvette.

Conclusions

Expression conditions for NtDDX35 and SCI1 were optimized, enabling purification of the individual proteins as well as the complex. For SCI1, in silico predictions together with CD spectroscopy confirmed that it is an intrinsically disordered protein, consistent with its role in cell proliferation with various interactors involved.⁴ The NtDDX35–SCI1 complex was validated by SEC-MALS, and the interaction proved independent of nucleotides or RNA, remaining stable even under high ionic strength, indicating strong affinity between the proteins. The project is ongoing, with current efforts focused on characterizing the enzymatic activity of NtDDX35, potential modulatory effects of SCI1, and the structural determination of the interaction region.

The authors declare no conflict of interest.

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;
- ABRAMSON, Josh et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 8 maio 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w> ;
- MILES, Andrew J.; WALLACE, B. A. CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, v. 27, n. 9, p. 1717-1722, set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3474> ;
- PINOTI, Vitor F et al. SCI1, a flower regulator of cell proliferation, and its partners NtCDKG2 and NtRH35 interact with the splicing machinery. *Journal Of Experimental Botany*, 8 ago. 2024. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erae337>.