

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA A MEDICINA E  
BIOLOGIA

**Expressão, purificação e caracterização do domínio GOLD da proteína TMED 1  
humana**

Danielly Christine Adriani Maia Mota

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

DANIELLY CHRISTINE ADRIANI MAIA MOTA

**Expressão, purificação e caracterização do domínio GOLD da proteína TMED 1  
humana**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia da Universidade São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Coorientador: Dr. Luis Felipe Santos Mendes

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia em 20/01/2021.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

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

Mota, Danielly Christine Adriani Maia

Expressão, purificação e caracterização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Ribeirão Preto, 2020.

98 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Coorientador: Dr. Luis Felipe Santos Mendes

1. TMED. 2. Família p24. 3. Caminho de secreção inicial. 4. Secreção de proteínas. 5. Cristalização.



## ATA DE DEFESA

Aluno: 59135 - 10971591 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Danielly Christine Adriani Maia Mota no Programa: Física Aplicada à Medicina e Biologia, do(a) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de janeiro de 2021, no(a) Auditório da Física realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Danielly Christine Adriani Maia Mota, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Expressão, purificação e caracterização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

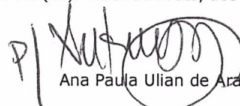
Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Antônio José da Costa Filho	Presidente	FFCLRP - USP	<u>APROVADA</u>
Ana Paula Ulian de Araujo	Titular	IFSC - USP	<u>APROVADA</u>
Eduardo Festozo Vicente	Titular	UNESP - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

**Parecer da Comissão Julgadora \***

A aluna apresentou seu trabalho de forma muito clara e respondeu às perguntas corretamente.

Eu, Cesar Pereira Brites Cesar Brites, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 20 dias do mês de janeiro de 2021.

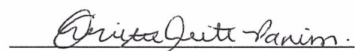
  
Ana Paula Ulian de Araujo

  
Eduardo Festozo Vicente

  
Antônio José da Costa Filho  
Presidente da Comissão Julgadora

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 04/02/2021 e, portanto, o(a) aluno(a) FAZ jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Física Aplicada à Medicina e Biologia.

  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profa. Dra. Christa Ramos Andrade Leite Panim  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Este trabalho é dedicado à minha amada família que sempre esteve presente.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho, por ter me acolhido, pela orientação, pelos diversos momentos que transmitiu seu conhecimento de maneira excepcional, por ter ensinado tão bem o lema do nosso laboratório “Work hard, party hard” que levarei para toda minha existência, por ter me proporcionado crescimento pessoal e profissional, baseado em muito respeito e confiança. Obrigada, por me receber tão bem no grupo Jaba!

Gostaria de agradecer ao meu Co-orientador Luis Felipe Santos Mendes, que esteve diariamente me ensinando desde os princípios sobre as aplicações técnicas de BioMol, purificação de proteínas até os estudos e análises Biofísica Molecular. Agradeço sua paciência e amizade construída ao longo do tempo.

Agradecer a todos meus colegas do LBM, que se tornaram a minha família nestes anos de Mestrado. Mariana Bunoro, Nat, Ariane, Emanuel, Felipe, Pops, Bruno, Thirupathi, Carol, Natan. Tivemos momentos incríveis até aqui. Agradeço aos amigos de laboratório de outros grupos que eu fiz pelos caminhos entre laboratórios e se tornaram especiais em minha vida. Iara, Sudi, Setti, Jefferson, Mileni, Raquelzinha, Bassan, Jaque, Guilherme, Kleython, Luis, Claudinho, Rafa, Felipe e tantos outros. Vocês todos em conjunto foram a minha “descompressão”, meu alívio.

Agradeço ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do IFSC, que me recebeu tão bem e tantas vezes para experimentos diversos. Militar, Patty, Ana, Andressa e Bel.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Cristina Nonato por ter me acolhido no Laboratório de Cristalografia de Proteínas (LCP-RP). Agradeço a todos seus alunos, Iara, Renan, Marília, Mariana, Thamires, Luana, Pedro, que sempre foram receptivos e dispostos a qualquer auxílio. Vocês contribuíram densamente com minha formação.

Agradeço a todos professores que eu tive por este caminho. Gostaria que vocês soubessem o quanto os admiro e tenho respeito. Agradeço aos funcionários que cumprem seu trabalho com distinção e contribuem para que o DF funcione de maneira fluida e organizada. Tia Fátima, Nilza, Carlão, Raquel, Ricardo, Carlos Renato e aos funcionários da secretária da Pós da Filo que também sempre estiveram dispostos a nos ajudar.

Agradeço a instituição USP por oferecer tantos recursos que vão de recursos humanos até toda sua forte infraestrutura; a minha instituição de origem UFU e a todos professores, funcionários e amigos que deixei em Uberlândia, que foram fundamentais para chegar a este momento.

Agradeço a minha psicóloga, Ana, que nestes tempos estranhos de pandemia foi fundamental. Agradeço o apoio para superar as adversidades e conseguir seguir do ponto em que fiquei estagnada.

Agradeço eternamente a Thádia e posteriormente a Adine e Leandro que me receberam em sua casa durante uma difícil fase financeira da minha graduação como alguém do próprio sangue, sem vocês eu não teria conseguido concluir a minha graduação e chegar até aqui.

Agradeço a meu esposo que esteve bravamente ao meu lado, me incentivando a melhorar e sendo meu refúgio nas horas mais difíceis desse trabalho e uma das minhas fontes de alegria. Agradeço a minha mãe Roseli e a meu pai Helton, que sabem da importância dos estudos em minha vida e se abriram a compreender a pós-graduação me dando muito apoio; ao meu irmão que é minha fonte de alegria; ao meu cachorro Thor que mora com meus pais e me fez lembrar que a felicidade da vida está em momentos tão simples como receber vídeos da sua mãe mostrando que todos estão bem e ao fundo um cachorro peralta e sorridente que te faz sentir feliz; aos meus Tios em especial ao Hélio por ser tão presente e ao qual tenho grande admiração; a todos meus primos; aos meus amigos e amigas que após algumas décadas já são parte da minha família; a minha cunhada que sempre incentivou que eu e Luis fizéssemos pós-graduação aqui na USP; a minha família adquirida após o casamento, assim como Luis vocês são pessoas maravilhosas; aos meus falecidos avôs Francisca, João, Maria e ao meu avô vivo José que com todas dificuldades de uma sofrida vida conseguiram construir excelentes seres humanos para este mundo e além disso o amor de vocês trouxe os meus amados pais a este mundo.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Processo nº: 134160/2018-5.

## RESUMO

As proteínas TMEDs são proteínas transmembranares presentes em eucariotos em todos os subcompartimentos da via secretora inicial, ou seja, o retículo endoplasmático (RE), o Golgi e o compartimento intermediário. Embora essenciais durante o transporte bidirecional entre o RE e o Golgi, as TMEDs ainda carecem de informações sobre sua estrutura, estado oligomérico e de suas interações com a carga de transporte. Pela primeira vez, é descrita a expressão heteróloga, a caracterização biofísica e a estrutura tridimensional em alta resolução do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. A proteína recombinante foi purificada em duas etapas cromatográficas, apresentando rendimento e pureza que permitiram os estudos biofísicos. A análise dos dados de dicroísmo circular (CD) mostrou que, após a purificação, a proteína se encontrava enovelada e que a sua estrutura secundária era predominantemente de folhas  $\beta$  (~44%). A desnaturação química da estrutura secundária foi monitorada por CD na região do ultravioleta distante. A proteína apresentou-se quimicamente estável, e a curva de desnaturação segue um perfil do tipo sigmoidal (cooperativo) com uma concentração de meia transição de aproximadamente 2,8 M de uréia. A espectroscopia de fluorescência intrínseca das tirosinas foi também utilizada para avaliar a estabilidade na presença de ureia, resultando em uma transição que ocorreu em torno de 1,2 M. Do ponto de vista da estabilidade térmica, a proteína se apresentou com elevada estabilidade com temperatura de meio da transição de cerca de 60°C e não segue um modelo de transição dois estados, indicando uma provável dissociação de dímero em monômeros em estruturas desenoveladas. Os dados de Fluorimetria diferencial de varredura (DSF) mostraram que a força iônica é importante para a estabilidade estrutural do domínio GOLD. A proteína foi cristalizada com sucesso e sua estrutura determinada em uma resolução de 1,7 Å. A estrutura 3D mostrou uma organização estrutural tradicional dos domínios TMED GOLD, formado por um sanduíche- $\beta$  composto por duas folhas  $\beta$  antiparalelas de quatro fitas conectadas por uma ligação dissulfeto. A curvatura dessas folhas- $\beta$  define visualmente dois diferentes "lados" na organização conformacional, denominados côncavo (formada por  $\beta 2$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 4$  e  $\beta 5$ ) e convexo (formados por  $\beta 6$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 8$  e  $\beta 1$ ). Usamos a estrutura para realizar simulações de dinâmica molecular e o dímero apresentou-se energeticamente favorável e estável durante o tempo de simulação. A dimerização se apresentou favorecida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações  $\pi$ - $\pi$ . Os estudos para avaliar a formação de oligômeros em relação à concentração e à força iônica sugerem que a formação dos dímeros depende de ambos os fatores. Neste trabalho, propomos um modelo de ancoragem do dímero à membrana baseado na carga eletrostática superficial da proteína. Em tal modelo, o dímero se mostra orientado com seu lado convexo para o citosol, o que está de acordo com o modelo *in vivo* proposto em outros trabalhos e que permitiria a interação com o receptor ST2. O fato das membranas do complexo de Golgi e do RE serem enriquecidas em lipídeos carregados negativamente confere potencial impacto funcional à orientação proposta para o dímero.

**Palavras-chave:** TMED. Família p24. Caminho de secreção inicial. Secreção de Proteínas. Biofísica.



## ABSTRACT

TMED proteins are eukaryotic transmembrane proteins present in all subcompartments of the early secretory pathway, i.e. the endoplasmic reticulum (ER), Golgi and the intermediate compartments. Although essential in the bidirectional protein transport between the ER and Golgi, TMEDs still lack information about their structure, oligomeric state and their interactions with the transport cargo. For the first time, the heterologous expression, biophysical characterization and the high-resolution structure of the human TMED1 GOLD domain are described. The recombinant protein was purified in two chromatographic steps, presenting a satisfactory yield and purity for the biophysical studies. The analysis of the circular dichroism data (CD) showed that, after purification, the protein was folded and that its secondary structure is predominantly composed of  $\beta$ -strands (~44%). The chemical denaturation of its secondary structures was monitored by CD in the region of the far ultraviolet. The protein was chemically stable, and the denaturation curve followed a sigmoid-like profile (cooperative) with a concentration of half transition of approximately 2.8 M urea. Tyrosine intrinsic fluorescence spectroscopy was also used to assess the stability in the presence of urea, resulting in a transition occurring at ca. 1.2 M. The protein presented high thermal stability with a melting temperature of about 60 °C and following a transition model of non-two-states, which indicated a probable dissociation of dimer to monomers to unfolded structures. DSF data showed that the ionic-strength was important for the structural stability of the GOLD domain. The protein was successfully crystallized, and its structure determined at a resolution of 1.7 Å. The 3D structure showed the traditional arrangement of the TMED GOLD domains, with a structural organization of a  $\beta$ -sandwich fold composed of two four-strand antiparallel  $\beta$ -sheets connected by a disulphide bond. The curvature of the molecule defines visually two different “sides” in this conformational organization called concave (formed by  $\beta$ 2,  $\beta$ 7,  $\beta$ 4, and  $\beta$ 5) and convex sides (formed by  $\beta$ 6,  $\beta$ 3,  $\beta$ 8, and  $\beta$ 1). We used the high-resolution structural model of the TMED1 GOLD dimer to perform molecular dynamic simulations, which showed that the dimer was energetically favorable and stable during the simulation time. Dimerization was favored by hydrogen bonds, hydrophobic interactions and  $\pi$ - $\pi$  interactions. Studies to evaluate the formation of oligomers as a function of the concentration and ionic-strength suggest that the formation of dimers depended on both factors. Here, we propose a model for the anchoring of the dimer to the membrane based on the surface electrostatic charge of the protein. In such a model, the dimer is oriented with its convex side towards the cytosol, which is in accordance with the *in vivo* model previously reported and that would allow interaction with the ST2 receptor. The fact that the Golgi complex and the ER membranes are enriched in negatively-charged lipids gives potential functional impact to the proposed dimer orientation.

**Keywords:** TMED. p24 family. Early Secretory Pathway. Protein secretion. Biophysics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Organização estrutural do complexo de Golgi em células eucariotas. Figura adaptada da referência (CHEN et al., 2017). ..... 16
- Figura 2: Descrição ilustrativa das várias etapas que concernem a secreção convencional de proteínas. A protrusão que representa a carga de transporte sendo formada no início da via (*bulk flow*) está destacada em linhas pontilhadas. Abreviações: Reticulo Endoplasmático (RE), sítios de saída do RE (ERES), compartimentos intermediários do RE e Golgi (ERGIC), rede de liberação de carga na região *trans* do Golgi (TGN), sistema endossomal/lisossomal (ELS) e membrana plasmática (MP). Figura adaptada da referência (STRATING et al., 2009). ..... 18
- Figura 3: Representação dos diferentes domínios dos membros das p24 e sua localização celular. Basicamente, as p24 são formadas por uma pequena porção no N-terminal, um domínio GOLD, uma região do tipo *coiled coil* (CC), uma porção transmembranar (TMD) e uma cauda no C-terminal que contém um peptídeo sinal para interação com as COPI e COPII na forma de um motivo  $\Phi\text{FXXBBX}_n$  onde  $\Phi$  é um aminoácido hidrofóbico volumoso (F/Y/L/I), B um aminoácido básico e n é um número  $\geq 2$ . Figura adaptada da referência (PASTOR-CANTIZANO, 2016). ..... 22
- Figura 4: Resultado da purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida de Tricina 16%. Coluna 1 - marcador de massa molecular. Coluna 2 - Pellet. Coluna 3 - Sobrenadante. Coluna 4 - Fração não ligada (coluna de Níquel 20 mM de Imidazol). Coluna 5 - Eluição em tampão (500 mM de Imidazol). Coluna 6 - Pós-diálise de 16 h, eluição em tampão 50 mM de Imidazol. Coluna 7 - Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime Mono q 5/50 GL. A banda de proteína utilizada está destacada no retângulo de cor vermelha. Fonte: elaborada pela autora. .... 39
- Figura 5: Perfil de eluição do domínio GOLD da proteína TMED 1 na coluna Mono q 5/50 equilibrada com tampão 20mM de Tris (pH 8) e 20mM de NaCl. Fonte: elaborada pela autora. .... 40
- Figura 6: Perfil da estrutura secundária monitorada por CD em tampão fosfato 10 mM de Tris (pH 8). Fonte: elaborada pela autora. .... 41
- Figura 7: Análise de Dicroísmo circular do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana em solução (preto) usando-se o espectro reconstruído teoricamente pelo programa BeStSel (vermelho). Fonte: elaborada pela autora. .... 42

Figura 8: Monitoramento da estrutura secundária por CD no desenovelamento químico. A) Dados de CD no UV-distante do domínio GOLD da proteína TMED 1 com o aumento da concentração de uréia. B) Elipticidade (mdeg) em 222 nm em função da concentração de uréia. Fonte: elaborada pela autora. .... 44

Figura 9: Desnaturação química do domínio GOLD da proteína TMED 1 avaliada pela fluorescência estática da tirosina. A) Espectro de emissão da tirosina de acordo com a variação da concentração da ureia. B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão em função da concentração da ureia. Fonte: elaborada pela autora. .... 46

Figura 10: Análises de estabilidade térmica por calorimetria diferencial de varredura do domínio GOLD da proteína TMED 1. A linha em preto indica o termograma após a subtração da linha de base e a linha em vermelho representa a curva teórica com o melhor ajuste dos dados do termograma. A transição do desenovelamento foi ajustada a um modelo de não-dois-estados entre os estados enovelado e desenovelado. .... 47

Figura 11: Termogramas de DSC monitorando a reversibilidade térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 por meio do registro de varreduras de aquecimento consecutivas. A porcentagem na inserção é calculada com base no valor  $\Delta H$  de cada varredura em relação à primeira desnaturação térmica. .... 49

Figura 12: Estabilidade térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 em função do pH, com 8 mg/mL, monitoradas pela fluorescência do SYPRO<sup>TM</sup> Orange medida por DSF. O  $T_M$  foi obtido a partir da primeira derivada da fluorescência pela temperatura. Os valores de  $T_M$  para as soluções com NaCl inferior a 1 mM e NaCl 50 mM são apresentados em preto e vermelho, respectivamente. A desnaturação foi realizada com variação de pH 2-10. Fonte: elaborada pela autora. .... 50

Figura 13: Cristal obtido durante os estágios iniciais de triagem (condição 37 Crystal Screen HR2 - 110 Hampton Research). Fonte: elaborada pela autora. .... 51

Figura 14: Análises estruturais do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. A) Representação da estrutura cristalográfica com uma superfície parcialmente transparente de ambos os lados côncavo e convexo. Cada fita  $\beta$  que compõe a estrutura é rotulada sequencialmente. B) Representação da ligação dissulfeto formada por ambas as cisteínas 50 e 111 conectando as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_7$ . .... 53

Figura 15: Superposição das estruturas dos monômeros do domínio GOLD da proteína TMED 1 (vermelho escuro) e do domínio GOLD da proteína TMED 5 (dourado) usando o

método Gesamt/SSM, conforme implementado em CCP4MG (MCNICHOLAS et al., 2011). A figura foi preparada usando Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG. ....	54
Figura 16: Representação estrutural, em cartoon, do dímero do domínio GOLD da TMED 1 observado na unidade assimétrica. A dimerização preserva os lados côncavos e convexos observados na estrutura do monômero. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG. ....	56
Figura 17: Sobreposição das estruturas do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 (em vermelho) e do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 5 (em dourado). A figura foi preparada usando-se PyMOL. ....	57
Figura 18: (A) Valores de RMSD ao longo das trajetórias para os átomos da cadeia principal do monômero (curva preta) e cada monômero do dímero (curvas vermelha e verde). (B) RMSD médio do C <sub>α</sub> em função do número dos resíduos. (C) Distância do centro de massa (COM) em função do tempo para cada simulação de produção.....	59
Figura 19: Contribuição por resíduo para a energia livre de dimerização total do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Os resíduos com $\Delta G < -1,5$ kcal/mol foram marcados.....	60
Figura 20: Representação dos pares de ligações de hidrogênio intermoleculares (destacadas em linhas pontilhadas pretas) que contribuem para a estabilização do dímero. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....	60
Figura 21: Posição dos resíduos hidrofóbicos e aromáticos na interface de ligação do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Para simplificar, apenas um monômero foi mostrado. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). ....	61
Figura 22: Resultados de cromatografia líquida em coluna de exclusão molecular. O comportamento hidrodinâmico do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana é avaliado com relação ao aumento da concentração de NaCl. A) Resultados de coluna de exclusão molecular para analisar a propensão de oligomerização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana de acordo com a concentração de sal em solução. B) Volume de eluição do domínio <i>versus</i> o aumento da concentração de NaCl na solução. Fonte: elaborada pela autora. ....	62
Figura 23: Regressão linear da constante de partição em função do logaritmo da massa molecular, reconstruída utilizando-se proteínas comerciais padrões, na condição de baixa força iônica (20 mM de Tris-HCl, pH8 + 20 mM de NaCl). O valor da constante de partição obtida	

corresponde a aproximadamente 30 kDa, destaque em vermelho, sugerindo uma organização quaternária dimérica. Fonte: elaborada pela autora..... 63

Figura 24: Resultado de SEC-MALS: a oligomerização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana, na concentração de 2,15 mg/mL, foi analisada na condição de alta força iônica (20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 + NaCl 500 mM). Fonte: elaborada pela autora. .... 64

Figura 25: Termogramas do domínio GOLD da proteína TMED 1 em diferentes forças iônicas. A) Força iônica baixa (20 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8) e B) Alta força iônica (300 mM de NaCl e 20mM de Tris-HCl, pH 8), com 205  $\mu$ M e 130  $\mu$ M de proteína respectivamente. Os termogramas corrigidos da linha de base foram desconvoluídos com um modelo de não-dois-estados para o desenovelamento da proteína. .... 65

Figura 26: Termogramas do domínio GOLD da proteína TMED 1 em diferentes forças iônicas e ajustes baseados em uma transição que seguiria um modelo de dois estados. A) Força iônica baixa (20 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8) e B) Alta força iônica (300 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8). .... 66

Figura 27: Potencial eletrostático de superfície das estruturas de dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana e do domínio GOLD da proteína TMED 5. A cor da superfície representa o potencial eletrostático na superfície da proteína, indo do azul (potencial de +0,5 V) ao vermelho (potencial de -0,5 V). A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG. .... 68

Figura 28: Mapas do potencial eletrostático de superfície do monômero da proteína TMED 2 (PDB ID 5AZW) e do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 10 (PDB ID 5AZY), A cor da superfície representa o potencial eletrostático na superfície da proteína, indo do azul (potencial de +0,5 V) ao vermelho (potencial de -0,5 V). A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG..... 69

Figura 29: Modelo proposto para orientação do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana em membranas, expondo a superfície carregada negativamente formada pelo lado convexo ao lúmen. Neste modelo, o lado côncavo é orientado para a superfície da membrana. A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG. .... 70

Figura 30: Resultado da purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 visualizado em eletroforese em gel de poliacrilamida de Tricina 16%. Coluna 1 - marcador de massa molecular. Coluna 2 - Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime Mono q 5/50 GL com a presença da cauda de histidina. Coluna 3 - Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime

Mono q 5/50 GL após digestão proteolítica da cauda de histidina, destacada no retângulo de cor vermelha. Fonte: elaborada pela autora.....	71
Figura 31: Perfil de eluição comparativo na coluna Mono q 5/50 equilibrada com tampão 20 mM de Tris (pH 8) e 20 mM de NaCl. Em vermelho, o perfil de eluição do domínio GOLD da proteína TMED 1 com a remoção da cauda de histidina e, em preto, na presença da cauda de histidina. Fonte: elaborada pela autora.....	72
Figura 32: Espectros de CD das estruturas secundárias das proteínas TMED 1 com e sem a cauda de histidinas. Em preto, com a presença da cauda de histidina e, em vermelho, após a sua remoção. Fonte: elaborada pela autora.....	73
Figura 33: Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 na presença da cauda de histidina. Os gráficos mostram a variação da elipticidade (mdeg) em 205 nm para avaliação da estrutura secundária e 260 nm para a linha de base. Fonte: elaborada pela autora. ....	74
Figura 34: Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 após a remoção da cauda de histidina. Os gráficos mostram a variação da elipticidade (mdeg) em 205 nm para avaliação da estrutura secundária e 260 nm para a linha de base. Fonte: elaborada pela autora. ....	75
Figura 35: Análises de estabilidade térmica por calorimetria diferencial de varredura do domínio GOLD da proteína TMED 1 após a clivagem da cauda de histidina. A linha em preto indica o termograma após a subtração da linha de base e a linha em vermelho representa a curva teórica com o melhor ajuste dos dados do termograma. A transição do desenovelamento foi ajustada a um modelo de não-dois-estados. Fonte: elaborada pela autora.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura das proteínas p24/ TMEDs para várias espécies. Fonte adaptada da referência (SCHUIKI; VOLCHUK, 2012).....	21
Tabela 2: Deconvolução dos espectros de CD utilizando o servidor online <i>BeStSel</i> . Fonte: elaborada pela autora.....	42
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos dados experimentais da desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 na concentração de 250 $\mu$ M. Fonte: elaborada pela autora.....	48
Tabela 4: Dados cristalográficos e estatísticos para o conjunto de dados coletados.	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBP *Acyl-CoA Binding Protein*

a.u. *Arbitrary unit*

BeStSel *Beta Structure Selection*

CC *Coiled-coil*

CD *Circular Dichroism*

CDS *coding sequence*

CG *conjugate gradient*

CG Complexo de Golgi

COPs Coatômeros

DNA *Desoxyribonucleic acid*

D.O. Densidade óptica

DSC *Differential scanning calorimetry*

DSF Fluorimetria diferencial de varredura

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

ERES Sítios de saída do RE

ERGIC Compartimentos intermediários do RE e Golgi

ELS Sistema endossomal/lisossomal

ExPASy *Expert Protein Analysis System*

GOLD Golgi Dynamics

GPCRs *G Protein-coupled receptors*

GPI Glicosilfosfatidilinositol

IL-33 interleucina-33

IPTG Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

LB Meio de cultura Luria Bertani

LPS Lipopolissacarídeos



MM/PBSA *Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*

MP Membrana plasmática

NF- $\kappa\beta$  *Factor nuclear kappa beta*

pb Pares de bases

PCR *Polymerase chain reaction*

PDB *Protein Data Bank*

PME *Particle Mesh Ewald*

RE Retículo endoplasmático

RPM Rotação por minuto

SASA *Surface accessible surface area*

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SEC-MALS *Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering*

TEV *Tobacco Etch Virus Protease*

TGN Região trans-Golgi

TIR *Toll/IL-1 receptor*

TLR4 *Toll-like receptor 4*

TMED *Transmembrane emp24 domain-containing protein*

TMD Porção transmembranar

Tris Tris(hidroximetil) aminometano

UV Ultra violeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	As proteínas p24 ou TMED: características gerais, nomenclatura e função .....	19
1.2	Organização estrutural das proteínas TMED.....	22
1.3	O domínio GOLD da proteína TMED 1 humana e sua função na imunossinalização 23	
<b>1.4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
2.1	Proteínas recombinantes .....	26
<b>2.1.1</b>	<b>Clonagem.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Linhagens de <i>Escherichia coli</i> e protocolo de transformação.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Expressão heteróloga.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Purificação da Proteína Recombinante .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Eletroforese em Condições Desnaturantes .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Determinação da Concentração Protéica .....</b>	<b>29</b>
2.2	Análise estrutural e de estabilidade .....	30
<b>2.2.1</b>	<b>Dicroísmo Circular .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Calorimetria Diferencial de Varredura.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Medidas de Fluorescência da Tirosina .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Cromatografia de Exclusão Molecular Acoplada a Espalhamento de Luz em Múltiplos Ângulos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Ensaio de oligomerização em coluna de exclusão molecular .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Fluorimetria Diferencial de Varredura .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Cristalização, coleta de dados e resolução de estrutura.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Simulações de dinâmica molecular .....</b>	<b>35</b>

2.2.9	Cálculo de energia livre.....	36
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
3.1	Expressão e purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 .....	38
3.2	Caracterização estrutural do domínio GOLD da proteína 1 em solução .....	40
3.2.1	Avaliação da estrutura secundária .....	40
3.2.2	Estudos de desnovelamento químico induzido com ureia.....	43
3.2.3	Estudos de desnovelamento térmico.....	47
3.2.4	Estudos de cristalização .....	51
3.2.5	Formação de oligômeros do domínio GOLD da proteína TMED 1.....	54
3.2.6	Estudos de simulação computacional e cálculo de energia livre para avaliação do provável dímero.....	58
3.2.7	Estudos de oligomerização em solução .....	61
3.2.8	Proposta de modelo de ancoragem a COPs.....	66
3.3	Domínio GOLD da proteína TMED 1 sem a cauda de histidina.....	71
3.3.1	Expressão e purificação.....	71
3.3.2	Avaliação da estrutura secundária .....	72
3.3.3	Estudos de desnovelamento térmico para avaliação do impacto da cauda de histidina	73
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
5	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>79</b>
6	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
7	<b>ANEXO .....</b>	<b>90</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A compartimentalização de certas funções biológicas em organelas é uma das características mais particulares dos sistemas eucariotos, complexidade essa que os diferencia enormemente das células procariotas (DIEKMANN; PEREIRA-LEAL, 2013). A compartimentalização permitiu uma melhor organização celular e controle metabólico ao delimitar um espaço/microambiente otimizado para que reações específicas pudessem ocorrer. Essa separação física de reações e processos químicos conferiu aos organismos eucariotos uma significativa vantagem evolutiva e uma grande eficiência funcional.

Entretanto, a presença de diferentes compartimentos acarretou certas dificuldades, principalmente a necessidade de constantes trocas de biomoléculas entre tais compartimentos (ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, 2002; CHEN; SILVER, 2012, DIEKMANN; PEREIRA-LEAL, 2013). Em células eucarióticas, o transporte de proteínas é realizado por meio de vesículas que são formadas em um compartimento doador e transportadas para o compartimento alvo, contando o processo com a participação central do complexo de Golgi (PALADE, 1975; RAOTE; MALHOTRA, 2019). O complexo de Golgi foi descrito pela primeira vez em 1898 por Camilo Golgi ao investigar o sistema nervoso (MAZZARELLO; GARBARINO; CALLIGARO, 2009), tendo sido muito estudado desde então.

Na maior parte dos eucariotos, o Golgi, que é a principal organela da via de secreção, está localizado na região central das células e próximo ao envoltório nuclear. É morfologicamente constituído por membranas achatadas, conhecidas como cisternas, que se organizam em forma de pilhas de quatro a oito cisternas alinhadas e compactadas, ligadas entre si por meio de sistemas tubovesiculares (VIOTTI, 2016). Todo esse conjunto é organizado de maneira polarizada da região *cis*, representando o local de entrada da carga, para região *trans* que é o local de saída, como mostrado na **Figura 1**: a região *cis*-Golgi que fica próxima à saída do retículo endoplasmático (RE), a região *cis-medial* e a região *trans*-Golgi, localizada em frente à membrana plasmática, endereçando as moléculas a seus destinos finais (CHEN et al., 2017; HUANG; WANG, 2017).

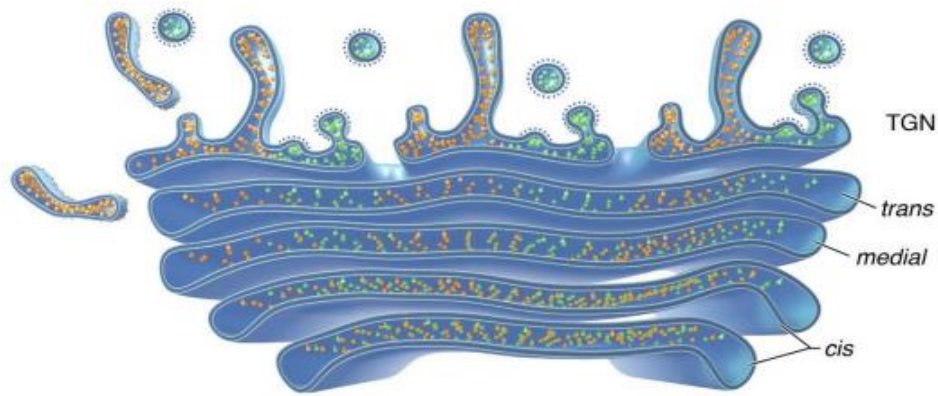


Figura 1: Organização estrutural do complexo de Golgi em células eucariotas. Figura adaptada da referência (CHEN et al., 2017).

O RE é a porta de entrada de proteínas na via de secreção e também a organela responsável pelo correto enovelamento dessas proteínas. As proteínas poderão sair do RE e percorrer todo o caminho das cisternas do Golgi até seu destino final, apenas se estiverem devidamente enoveladas (NEUBERT; STRAHL, 2016). Falhas no processo de enovelamento podem levar a erros na classificação das proteínas, provocando uma diminuição, ou até mesmo a abolição de sua secreção, além de possíveis falhas no processo de glicosilação (XIANG et al., 2013; SICARI; IGBARIA; CHEVET, 2019). Diversas doenças humanas, incluindo distúrbios neurológicos, malformações congênitas e tumores, surgem como resultado da mutação ou expressão anormal de proteínas na via de secreção (GARDES et al., 2015; JOSHI; WANG, 2015; MAKOWSKI; TRAN; FIELD, 2017; WANG et al., 2020).

Ao longo da via secretória existem diversas modificações pós-traducionais a que proteínas e lipídios podem ser submetidos, envolvendo processos como a glicosilação, fosforilação, sulfatação e a proteólise, que dependem de sua organização morfológica correta para ocorrer (GOLDFISHER, 1982; ROTH, 2002). A maioria dessas modificações ocorre no Golgi, que também é responsável pelo transporte de proteínas e de lipídeos, pelo englobamento da carga de transporte por carreadores e pela sua classificação para seus destinos finais (WEI, SEEMANN, 2010; BRANDIZZI, BARLOWE, 2013; HUANG; WANG, 2017).

O transporte de proteínas, em especial na rota que envolve o RE e o Golgi, é altamente seletivo e realizado por meio de vesículas revestidas por um complexo proteico (coatômero - COPs) (BARLOWE; HELENIUS, 2016). As COPs são responsáveis por duas funções principais: a captura seletiva de proteínas a serem transportadas e de proteínas adaptadoras de

carga, e o modelamento da curvatura da membrana para a protusão de vesículas em formato esférico para o transporte. A descoberta do processo de formação e regulação do tráfico vesicular, especificamente a formação e fusão das COPs, conferiu o prêmio Nobel em Medicina ou Fisiologia em 2013 à James E. Rothman, Randy W. Schekman e Thomas C. Sudhof (ROTHMAN; SCHEKMAN; SUDHOF, 2013).

O transporte conhecido como anterógrado na via de secreção é tido como aquele que se inicia no RE e segue em direção ao Golgi, rumo ao seu destino final (**Figura 2**). Existe também uma rota de transporte reversa, conhecida como transporte retrógrado, responsável por trazer de volta ao RE proteínas residentes que atingem o Golgi após finalizar a sua participação no transporte anterógrado (**Figura 2**). Até o momento, foram identificadas três classes de complexos proteicos responsáveis pelo revestimento das vesículas de secreção, que são a COPI, COPII e as clatrininas. Embora COPI e COPII possuam características funcionais em comum, elas são diferentes do ponto de vista organizacional (GOMEZ-NAVARRO; MILLER, 2016a, 2016b). As proteínas responsáveis pela formação das COPI e COPII selecionam as proteínas a serem transportadas, além de participarem da deformação da bicamada lipídica das membranas doadoras em brotos e vesículas.

A COPI está envolvida no transporte retrógrado, entre a face *cis* do complexo de Golgi e o RE. O controle da biogênese das vesículas COPI é mediado por uma pequena GTPase conhecida como fator de ribosilação do ADP (Arf1) (KREIS, 1995; BECK et al., 2009). A ativação de Arf-1 leva a mudanças na estrutura terciária expondo o seu ácido mirístico e a região N-terminal hidrofóbica (BECK et al., 2009). Essa alteração possibilita a ligação à membrana e promove o recrutamento da COPI, formando um complexo heptamérico (formado pelas subunidades  $\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ ) externo à membrana (GAYNOR; GRAHAM; EMR, 1998).

A COPII é importante para o transporte seletivo de proteínas que foram recém-sintetizadas no RE (DUDEN, 2003) e foi a última classe a ser identificada (KIRCHHAUSEN, 2007). Cinco proteínas estão envolvidas no revestimento de COPII em uma montagem sequencial: Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 e Sec31. O processo de montagem do revestimento se inicia após a ativação da GTPase Sar1 e, devido à baixa atividade intrínseca na troca de GDP para GTP, é necessária uma proteína de membrana presente no RE, a Sec12, para facilitar a ligação do GTP. Desta forma, a ligação de Sar1-GTP na membrana do RE permite o recrutamento do heterodímero Sec23 e Sec24. A proteína Sec24 está envolvida na seleção de proteínas de carga. As proteínas solúveis que estão na região luminal do RE não fazem interação direta com Sec24, sendo, portanto, o transporte dependente de proteínas receptoras. Sar1 e

Sec23 interagem e recrutam Sec13-Sec31 que fornecem a capacidade de modelagem esférica em solução e, acredita-se, induzem o processo de formação da curvatura da membrana (GOMEZ-NAVARRO; MILLER, 2016a, 2016b).

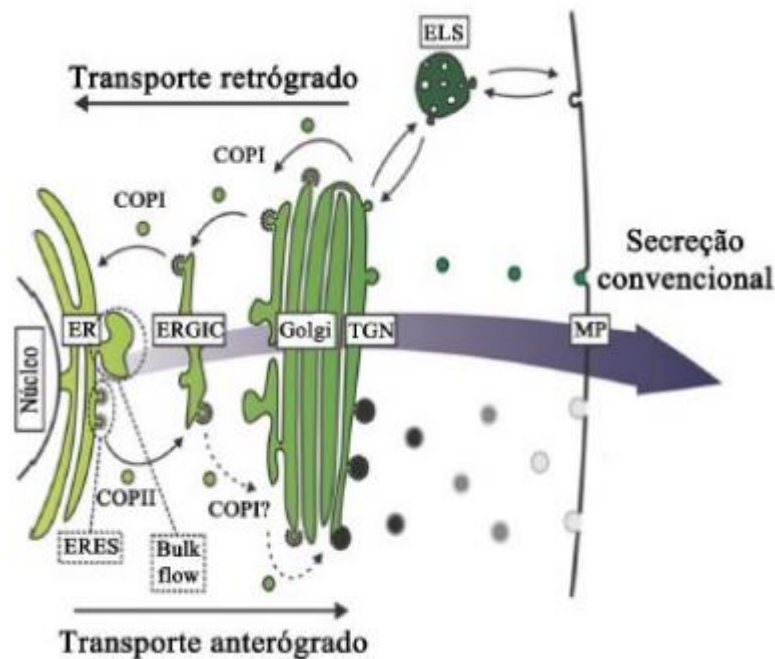


Figura 2: Descrição ilustrativa das várias etapas que concernem a secreção convencional de proteínas. A protrusão que representa a carga de transporte sendo formada no início da via (*bulk flow*) está destacada em linhas pontilhadas. Abreviações: Reticulo Endoplasmático (RE), sítios de saída do RE (ERES), compartimentos intermediários do RE e Golgi (ERGIC), rede de liberação de carga na região *trans* do Golgi (TGN), sistema endossomal/lisossomal (ELS) e membrana plasmática (MP). Figura adaptada da referência (STRATING et al., 2009).

Embora o entendimento da maquinaria de secreção convencional seja alvo de intensos estudos, diversos aspectos permanecem pouco elucidados. Uma das etapas fundamentais no processo inicial de secreção de proteínas é o transporte de carga do RE em direção ao Golgi, no qual proteínas específicas são selecionadas, ancoradas nas COPII e essas vesículas são então eficientemente recuperadas pela matriz do Golgi. Neste sentido, uma família de proteínas integrais de membrana, associadas às COPs e que coletivamente foram chamadas de p24 ou TMED, possui um importante, porém pouco entendido, papel nesse transporte bidirecional na interface entre o RE e o complexo de Golgi.



## 1.1 AS PROTEÍNAS p24 OU TMED: CARACTERÍSTICAS GERAIS, NOMENCLATURA E FUNÇÃO

Existe uma família de proteínas transmembranares do tipo I de aproximadamente 24 kDa (20-25 kDa) que são denominadas como proteínas p24 ou TMED (transmembrane emp24 domain-containing protein) e que estão presentes em todos os organismos eucariotos (SCHUIKI; VOLCHUK, 2012; ABER et al., 2019). A diversidade das TMEDs em vertebrados, os aspectos evolutivos e a sua distribuição tecidual foram amplamente discutidos por *Strating* e colaboradores em 2009 (STRATING et al., 2009). Estudos iniciais sugerem que essa família de proteínas pode estar envolvida na estrutura e organização dos compartimentos da etapa inicial de secreção, regulando a composição, estrutura e função de diferentes organelas da via, principalmente o RE e o complexo de Golgi (EMERY; GRUENBERG; ROJO, 1999; STRATING et al., 2009; VIOTTI, 2016; ABER et al., 2019; LOPEZ et al., 2020). As proteínas TMED possuem expressão tecidual variada levando a diferentes funções em diferentes espécies (ABER et al., 2019). Foi observado um envolvimento das TMEDs em uma série de doenças humanas tais como o Alzheimer (LIU; FUJINO; NISHIMURA, 2015), doenças de origem pancreática no desenvolvimento de diabetes (WANG et al., 2012), doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) (HOU et al., 2017) e papéis de proliferação e diferenciação celular originando tumores (LIN et al., 2019; PEI et al., 2019).

A família das TMEDs é abundantemente presente nas membranas da via inicial de secreção, formando complexos com as proteínas de revestimento que recobrem as vesículas de transporte, COPI e COPII, além de serem um dos principais agentes moleculares envolvidos na formação das vesículas COPI (POPOFF et al., 2011). Embora estejam presentes na via secretora inicial e tardia, a maior parte dos estudos científicos se concentram em seus papéis funcionais na via secretória inicial (ABER et al., 2019; LOPEZ et al., 2020). Além desses locais, as proteínas TMED também podem ser localizadas na MP, em grânulos de secreção, na região TGN e nos peroxissomos (ABER et al., 2019).

As proteínas TMED têm seu papel amplamente caracterizado na modulação do transporte de proteínas específicas, como as proteínas ancoradas por cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (THEILER et al., 2014). São relatadas mais de 150 proteínas de origem humana ancoradas por cauda de GPI (KINOSHITA; FUJITA, 2016). Esse tipo de ancoragem é uma modificação pós-traducional e envolve diversas etapas para a sua montagem, culminando com o transporte do complexo de Golgi até a superfície celular (KINOSHITA,

2020). Os estudos iniciais relativos ao papel das proteínas TMED para a classificação das proteínas ancoradas por GPI foram feitos em leveduras (CASTILLON et al., 2009; THEILER et al., 2014). Acredita-se que a cauda de GPI possua função de classificação e sinalização para o transporte via TMEDs (CASTILLON et al., 2009). Posteriormente, estudos em mamíferos apoiaram esta teoria de ancoragem por GPI e transporte pelas TMEDs (BONNON et al., 2010; THEILER et al., 2014).

Além de modularem o transporte de proteínas ancoradas com a cauda de GPI, as proteínas TMED também fazem a modulação do transporte de Receptores Acoplados à Proteína-G (GPCRs *G protein-coupled receptors*), como foi observado no controle do transporte do receptor ativado por proteinase do tipo 2 (PAR-2) do Golgi para a MP em mamíferos (LUO; WANG; REISER, 2007, 2011). A descoberta e os estudos sobre a compreensão do processo funcional destes receptores conferiram o prêmio Nobel de Química em 2012, para os pesquisadores Robert J. Lefkowitz e Brian K. Kobilka (LEFKOWITZ; KOBILKA, 2012) (LUO; WANG; REISER, 2007). Essa classe de receptores está presente na superfície celular de todos tipos de células e por isso representa cerca de 30% dos alvos farmacológicos comercializados (LIM, 2007). Uma maior compreensão do processo de transporte de GPCRs, bem com a sua modulação, é de grande interesse do ponto de vista farmacológico.

Outro mecanismo funcional associado às proteínas TMED envolve a possível alteração ou modulação de microambientes lipídicos (STRATING et al., 2009). Esse processo ainda não esclarecido pode ocorrer devido a interações específicas entre TMEDs e certo tipos de lipídeos, como, por exemplo, envolvendo a região transmembranar da TMED 2 com a esfingomiéline C18:0 e que é importante na dimerização dessa região proteica na membrana (PANNWITT; STANGL; SCHNEIDER, 2019). Essas proteínas também podem levar a alterações físico-químicas em membranas biológicas, como a alteração da fluidez, distribuição de cargas espessura, e formarem microdomínios para a interação de proteínas ancoradas a cauda de GPI ou recrutando proteínas para a interação periférica com as COPs (EMERY; GRUENBERG; ROJO, 1999; STRATING et al., 2009).

Baseado em análises filogenéticas, foi proposta a existência de quatro subfamílias de TMED nomeadas utiliza-se as letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (DOMINGUEZ et al., 1998; STRATING et al., 2009), embora existam em paralelo diversas nomenclaturas alternativas (**Tabela 1**). Em uma dessas nomenclaturas, se utiliza a letra grega para identificar as subfamílias das TMEDs seguida de um número que vai desde o primeiro membro encontrado e foi proposta

em 1998 por Dominguez et al (DOMINGUEZ et al., 1998; PASTOR-CANTIZANO et al., 2016; NAGAE et al., 2017). O número de representantes de cada subfamília também varia conforme a espécie (STRATING et al., 2009; POPOFF et al., 2011). Foram reportados em mamíferos a presença de 10 representantes até o presente momento, sendo que em humanos existem 9 pois o gene da TMED 11 possui um códon interveniente na sequência codificante levando a interrupção da região codificante (STRATING et al., 2009). Por outro lado, em plantas do gênero *Arabidopsis*, as proteínas TMEDs estão presentes apenas nas subfamílias  $\beta$  e  $\delta$  (MONTESINOS et al., 2013; PASTOR-CANTIZANO et al., 2017).

Tabela 1: Nomenclatura das proteínas p24/ TMEDs para várias espécies. Fonte adaptada da referência (SCHUIKI; VOLCHUK, 2012).

Subfamília	Vertebrados			<i>Drosophila</i>	Plantas	Leveduras
	Nome sistemático	Nome sistemático com o sistema de dados	Nomes adicionais			
$\alpha$	p24 $\alpha$ 1	TMED11	gp25L	Eclair		Erp1p
	p24 $\alpha$ 2	TMED9	P25, GMP25, gp25L2, p24d, p24D			Erp5p
	p24 $\alpha$ 3	TMED4	GMP25iso			Erp6p
$\beta$	p24 $\beta$ 1	TMED2	P24, p24a	CHOp24, CG9308	p24 $\beta$ 1, p24 $\beta$ 2	Emp24b
$\gamma$	p24 $\gamma$ 1	TMED1	Tp24, T1/ST2	P24-1		Erp2p
	p24 $\gamma$ 2	TMED5	P28, T1/ST2 iso	CG31787		Erp3p
	p24 $\gamma$ 3	TMED7	(g)p27	Opm		Erp3p
	p24 $\gamma$ 4	TMED3	P26, p24b	Logjam		
	p24 $\gamma$ 5	TMED6				
$\delta$	p24 $\delta$ 1	TMED10	P23, tmp21(-I), p24c	Baiser	P24 $\delta$ 1a, p24 $\delta$ 1b, p24 $\delta$ 1c (Atp24), p24 $\delta$ 1d,	Erv25p
	P24 $\delta$ 2		p23iso		p24 $\delta$ 2a, p24 $\delta$ 2b, p24 $\delta$ 2c, p24 $\delta$ 2d, p24 $\delta$ 2e	

No presente trabalho, a nomenclatura será utilizada de acordo com o banco de dados de proteínas de vertebrados, pois a maioria das proteínas p24 são anotadas como TMED (transmembrane emp24 domain-containing protein), sendo a primeira proteína a ser descoberta a emp24 em levedura (SCHIMMÖLLER et al., 1995; PASTOR-CANTIZANO et al., 2016).

Embora ainda seja alvo de intensas discussões, sugere-se que, para que as proteínas TMED exerçam suas funções adequadamente, é necessário que elas estejam em equilíbrio dinâmico na forma de homo e hetero-oligômeros. Foi sugerido anteriormente que as TMED 10 e TMED 2 interagem durante o transporte na via de secreção inicial (EMERY; ROJO;

GRUENBERG, 2000). Posteriormente, um estudo em leveduras demonstrou que as proteínas TMED são capazes de formar um complexo hetero-oligomérico entre  $\alpha\beta\gamma\delta$ , sendo que  $\alpha$  e  $\gamma$  são membros essenciais para que o papel de transporte seja alcançado com sucesso (HIRATA; NIHEI; NAKANO, 2013). Entretanto, estudos em células HeLa relatam a existência de apenas monômeros e dímeros de TMEDs (JENNE et al., 2002). É também descrito na literatura a possibilidade de formação de monômeros, dímeros e tetrâmeros das TMEDs em equilíbrio dinâmico em mamíferos (DOMINGUEZ et al., 1998; FÜLLEKRUG et al., 1999; FUJITA et al., 2011). A alta diversidade na formação de complexos pode ser devido à evolução diferencial dessas proteínas em diferentes espécies (STRATING et al., 2009).

## 1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS TMED

As proteínas TMED são altamente conservadas dentro de uma subfamília (STRATING et al., 2009). Entretanto, quando se analisa a sequência de aminoácidos entre as diferentes subfamílias, observa-se que o grau de identidade é relativamente baixo (STRATING et al., 2009). Apesar da baixa identidade sequencial, todas as proteínas TMED possuem um peptídeo sinal e uma organização estrutural similar que envolve: uma região C-terminal citosólica curta que possui um motivo para a ligação às COPI e COPII; um domínio transmembranar simples; um domínio que pode formar um *coiled coil* provavelmente envolvido na oligomerização destas proteínas; e uma região luminal longa que compreende um domínio conhecido como Golgi Dynamics (GOLD) (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2002)(PASTOR-CANTIZANO et al., 2016) (**Figura 3**).

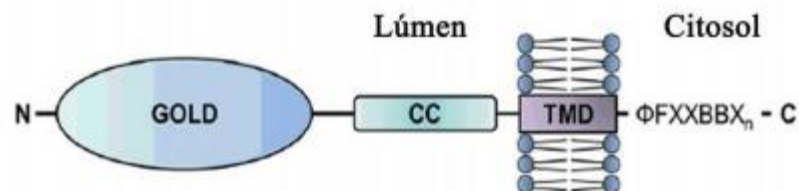


Figura 3: Representação dos diferentes domínios dos membros das p24 e sua localização celular. Basicamente, as p24 são formadas por uma pequena porção no N-terminal, um domínio GOLD, uma região do tipo *coiled coil* (CC), uma porção transmembranar (TMD) e uma cauda no C-terminal que contém um peptídeo sinal para interação com as COPI e COPII na forma de um motivo  $\Phi\text{FXXBBX}_n$  onde  $\Phi$  é um aminoácido hidrofóbico volumoso (F/Y/L/I), B um aminoácido básico e n é um número  $\geq 2$ . Figura adaptada da referência (PASTOR-CANTIZANO, 2016).

O domínio GOLD é capaz de mediar ligações do tipo proteína-proteína e sugere-se que seja responsável pelo reconhecimento da carga a ser transportada, além de ser associado com proteínas de ligação de açúcar e de lipídeos (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2002). Estudos recentes sugerem que possa também estar envolvido no processo de dimerização entre os membros de diferentes subfamílias de proteínas TMED (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2002; NAGAE et al., 2016, 2017; ABER et al., 2019). O domínio GOLD possui uma estrutura secundária rica em fitas betas (JENNE et al., 2002). O domínio *coiled coil* está associado ao reconhecimento e transporte de proteínas GPI-ancoradas (EMERY; ROJO; GRUENBERG, 2000; THEILER et al., 2014). O domínio transmembranar foi observado ser capaz de mediar interações com lipídeos específicos, além de auxiliar no brotamento de vesículas (AISENBREY et al., 2019; PANNWITT; STANGL; SCHNEIDER, 2019).

As proteínas TMED são aparentemente essenciais na via de secreção convencional em mamíferos, entretanto, ainda hoje pouco se sabe sobre suas propriedades estruturais em modulação de membranas e de ancoragem protéica. Até o presente momento, foram resolvidas as estruturas do domínio GOLD de três TMED (TMED 2, 5 e 10) por cristalografia de raios-X, mas a sua função biológica permanece ainda não completamente elucidada (NAGAE et al., 2016, 2017).

### 1.3 O DOMÍNIO GOLD DA PROTEÍNA TMED 1 HUMANA E SUA FUNÇÃO NA IMUNOSSINALIZAÇÃO

Além de suas funções citadas anteriormente, foi relatado que o domínio GOLD poderia estar relacionado a funções de regulação na imunidade inata (DOYLE et al., 2012; CONNOLLY; O'NEIL; MCGETTRICK, 2013; LIAUNARDY-JOPEACE; BRYANT; GAY, 2015; NAKANO et al., 2017). Um dos primeiros trabalhos sobre a atuação das TMED no sistema imunológico de mamíferos mostrou que o domínio GOLD da proteína TMED 7 atua na inibição dos receptores transmembranares que detectam lipolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, em particular o receptor Toll tipo 4 (TLR4 Toll-like receptor 4) (DOYLE et al., 2012). Além do domínio GOLD da proteína TMED 7, estudos mostram o envolvimento do domínio GOLD da proteína TMED 1 em processos de regulação imunológica (CONNOLLY; O'NEIL; MCGETTRICK, 2013).

As interleucinas são proteínas que os leucócitos (linfócitos T, eosinófilos e macrófagos) produzem nas respostas do sistema imunológico (AKDIS et al., 2011). Estão envolvidas na ativação ou supressão do sistema imune, na indução do processo de divisão celular, na fase de citocinese e na geração de memória, conferindo a elas um potencial terapêutico de destaque em um grande número de doenças (BROCKER et al., 2010; AKDIS et al., 2011; GUI et al., 2016). Na família da interleucina do tipo 1, existe um receptor de interleucina 1 (IL1RL-1), conhecido como ST-2 que significa “supressão de tumorigenicidade 2” (do inglês “*suppression of tumorigenicity 2*”), e apresenta duas isoformas principais a transmembranar ou celular (ST-2L) e a solúvel ou circulante (sST2) (PASCUAL-FIGAL; JANUZZI, 2015; VILLACORTA; MAISEL, 2016).

Após vários anos sendo tratado como receptor órfão, foi descoberto que o receptor ST2 interage com a interleucina-33 (IL-33), que é semelhante a IL-1, gerando respostas imunes mediadas pelas células-T e em doenças infecciosas, asma e respostas alérgicas (LIEW; LIU; XU, 2005; OBOKI et al., 2010). A IL-33 também é capaz de atenuar as respostas de sepse (NASCIMENTO et al., 2017). Além disso, o processo de sinalização IL-33/ST2 possui potencial de ser um biomarcador de doenças cardiovasculares (OBOKI et al., 2010; MILLER; LIEW, 2011). O mecanismo de detecção da IL-33 pelo ST2 envolve a cascata de sinalização que ativa a via das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases/ MAPK) e da via do fator nuclear kappaB (factor nuclear kappa  $\beta$ /NF- $\kappa\beta$ ) (OBOKI et al., 2010).

Estudos *in vivo* sugerem que a TMED 1 (membro da subfamília  $\gamma$ ) está envolvida na sinalização da IL-33 através de uma interação direta com o receptor ST2 (CONNOLLY; O’NEIL; MCGETTRICK, 2013). Essa interação é mediada pelo domínio TIR (Toll/IL-1 receptor) do ST2 e pelo domínio GOLD da proteína TMED 1 (STRATING et al., 2009; CONNOLLY; O’NEIL; MCGETTRICK, 2013). Além disso, outros estudos mostraram um envolvimento da TMED 1 na expressão de outras interleucinas, como a IL-8 e IL-6 (CONNOLLY; O’NEIL; MCGETTRICK, 2013). Devido ao fato de que a secreção das interleucinas ser necessária para que possam atuar nos processos de sinalização, as descobertas sugerem uma alta relevância das proteínas TMED em processos de sinalização para o sistema imune e de diferenciação celular (AKDIS et al., 2011).

O foco desta dissertação foi obter informações estruturais e características biofísicas/bioquímicas do domínio GOLD da TMED 1 humana (UniProtKB-Q13445). Estes dados em conjunto poderão oferecer à comunidade científica uma visão mais detalhada sobre

as propriedades biofísicas do domínio GOLD e auxiliar numa melhor compreensão de suas funções.

## **1.4 OBJETIVOS**

Devido à importância da compreensão do processo inicial de secreção de proteínas em humanos e os poucos dados existentes na literatura sobre o processo de captura de proteínas a serem secretadas de forma dependente da ação das proteínas TMED, são necessários trabalhos que possam caracterizar *in vitro* os membros da família das TMED. Em particular, nos interessa estudar as propriedades biofísicas e bioquímicas do domínio GOLD da proteína TMED 1.

### **1.4.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o domínio GOLD da proteína TMED 1 em relação às suas propriedades biofísicas, bioquímicas e a sua estrutura tridimensional em alta-resolução, fornecendo dados experimentais que levem à sua melhor compreensão.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolvimento de um protocolo eficiente de expressão heteróloga e de purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1.
- Caracterização estrutural da proteína recombinante utilizando-se diferentes abordagens que compreendem as cristalográficas e não cristalográficas de baixa-resolução.
- Caracterização termodinâmica da proteína recombinante utilizando-se uma abordagem multitécnicas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Nesta subseção estão as etapas para a obtenção do domínio GOLD da proteína TMED 1 passando pela clonagem, pela escolha da linhagem de *Escherichia coli* (*E. coli*), os plasmídeos utilizados para a propagação de DNA, a expressão protéica, a purificação, a eletroforese em condições desnaturantes até a determinação da concentração protéica.

#### 2.1.1 Clonagem

O CDS do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana foi clonado na etapa inicial do projeto. Os oligonucleotídeos utilizados foram projetados para conter os sítios de restrição para *NdeI* no 5' e *BamHI* no 3'.

>TMED1-pUC57 mini

```
ATGATGGCGGCGGGTGCGGCGCTGGCGCTGGCGCTGTGGCTGCTGATGCCGCCGGTGGA
AGTGGGTGGTGC GGGTCCGCCGCCGATTCAGGACGGCGAGTTCACCTTTCTGCTGCCGGC
GGGCCGTAAGCAGTGCTTCTATCAGAGCGCGCCGGCGAACGCGAGCCTGGAAACCGAAT
ATCAGGTTATCGGTGGCGCGGGTCTGGACGTGGATTTTACCCTGGAGAGCCCGCAAGGCG
TTCTGCTGGTGAGCGAAAGCCGTAAAGCGGACGGTGTTTCATACCGTGGAGCCGACCGAA
GCGGGTGACTACAAGCTGTGCTTCGATAACAGCTTTAGCACCATCAGCGAGAACTGGTT
TTCTTTGAACTGATTTTCGATAGCCTGCAAGACGATGAGGAAGTTGAAGGTTGGGCGGAG
GCGGTGGAACCGGAGGAAATGCTGGACGTGAAGATGGAAGATATCAAAGAGAGCATTGA
AACCATGCGTACCCGTCTGGAGCGTAGCATTGATGCTGACCCTGCTGCGTGCGTTCGA
AGCGCGTGACCGTAACCTGCAAGAGGGCAACCTGGAACGTGTTAACTTTTGGAGCGCGGT
GAACGTTGCGGTGCTGCTGCTGGTGGCGGTTCTGCAAGTGTGCACCCTGAAACGCTTCTT
CCAAGATAAACGCCCGGTTCCGACCGGATCC
```

>Domínio GOLD da proteína TMED 1 (para pET28a com TEV no N-terminal)

```
AGPPPIQDGEFTLLPAGRKQCFYQSAPANASLETEYQVIGGAGLDVDFTLLESPQGVLLVSESR
KADGVHTVEPTEAGDYKLCFDNSFSTISEKLVFFELIFDSLQD
```



>Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do domínio GOLD da TMED 1:

Forward - CAT GAT CAT ATG GAA AAC TTG TAT TTC CAG GGA CCG CCG CCG ATT C

*NdeI* TEV Site (ENLYFQG)

Reverse - CAT GAT GGA TCC CTA ATC GTC TTG CAG GCT ATC

*BamHI* Stop códon

O domínio GOLD da proteína TMED 1 humana foi amplificado a partir da CDS da proteína TMED 1 e compreende os aminoácidos 24 a 130. Nesta construção, a região N-terminal contém uma cauda de hexa-histidinas e um sítio de TEV protease utilizado para a clivagem. O produto da amplificação foi inserido em um vetor pET28a para a expressão. O sucesso do procedimento foi confirmado pelo sequenciamento de ambas as fitas de DNA em um sequenciador de DNA automatizado, no Hemocentro de Ribeirão Preto. A sequência CAT GAT foi utilizada para facilitar a etapa de subclonagem.

### 2.1.2 Linhagens de *Escherichia coli* e protocolo de transformação

Para manutenção e propagação dos vetores plasmidiais, foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH5- $\alpha$ . A linhagem Origami<sup>TM</sup> 2 (DE3) (*Novagem*) foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. Os vetores, com os respectivos insertos, foram transformados por choque térmico nas cepas de *E. coli* quimicamente competentes em cloreto de cálcio. Essas bactérias foram cultivadas em meio LB sólido contendo ágar 1% e Canamicina 50  $\mu$ g/mL e Tetraciclina 12,5  $\mu$ g/mL. As colônias transformantes em DH5- $\alpha$  foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50  $\mu$ g/mL de Canamicina e Tetraciclina 12,5  $\mu$ g/mL, a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após 18 horas, o DNA foi extraído novamente com o Kit de Miniprep da Promega, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. As soluções contendo os DNAs de interesse foram armazenadas a -20°C.

### 2.1.3 Expressão heteróloga

As colônias transformantes de Origami 2 (DE3) foram previamente inoculadas em 5 mL de meio LB (pré-inoculos), contendo Canamicina 50  $\mu$ g/mL e Tetraciclina 12,5  $\mu$ g/mL, por

18 h sob agitação de 200 rpm à 37 °C. Os pré-inóculos foram utilizados para propagação celular em 1 L de meio LB contendo os antibióticos Canamicina 50 µg/mL e Tetraciclina 12,5 µg/mL. As células foram cultivadas nas mesmas condições até que se atingisse a densidade óptica (DO) de 0,8 em 600 nm (aproximadamente 4 h). Após testes de expressão variando temperatura, a temperatura foi reduzida para 18 °C e a expressão proteica foi induzida adicionando-se isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) (*Sigma Aldrich*) a uma concentração final de 0,5 mM. As condições foram mantidas por 18 h. Ao final da expressão, a cultura de células foi centrifugada em uma centrífuga Sorvall RC6+ da *ThermoScientific*, rotor FIBERLite® F14-6x250y durante 10 minutos a 7000 x g. As células sedimentadas foram ressuspensas em 20 mL de tampão PBS 1X (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0018 M, pH 7,4) + 0,5% Triton X-100. A solução de células foi posteriormente estocada a -80°C ou utilizada na sequência para o preparo do extrato protéico.

#### 2.1.4 Purificação da Proteína Recombinante

A lise celular foi realizada com as alíquotas de 10 mL utilizando-se um sonificador BRANSON *Digital Sonifire*®, *Soni-tech*, operando em uma amplitude de 15% por 20 minutos (alternando 5 s de sonicação com intervalos de 10 s). As amostras foram mantidas em gelo durante todo procedimento de descongelamento e lise celular. Na primeira etapa de purificação, as frações solúvel e insolúvel de cada amostra foram separadas por centrifugação a 4 °C, 20.000g por 20 min.

A etapa de purificação subsequente foi feita em cromatografia líquida de afinidade, sendo a fase estacionária constituída de 3 mL de resina Ni-NTA Agarose (*Qiagen*). O extrato solúvel foi aplicado na coluna, previamente equilibrada com tampão PBS 1X. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de PBS 1X + Imidazol 20 mM, para eluição de eventuais contaminantes com baixa afinidade pela matriz. A eluição da proteína foi feita em 10 mL de tampão de eluição (PBS 1X + Imidazol 500 mM). Em seguida, a solução contendo a proteína foi concentrada em um tubo de centrifugação Amicon® Ultra-15 3000 MWCO (*Millipore*).

Quando necessária a remoção da cauda de histidina, a solução obtida após a eluição em Ni-NTA foi quantificada e foi adicionado uma quantidade quatro vezes maior em massa de TEV protease (mg/mg). A solução foi posteriormente submetida à diálise em tampão Dia (Tris 10 mM, pH 8,0 e NaCl 100 mM) por 16 h a 4 °C, sob leve agitação. Essas amostras foram

recromatografadas em coluna de níquel, onde a TEV e a His-Tag ficaram retidas e, em seguida, concentradas em Amicon® Ultra-15 3000 MWCO (*Millipore*).

O último passo da purificação consistiu na cromatografia de Troca Iônica realizada no equipamento AKTA *purifier GE*, utilizando-se a coluna de troca iônica Mono q 5/50 (*GE Healthcare*), previamente equilibrada nos tampões A (Tris 20 mM, pH 8 e NaCl 20 mM) e B (Tris 20 mM, pH 8,0 e NaCl 500 mM).

### 2.1.5 Eletroforese em Condições Desnaturantes

As alíquotas coletadas durante as etapas de purificação foram diluídas em tampão da amostra para SDS-PAGE, que contém em sua composição SDS, Tris, corante azul de bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol, e posteriormente aquecidas a 98 °C por 5 min. A eletroforese foi realizada em gel de Tricina 16% (SCHÄGGER, 2006) a 200 V, utilizando-se um sistema vertical da BioRad, *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel (cerca de 50 min). A coloração das bandas proteicas foi realizada utilizando-se *Coomassie Blue* 0,2% (p/v) preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

### 2.1.6 Determinação da Concentração Protéica

Utilizando-se o valor de absorção óptica medido em 280 nm no equipamento NanoDrop 2000 da *ThermoScientific* foi calculada a concentração da proteína seguindo-se a lei de Lambert-Beer. O coeficiente de extinção molar teórico para a construção completa com a cauda de histidinas e sítio de TEV ( $\epsilon$ ) é de 0,412 g/L ou 6085 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e com a clivagem eficiente o coeficiente de extinção molar teórico ( $\epsilon$ ) é de 0,395 g/L ou 4595 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. O cálculo de  $\epsilon$  foi feito pelo programa *ProtParam tool*, disponível no servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://web.expasy.org/protparam/>), considerando a composição de resíduos de aminoácidos.

## 2.2 ANÁLISE ESTRUTURAL E DE ESTABILIDADE

### 2.2.1 Dicroísmo Circular

As mudanças conformacionais na estrutura secundária foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) na região espectral do UV-distante (195-260 nm). Os experimentos de CD foram realizados utilizando-se o equipamento Jasco J-810 CD Spectrometer (Jasco Corporation, Japan) equipado com controlador de temperatura Peltier. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os parâmetros experimentais foram: velocidade de varredura  $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , passo de 1 nm, e tempo de resposta de 0,5 s. O espectro final obtido é resultado da média entre 9 varreduras realizadas. O preparo da amostra para a coleta de dados de CD envolveu primeiramente a diluição da amostra proteica concentrada em uma solução estoque de tampão 20 mM fosfato de sódio, pH 8.0. A diluição foi de pelo menos 20 vezes, para uma concentração final de proteína de 0,15 mg/mL. A deconvolução dos espectros obtidos foi realizada utilizando-se o programa BeStSel (MICSONAI et al., 2018). Para mensurar a qualidade dos ajustes do espectro teórico obtido em relação ao observado experimentalmente, foi utilizado o desvio quadrático médio normalizado da estrutura secundária (NRMSD, do inglês *Normalized Root Mean Square Deviation*) ( $0 < \text{NRMSD} < 1$ , onde 0 é o ajuste perfeito e 1 um ajuste insatisfatório) (MAO; WACHTER; WALLACE, 1982).

Os estudos comparativos de CD da proteína com e sem a cauda de histidina foram realizados no espectropolarímetro Jasco 815 (Jasco Corporation, Japan), que possui um módulo Peltier acoplado para o controle de temperatura. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 nm no intervalo de comprimento de onda de 200 a 260 nm (UV distante) utilizando cubetas de quartzo de 1 mm, uma velocidade de varredura de  $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$  e a temperatura variada entre  $20^\circ \text{C}$  e  $80^\circ \text{C}$  (de  $20$  a  $40^\circ \text{C}$  e de  $60$  a  $80^\circ \text{C}$  em intervalos de  $10^\circ \text{C}$  e de  $40$  a  $60^\circ \text{C}$  em intervalos de  $2^\circ \text{C}$ ). Após o aquecimento até  $80^\circ \text{C}$ , o aparelho é programado para retornar até  $20^\circ \text{C}$  e o processo é repetido a fim de se verificar a taxa de reversibilidade do processo. O espectro resultante foi obtido a partir de 4 acumulações para melhorar a relação sinal/ruído.

### 2.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Luis Guilherme Mansor Basso em um equipamento MicroCalorímetro VP-DSC MicroCal (Microcal, Northampton, MA, EUA) usando-se uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. Os termogramas foram registrados de 20 a 95 °C, a uma pressão controlada de 1,6 atm e taxa de varredura de 60 °C e de 90 °C. As linhas de base do tampão foram registradas antes dos experimentos de desenovelamento da proteína para registrar a história térmica no calorímetro.

A reversibilidade da transição do desenovelamento proteico foi investigada por meio da coleta de varreduras de aquecimento consecutivas. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. A taxa de reversibilidade (%) é dada por:

$$\% \text{ Reversibilidade} = \frac{\Delta H_n}{\Delta H_1}$$

onde  $\Delta H_1$  e  $\Delta H_n$  são as variações de entalpia da primeira e n a segunda (ou terceira) leitura, respectivamente.

Com o objetivo de melhor compreender o estado oligomérico da proteína, foram realizados experimentos com a proteína eluída da cromatografia de troca iônica e após a diálise de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 20 mM de NaCl e em 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 300 mM de NaCl. A entalpia de van't Hoff ( $\Delta H_{vH}$ ) foi calculada como:

$$\Delta H_{vH} = 4R(T_{\max})^2 C_{p, \max} / \Delta H_{\text{cal}}$$

onde R é a constante universal dos gases (1.987 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T<sub>max</sub> (= T<sub>M</sub>) é a temperatura absoluta, C<sub>p,max</sub> é o valor máximo do excesso de capacidade de calor, e  $\Delta H_{\text{cal}}$  é a mudança de entalpia calorimétrica, calculada como a área abaixo do pico (MICHELETTO et al., 2017). A concentração das proteínas variou entre 2 e 4 mg/mL. A manipulação e análise dos termogramas, que envolvem a subtração da resposta calorimétrica do tampão, correção da linha de base e a deconvolução dos dados, foram realizadas usando-se o software Microcal Origin.

### 2.2.3 Medidas de Fluorescência da Tirosina

A influência do agente caotrópico ureia na estrutura terciária da proteína foi monitorada através da técnica de fluorescência em estado estacionário no equipamento Hitachi F-7000, equipado com *W xenon arc lamp*. Os estudos de desenovelamento químico foram feitos com uma concentração proteica fixa de 0,2 mg/mL titulando-se ureia entre as concentrações de 0 e 8 M, com variação em passos de 0,3 M entre 0 até 3,9 M, mais as medidas utilizando as concentrações de 5 M, 6 M e 7 M de ureia. Um período de incubação overnight a 4 °C foi realizado para cada condição medida. As medidas foram feitas a 25 °C com as amostras termo estabilizadas à temperatura ambiente.

Devido à inexistência de triptofanos na estrutura primária, a excitação foi realizada nos resíduos de tirosina e o correspondente comprimento de onda foi assim fixado em 260 nm. Os dados de emissão foram coletados entre os comprimentos de onda 280 e 400 nm, com janelas de excitação e de emissão dos monocromadores fixados em 5 nm e velocidade de escaneamento de 240 nm/min. Os dados foram posteriormente tratados utilizando-se o método de Savitzky-golay com polinômio de ordem 2.

### 2.2.4 Cromatografia de Exclusão Molecular Acoplada a Espalhamento de Luz em Múltiplos Ângulos

A cromatografia de exclusão por tamanho acoplada aos estudos de espalhamento de luz em múltiplos ângulos (SEC-MALS) do domínio GOLD da proteína TMED 1 foi realizada em um equipamento de dispersão de luz multiangular miniDAWN TREOS com detectores em três ângulos (43,6°, 90° e 136,4°) e um laser de 659 nm (Wyatt Technology, CA). O módulo de difusão dinâmica da luz AWyatt QELS para determinação do raio hidrodinâmico e um refratômetro Optilab T-rEX (Wyatt Technology) foram usados em sequência com uma coluna analítica de cromatografia de exclusão por tamanho (Superdex 75, GE Healthcare). A Albumina de Soro Bovino (BSA) foi usada como amostra controle. Antes de qualquer medição, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4 °C. O domínio GOLD da proteína foi eluído em uma solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A coleta de dados e as análises SEC-MALS foram realizadas com o software

ASTRA 6.1 (Wyatt Technology). O índice de refração e a viscosidade do solvente foram definidos como 1,331 e 0,890 cP, respectivamente. O valor  $dn/dc$  (incremento do índice de refração) para todas as amostras foi definido como 0,1850 mL/g (um valor padrão para proteínas) (AMARTELY et al., 2018).

### 2.2.5 Ensaios de oligomerização em coluna de exclusão molecular

Para avaliar o estado oligomérico do domínio GOLD da proteína TMED 1 foram realizados ensaios no equipamento AKTA purifier GE, em coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) com variação na concentração de NaCl na solução. Para este experimento a coluna foi calibrada utilizando-se kits comerciais de gel filtração de baixa massa molecular (Gel Filtration Calibration Kits, GE Healthcare). As proteínas utilizadas como padrão foram: Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (44 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), *Acyl-CoA Binding Protein* (ACBP) (~ 10 kDa) (NEESS et al., 2015). Os tampões foram preparados a uma concentração fixa de 20 mM Tris-HCl, pH 8 + NaCl (variando-se a concentração de NaCl em: 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500mM). Para se determinar qual o volume de exclusão molecular da coluna ( $V_o$ ) foi utilizado o Blue Dextran. A massa molecular (MM) para cada proteína foi calculada a partir da curva de calibração  $K_p \times \log(MM)$ , sendo:

$$K_p = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

onde  $V_e$  é o volume de eluição de cada proteína e  $V_t$  o volume total da coluna (24mL). Para este ensaio, o volume aplicado de cada amostra e do domínio GOLD da proteína TMED 1 foi de 100  $\mu$ L em um fluxo de 0,5 mL/min e a absorbância foi monitorada em 280 nm.

### 2.2.6 Fluorimetria Diferencial de Varredura

A estabilidade térmica da proteína foi também avaliada por Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF). Os ensaios foram realizados utilizando-se um equipamento RT-PCR Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), em uma placa de PCR de 96 poços

(Bio-Rad) e selada com fita de vedação de qualidade "PCR flat cap strips" - Flat 8-cap strips (Bio-Rad). Neste ensaio, a temperatura é elevada de 25 até 95 °C a uma taxa de 1 °C/minuto. O aumento gradual da temperatura força o desenovelamento da proteína, expondo seu interior hidrofóbico e cujo processo é monitorado pela variação da fluorescência da sonda extrínseca SYPRO™ Orange (Invitrogen) (492/610 nm), que foi adicionada às soluções de proteína imediatamente antes do uso na concentração de 5X. A temperatura do ponto médio de transição é chamada temperatura de desenovelamento ( $T_M$ ), que é uma temperatura média de transição entre os estados enovelado e desenovelado. O valor de  $T_M$  em um modelo clássico de dois estados foi obtido como a temperatura da intensidade máxima na derivada de primeira ordem da intensidade de fluorescência da laranja SYPRO™ Orange em função da temperatura (ERICSSON et al., 2006; BOIVIN; KOZAK; MEIJERS, 2013).

Os ensaios foram realizados variando-se o pH da solução de 2 até 10 através do uso dos seguintes agentes tamponantes: 50 mM de glicina HCl (pH 2,0-3,0), 50 mM de acetato de sódio/ácido acético (pH 4,0), 50 mM de fosfato de sódio (pH 5,0-8,0), e 50 mM de glicina NaOH (pH 9,0 e 10,0). A concentração protéica do estoque foi de 8 mg/mL e uma diluição de 20 vezes em cada tampão foi utilizada. A fim de se verificar a influência do sal na estabilidade proteica, foi realizada uma segunda rodada de experimentos seguindo-se o preparo acima na presença de 50 mM de NaCl. As amostras foram previamente incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente antes da coleta de dados. Todos os experimentos com DSF foram realizados em triplicata.

### **2.2.7 Cristalização, coleta de dados e resolução de estrutura**

Os experimentos de cristalização foram realizados em colaboração com o Laboratório de Cristalografia de Proteínas (LCP USP-RP), sob supervisão da Prof.(a) Dr.(a) Maria Cristina Nonato, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. A técnica utilizada foi a de difusão de vapor pelo método de gota sentada, utilizando-se a concentração de proteína de 10 mg/mL, a 21 °C. As gotas foram preparadas pela mistura de 1 µL de solução de proteína e 1 µL da solução do reservatório (que continha 500 microlitros). Os experimentos foram realizados por triagem dos kits comerciais: Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research). Os cristais do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana foram obtidos na presença de 0,1 M de acetato de sódio tri-hidratado pH 4,6 + 8% p/v PEG 4000 (Crystal Screen 1 # 37, Hampton Research)



e começaram a aparecer após aproximadamente 14 dias de incubação. Uma vez obtidos os cristais, eles foram embebidos em uma solução crioprotetora (acetato de sódio pH 4,5; 30% de 2-Metil-2,4-pentanediol (MPD) e PEG 4000), colhidos com alças criogênicas e resfriados instantaneamente em nitrogênio líquido. O conjunto de dados foi coletado a 100 K na instalação síncrotron PROXIMA 1 em SOLEIL, França, usando-se um detector EIGER-X 16M (Dectris, Baden, Suíça) a 3.600 quadros com uma etapa de oscilação de 0,1° e foram coletados usando-se um tempo de exposição de 0,1 s por imagem com uma distância cristal-detector de 224 mm. As imagens de difração de raios-X foram processadas e escalonadas com o pacote XDS (KABSCH et al., 2010) e AIMLESS (WINN et al., 2011). A estrutura do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana foi resolvida pela técnica de substituição molecular implementada no programa MOLREP (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010), contido no CCP4 (KABSCH et al., 2010) e usando-se as coordenadas do domínio GOLD da TMED 5 (p242) de camundongo (PDB: 5GU5) como modelo. A reconstrução automatizada do modelo foi realizada usando-se o programa Buccaneer (COWTAN, 2006), refinada com o programa REFMAC5 (MURSHUDOV et al., 2011) e interceptado com inspeção manual de mapas e construção de modelos usando o Coot (EMSLEY et al., 2010). A qualidade do modelo foi verificada usando-se MOLPROBITY (CHEN et al., 2010). As figuras foram preparadas em CCP4MG (MCNICHOLAS et al., 2011).

Os resíduos no arquivo PDB foram numerados considerando-se todos os aminoácidos não nativos presentes na região N-terminal provenientes do vetor de expressão pET28a. A sequência de aminoácidos é representada a seguir e essa numeração também é a utilizada nesta dissertação.

**>Domínio GOLD da proteína TMED 1 com os aminoácidos não nativos no N-terminal (sublinhado):**

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMENLYFQGAGPPPIQDGEFTFLLPAGRKQC  
 FYQSAPANASLETEYQVIGGAGLDVDFTLESPQGVLLVSESRKADGVHTV  
 EPTEAGDYKLCFDNSFSTISEKLVFFELIFDSLQD

### 2.2.8 Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em colaboração com a Dr.(a) Mariana Batista Bunoro. As coordenadas iniciais para o monômero do domínio GOLD da

proteína TMED 1 e para dímero usadas nas simulações foram obtidas a partir da estrutura cristalográfica aqui relatada, resolvida e refinada para resolução de 1,7 Å. Uma camada de solvatação de pelo menos 15 Å foi criada usando-se PACKMOL (MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 2003; MARTÍNEZ et al., 2009) e íons Sódio e Cloro adicionados em uma concentração próxima a 0,15 mol L<sup>-1</sup> para tornar o sistema eletricamente neutro. Todas as simulações foram realizadas utilizando-se o software NAMD (PHILLIPS et al., 2005) com condições de contorno periódicas. Para a proteína, o campo de força CHARMM36 (MACKERELL et al., 1998) foi utilizado, enquanto que o modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) foi utilizado para descrever as moléculas de água. Um raio de corte de 12 Å foi usado para as interações de van der Waals, enquanto as forças eletrostáticas foram calculados com o método PME (*Particle Mesh Ewald*) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). As simulações foram realizadas a 298,15 K e 1 atm, com intervalo de integração (*timestep*) de 2 fs. A temperatura foi mantida constante usando-se a dinâmica de Langevin com um coeficiente de fricção de 10 ps<sup>-1</sup>. O algoritmo Nosè-Hoover foi usado para o controle de pressão, com um período de oscilação do pistão de 200 fs e taxa de decaimento de 100 fs. Ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio na proteína foram restringidas às suas distâncias de equilíbrio usando-se o algoritmo SHAKE, enquanto que o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992) foi usado para água. As estruturas solvatadas foram submetidas às seguintes etapas de minimização e equilíbrio: 1) 1.000 CG (*conjugate gradient*) etapas de minimização de energia e 200 ps de dinâmica mantendo a posição de todos os resíduos fixos. 2) 500 etapas de minimização de energia CG e 200 ps MD mantendo todos os carbonos C $\alpha$  fixos. 3) 2 ns de dinâmica com todo o sistema em movimento. A partir dos sistemas equilibrados, foram realizadas 3 simulações independentes de 100 ns cada sistema.

### 2.2.9 Cálculo de energia livre

O cálculo da energia livre de ligação,  $\Delta G_{\text{bind}}$ , entre o monômero A e o monômero B para formar um complexo dimérico foi realizado usando-se o método MM/PBSA (*Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*) (KOLLMAN et al., 2000; SWANSON; HENCHMAN; MCCAMMON, 2004) conforme implementado no software AMBER18 (CASE et al., 2018). No método MM/PBSA, a energia livre de dimerização ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) é calculada como:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{np}} - T\Delta S$$

onde  $\Delta E_{\text{MM}}$ ,  $\Delta G_{\text{pol}}$ ,  $\Delta G_{\text{np}}$  representam a variação de energia mecânica molecular na fase gasosa, a contribuição polar e a contribuição não polar para a energia livre de solvatação, respectivamente. No método MM/PBSA, o termo de solvatação polar foi calculado resolvendo-se a equação de Poisson-Boltzmann (PB) linearizada e o termo não polar foi determinado com base na área superficial acessível ao solvente (*Surface accessible surface area* SASA). O termo  $T\Delta S$  representa a entropia conformacional, que pode ser estimada por análise de modos normais. Todas as análises de MM/PBSA foram realizadas usando-se o *script* em python MMPBSA.py (MILLER et al., 2012) do pacote AmberTools18 (KOLLMAN et al., 2000). Os cálculos foram realizados utilizando-se 600 *snapshots* extraídos das simulações de dinâmica molecular (200 *snapshots* para cada simulação). A concentração molar de sal foi ajustada para 0,1 M.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO GOLD DA PROTEÍNA TMED 1

A sequência codificante do domínio GOLD da proteína TMED 1 foi clonada anteriormente pelo Dr. Luis Felipe Santos Mendes. A expressão e purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 foi efetuada conforme descrito na seção 2.1. Embora existam trabalhos na literatura que descrevem o domínio GOLD de alguns membros das TMED, como TMED 2 e TMED 10 (NAGAE et al., 2016) e TMED 5 (NAGAE et al., 2017), não existe nenhum trabalho publicado envolvendo o domínio GOLD de uma TMED 1.

Inicialmente, estabelecemos um protocolo de expressão proteica utilizando a linhagem *E. coli* Roseta (DE3), entretanto o rendimento foi considerado baixo (1 mg para cada dois litros de expressão). O baixo rendimento foi identificado inicialmente como sendo devido à presença de uma ligação dissulfeto na estrutura do domínio GOLD que não era corretamente catalisada pela bactéria, provocando problemas de enovelamento que levavam à agregação e explicando a forte presença dessa proteína em corpos de inclusão.

É possível fazer uma correlação entre a presença de um ligação dissulfeto com função estrutural e a presença de cisteínas altamente conservadas, como ocorre com os membros das TMEDs (NAGAE et al., 2016, 2017). A presença desse tipo de ligação reduz o número de conformações possíveis da proteína adotar em solução, o que resulta em uma menor entropia e maior termoestabilidade (T. ZHANG, E. BERTELSEN; ALBER, 1994). NAGAE e colaboradores (NAGAE et al., 2016, 2017), a partir da estrutura cristalográfica, relataram que as cisteínas presentes nas TMEDs possuem uma função estrutural, sendo importante para o correto enovelamento e estabilidade do domínio protéico.

A fim de se melhorar o protocolo inicial e de se obter um maior rendimento de proteína por litro de expressão bacteriana, foram testados protocolos de *refolding*, mas que se mostraram pouco eficazes. De forma a se otimizar a formação da ligação dissulfeto presente teoricamente no domínio GOLD e que sugerimos ser o problema que levava ao baixo rendimento na produção em *E. coli* Roseta (DE3), adquirimos a linhagem *E. coli* Origami 2 (DE3) e um novo protocolo de purificação foi estabelecido (seção 2.1). Com essa nova cepa e o protocolo final otimizados, solucionamos os problemas, obtendo o rendimento adequado. O rendimento final aumentou cerca de 10 vezes quando comparado com o protocolo anterior utilizando a linhagem Roseta. Na **Figura 4** podemos observar que o domínio GOLD da proteína TMED 1 é uma

proteína predominantemente solúvel (**Figura 4** - Coluna 3) e, ao final do processo de purificação por afinidade, foi possível obtermos uma solução protéica com pureza (**Figura 4** - Coluna 7), que é essencial para os estudos subsequentes. Por meio do padrão de migração da proteína, é observado que ela apresenta uma massa molecular aparente entre 11 e 17 kDa, que é condizente com os 14,7 kDa calculados teoricamente pelo programa ProtParam quando acrescidos dos 2 kDa da cauda de histidina e do sítio de TEV.

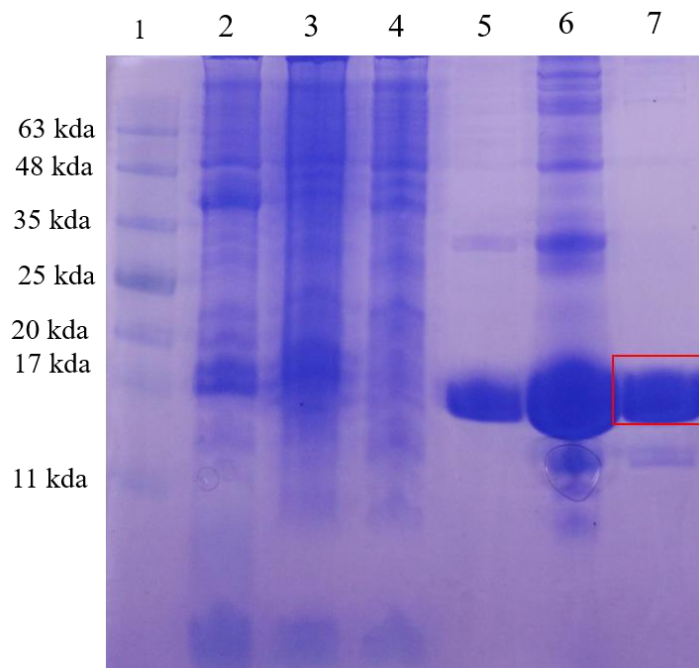


Figura 4: Resultado da purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida de Tricina 16%. Coluna 1 - marcador de massa molecular. Coluna 2 - Pellet. Coluna 3 - Sobrenadante. Coluna 4 - Fração não ligada (coluna de Níquel 20 mM de Imidazol). Coluna 5 - Eluição em tampão (500 mM de Imidazol). Coluna 6 - Pós-diálise de 16 h, eluição em tampão 50 mM de Imidazol. Coluna 7 – Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime Mono q 5/50 GL. A banda de proteína utilizada está destacada no retângulo de cor vermelha. Fonte: elaborada pela autora.

De forma a aumentar a purificação proteica para níveis exigidos nos estudos espectroscópicos e de cristalografia, a solução foi posteriormente submetida a uma cromatografia líquida em uma matriz aniônica. No perfil de eluição, é verificado um pico intenso e fino, o que sugere um alto grau de pureza (**Figura 5**). O sucesso da purificação final foi confirmado também por SDS-PAGE (**Figura 4** - Coluna 7).

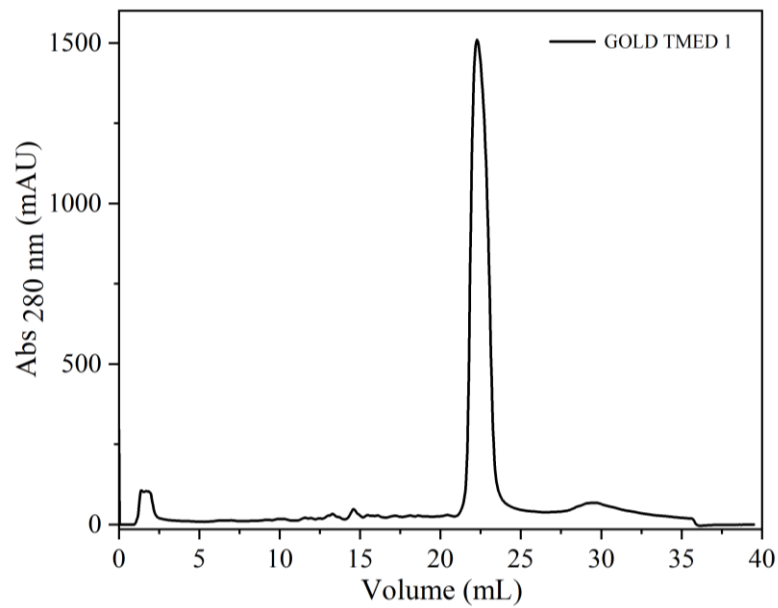


Figura 5: Perfil de eluição do domínio GOLD da proteína TMED 1 na coluna Mono q 5/50 equilibrada com tampão 20mM de Tris (pH 8) e 20mM de NaCl. Fonte: elaborada pela autora.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DOMÍNIO GOLD DA PROTEÍNA 1 EM SOLUÇÃO

### 3.2.1 Avaliação da estrutura secundária

A espectroscopia de CD foi utilizada para analisar o conteúdo de estrutura secundária do domínio GOLD da proteína TMED 1 em solução. O dado de CD mostra que a proteína não exibe mínimos na região de 208 nm e 222 nm, indicativo de alfa hélice, mas exibe um pico negativo na região de 216 nm e um pico positivo em torno de 200 nm. Esse perfil de absorção sugere uma presença predominante de estruturas secundárias do tipo  $\beta$  (**Figura 6**).

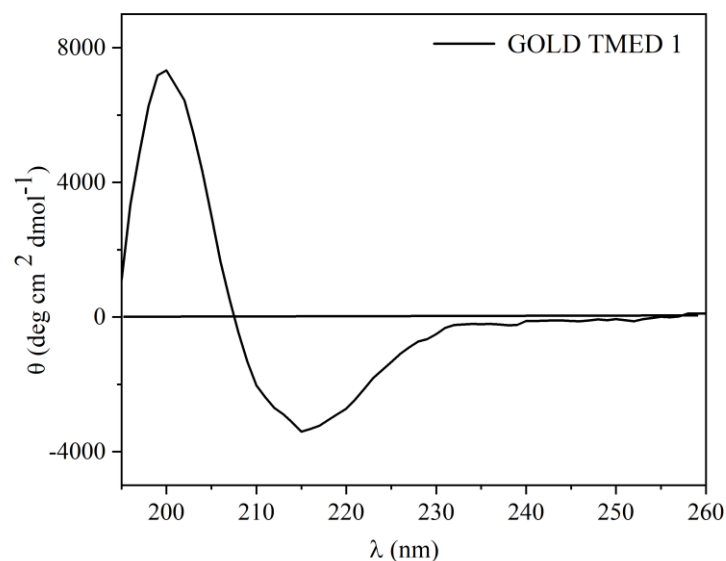


Figura 6: Perfil da estrutura secundária monitorada por CD em tampão fosfato 10 mM de Tris (pH 8). Fonte: elaborada pela autora.

De forma a termos uma análise mais quantitativa do dado de CD, foi realizada a deconvolução do espectro (**Figura 6**). A deconvolução dos dados de CD é valiosa para proteínas sem estrutura tridimensional resolvida e para se verificar a conservação da estrutura em solução. A ferramenta escolhida para tal foi a *β-Structure Selection (BeStSel)* que se destina melhor a este tipo de análise em discussão, ao levar em conta a heterogeneidade das estruturas- $\beta$  (MICSONAI et al., 2018). Na **Figura 7**, observamos a reconstrução teórica a partir dos dados experimentais e assim foi possível estimarmos a composição da estrutura secundária.

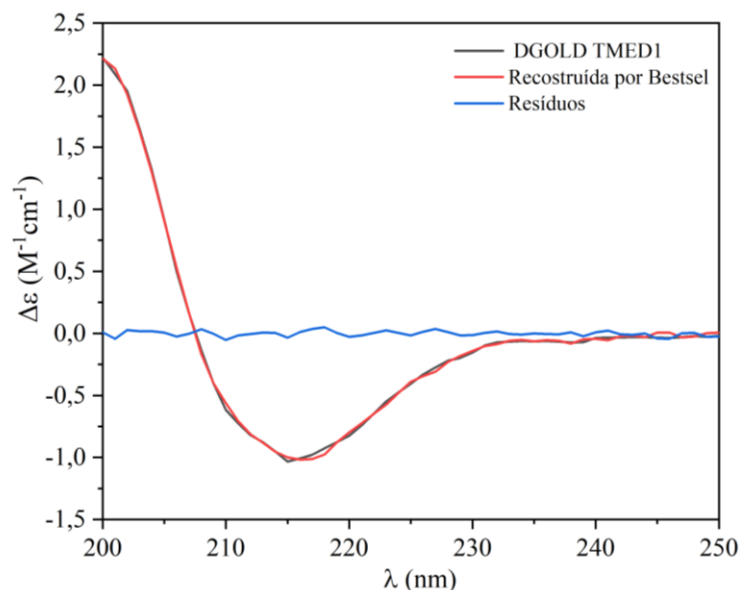


Figura 7: Análise de Dicroísmo circular do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana em solução (preto) usando-se o espectro reconstruído teoricamente pelo programa BeStSel (vermelho). Fonte: elaborada pela autora.

A **Tabela 2** mostra a quantificação de cada elemento da estrutura secundária que é previsto para o Domínio GOLD da proteína TMED 1 em solução por meio do servidor online *BeStSel* (MICSONAI et al., 2018). A quantificação revela que a proteína possui uma composição de estrutura secundária formada por 44,0% de folhas antiparalelas, 11,1% de voltas (do inglês *turn*), 6,1% de  $\alpha$ -hélices e 38,8% de outras estruturas. O baixo valor de RMSD (0.0217) comprova a alta qualidade da deconvolução dos dados, algo já facilmente detectado visualmente na **Figura 7**. Além disso, os dados de cristalografia que ainda serão apresentados nesta dissertação indicam que o conteúdo de estrutura secundária estimado em solução por CD e a estrutura obtida por raios-X estão em excelente acordo.

Tabela 2: Deconvolução dos espectros de CD utilizando o servidor online *BeStSel*. Fonte: elaborada pela autora.

Domínio GOLD da proteína TMED 1 humana					
$\alpha$ - hélices	Folhas $\beta$ - Antiparalelas	Folhas $\beta$ - Paralelas	Voltas	Outros	RMSD
6,1 %	44,0 %	0	11,1%	38,8 %	0,0217



### 3.2.2 Estudos de desenovelamento químico induzido com ureia

De forma a avaliarmos a estabilidade estrutural do domínio GOLD em solução e na presença de agentes externos de perturbação, foram realizados diversos estudos termodinâmicos de desenovelamento protéico. Os espectros de CD no UV distante com o aumento da concentração de ureia são exibidos na **Figura 8A**.

A variação na estrutura secundária do domínio GOLD da proteína TMED 1 foi monitorada pela variação da intensidade de CD em 222 nm (**Figura 8B**), mostrando um aumento gradual na intensidade com a adição de ureia, o que indica a perda da estrutura secundária da proteína. Embora os valores de intensidade de CD em 222 nm sejam tipicamente associados a estruturas helicoidais, esses valores foram aqui utilizados devido à limitação experimental de se medir dados no UV distante em altas concentrações de ureia e de proteína (que no caso foi de 0,15 mg/mL de proteína devido à baixa absorção das ligações peptídicas nessa região quando estruturadas em arranjos do tipo  $\beta$ ). O ponto médio da transição ocorre em aproximadamente 2,8 M. Com o aumento na concentração de ureia para valores maiores que 4 M, a estrutura é completamente desenovelada e a intensidade em 222 nm se mantém constante até o fim da titulação. A transição entre os estados enovelado e desenovelado ocorre de maneira cooperativa e sem a presença aparente de intermediários de desenovelamento.

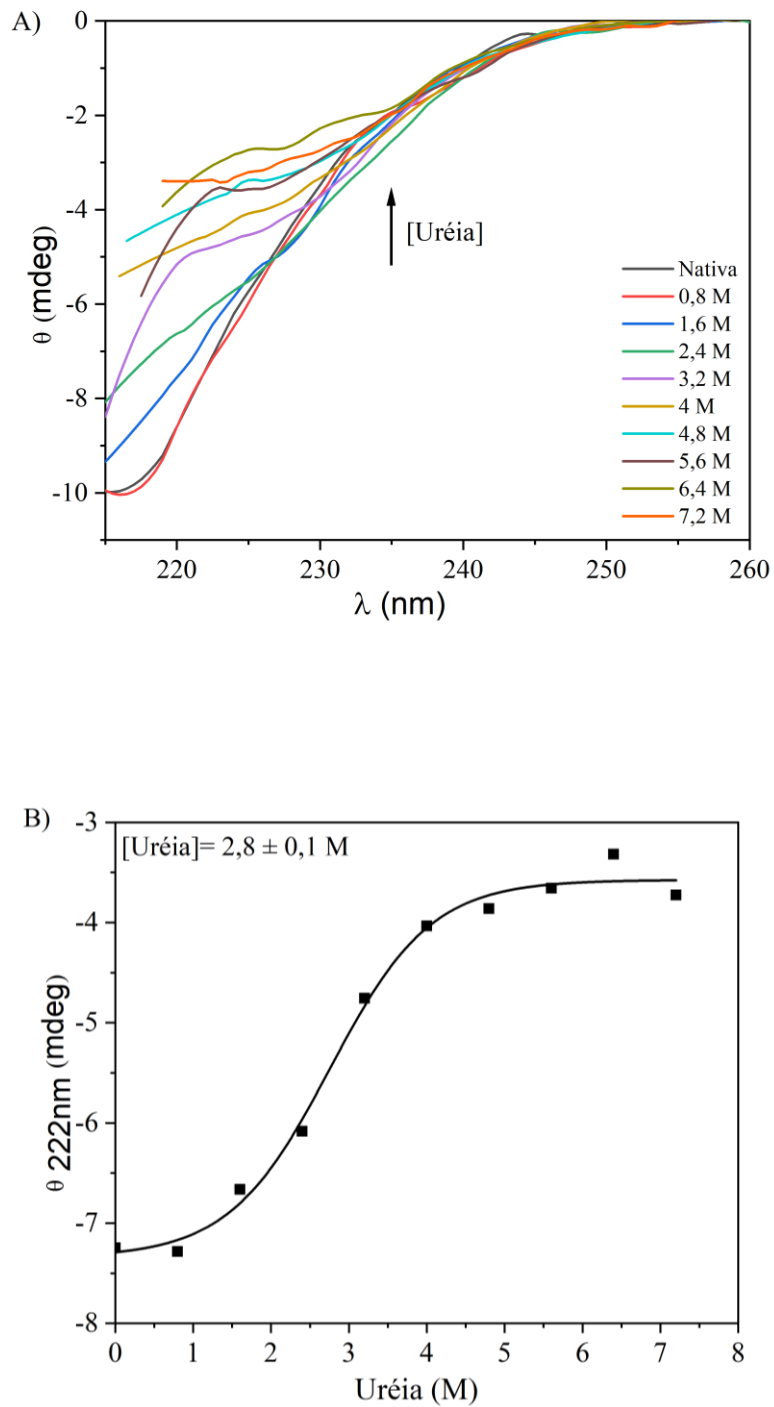


Figura 8: Monitoramento da estrutura secundária por CD no desenovelamento químico. A) Dados de CD no UV-distante do domínio GOLD da proteína TMED 1 com o aumento da concentração de uréia. A seta indica o sentido do aumento na concentração de uréia. B) Elipticidade (mdeg) em 222 nm em função da concentração de uréia. Fonte: elaborada pela autora.

Outra maneira de se monitorar a desnaturação química é avaliando a variação da fluorescência intrínseca da tirosina na presença de ureia. O domínio GOLD da proteína TMED 1 não possui triptofanos (Trp), mas possui três tirosinas (Tyr). A tirosina livre em água possui um máximo de absorção em 275 nm e um máximo de emissão em torno de 305 nm.

Com a titulação da ureia, podemos observar (**Figura 9A**) que ocorre um decréscimo na intensidade dos espectros de fluorescência ao aumentarmos a concentração de ureia, que pode se dever à alteração da viscosidade do meio, acarretando uma mudança do rendimento quântico da fluorescência da Tyr. Podemos inferir que as Tyr estão mais expostas ao solvente, já que se observa um ponto máximo de emissão em ~308 nm. Não são observados deslocamentos aparentes no comprimento de máxima emissão.

Conforme a variação do comprimento de onda de máxima emissão em função da concentração da ureia (**Figura 9B**), podemos observar que o ponto médio da transição ocorreu na concentração de 1,2 M uréia. As Tyr foram expostas rapidamente ao solvente, indicando uma menor estabilidade na desnaturação química. E nas concentrações mais altas (> 3 M de uréia) a intensidade máxima de fluorescência permaneceu constante até 7 M. A curva apresenta um aspecto sigmoidal indicando um comportamento cooperativo.

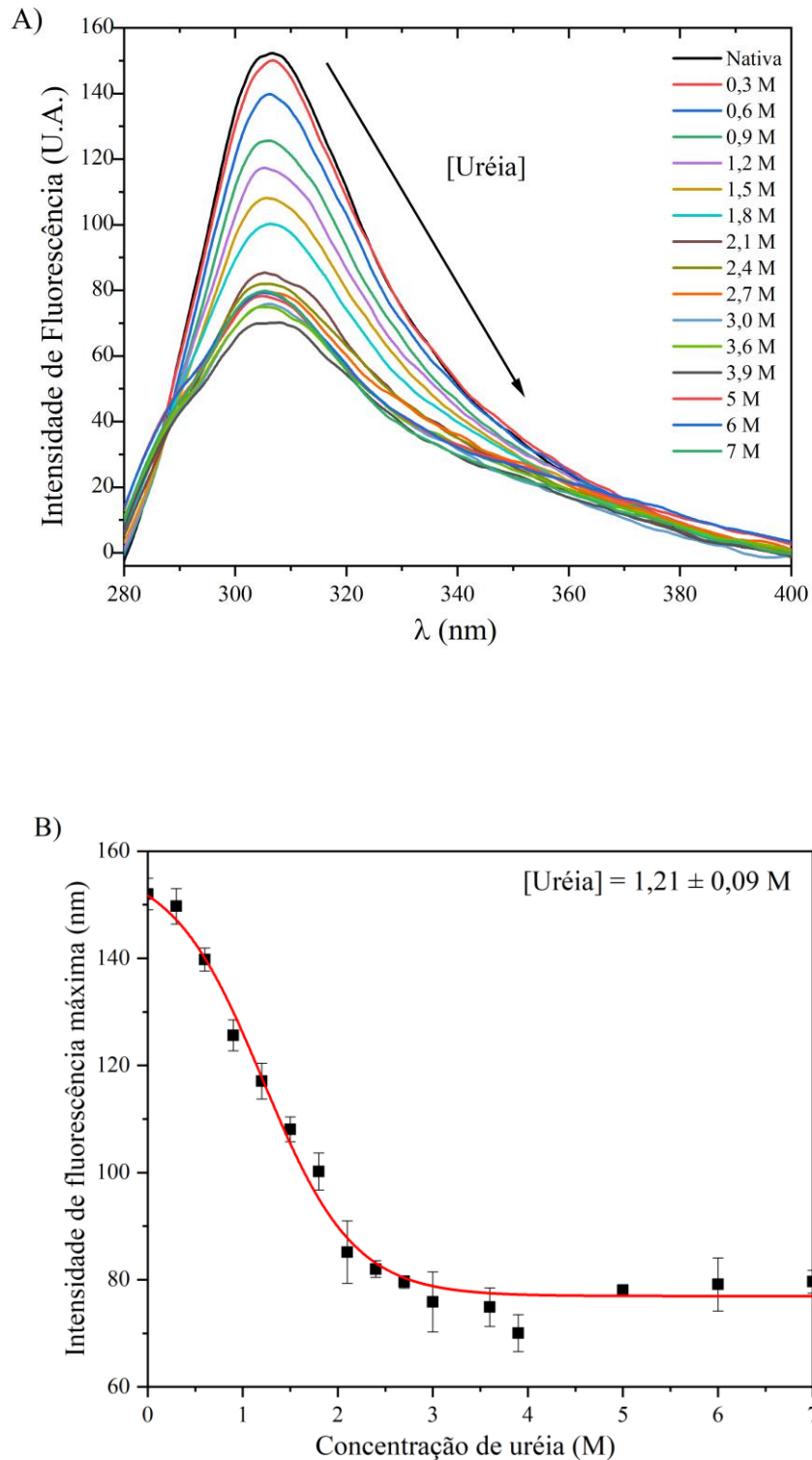


Figura 9: Desnaturação química do domínio GOLD da proteína TMED 1 avaliada pela fluorescência estática da tirosina. A) Espectro de emissão da tirosina de acordo com a variação da concentração da ureia. A seta indica o aumento na concentração de uréia. B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão em função da concentração da ureia. Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2.3 Estudos de desenovelamento térmico

De forma a ampliar os estudos sobre o comportamento estrutural do domínio GOLD da proteína TMED 1 em solução, foi analisado o comportamento termotrópico utilizando-se calorimetria diferencial de varredura (DSC) (**Figura 10**). Os experimentos de DSC são realizados isobaricamente e a integração da curva de calor específico vs. a temperatura fornece a variação de entalpia calorimétrica da transição (BASSO, 2014).

Os termogramas de DSC do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana obtidos com uma taxa de varredura de 60 °C/hora e 1,6 atm foram selecionados para as análises. Para isto, não foi considerada a agregação exotérmica e nem as regiões com precipitação da linha de base pós-transição e nem o início da linha de base da pré-transição. Portanto, a parte efetiva do termograma é correspondente à faixa de temperatura de 30 a 95 °C como mostrado na **Figura 10**, onde se vê um pico de transição em torno de 60 °C. O valor de  $T_M$  elevado indica que o domínio GOLD da proteína TMED 1 é termicamente estável.

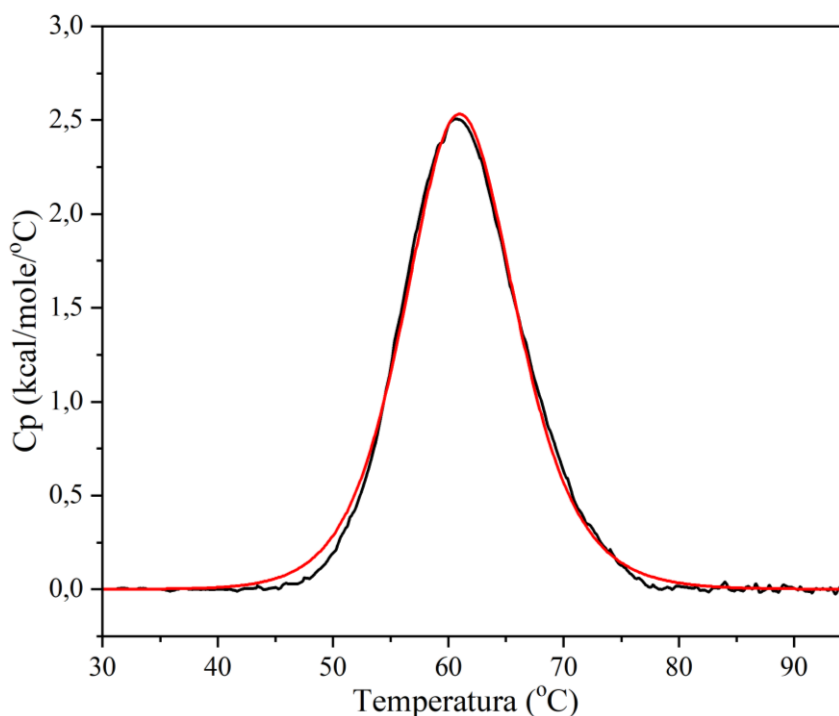


Figura 10: Análises de estabilidade térmica por calorimetria diferencial de varredura do domínio GOLD da proteína TMED 1. A linha em preto indica o termograma após a subtração da linha de base e a linha em vermelho representa a curva teórica com o melhor ajuste dos dados do termograma. A transição do desenovelamento foi ajustada a um modelo de não-dois-estados entre os estados enovelado e desenovelado.

A entalpia calorimétrica ( $\Delta H_{cal}$ ) foi calculada integrando-se a curva de  $C_p$  de varredura de 60 °C/hora ( $\Delta H_{cal}$  de 32 kcal/mol e 26 kcal/mol), conforme apresentado na **Tabela 3**. Em seguida, foi realizado o ajuste linear (*fitting*) de van't Hoff e a entalpia de van't Hoff ( $\Delta H_{VH}$ ) foi determinada para cada varredura (**Tabela 3**). A razão entre a entalpia de van't Hoff e a entalpia calorimétrica ( $K = \Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ ) foi determinada para cada varredura. A razão entre as mudanças de entalpia calorimétrica e de van't Hoff sugerem que o desenovelamento não seguindo um modelo clássico de 2 estados, mas envolvendo intermediários. O valor da razão entre essas variações na entalpia é de aproximadamente 2, o que poderia sugerir uma dissociação do dímero através de uma via de desenovelamento de dímeros para monômeros. Os dados de DSC, embora coletados em uma condição de alto teor de sal, sugerem, assim, a existência de um dímero. Importante ressaltar que, independentemente do modelo utilizado, as análises foram realizadas a partir dos dados experimentais e que os valores teóricos obtidos de  $\Delta H_{VH}$  e de  $\Delta H_{cal}$  estão de acordo com os valores experimentais observados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos dados experimentais da desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 na concentração de 250  $\mu$ M. Fonte: elaborada pela autora.

Experimentais				Teóricos			
Varredura (°C/h)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$T_M$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$T_M$ (°C)	$\Delta H_{VH}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{Cal}$ (kcal/mol)	<b>K</b>
60	31,7	60,6	11,7	61,1	69	32	2,15
60	25,2	61,2	11,8	61,4	70	26	2,62

Quando a amostra foi submetida a uma segunda varredura de aquecimento consecutiva, um pico de transição foi observado no termograma ainda em torno de 60 °C (**Figura 11**). A razão da mudança de entalpia (**Tabela 3**),  $\Delta H$  experimental, entre a primeira e segunda varredura usada para estimar a reversibilidade entre o enovelamento e o desenovelamento, resultou em cerca de 80%, indicando que a transição do domínio GOLD apresenta reversibilidade parcial.

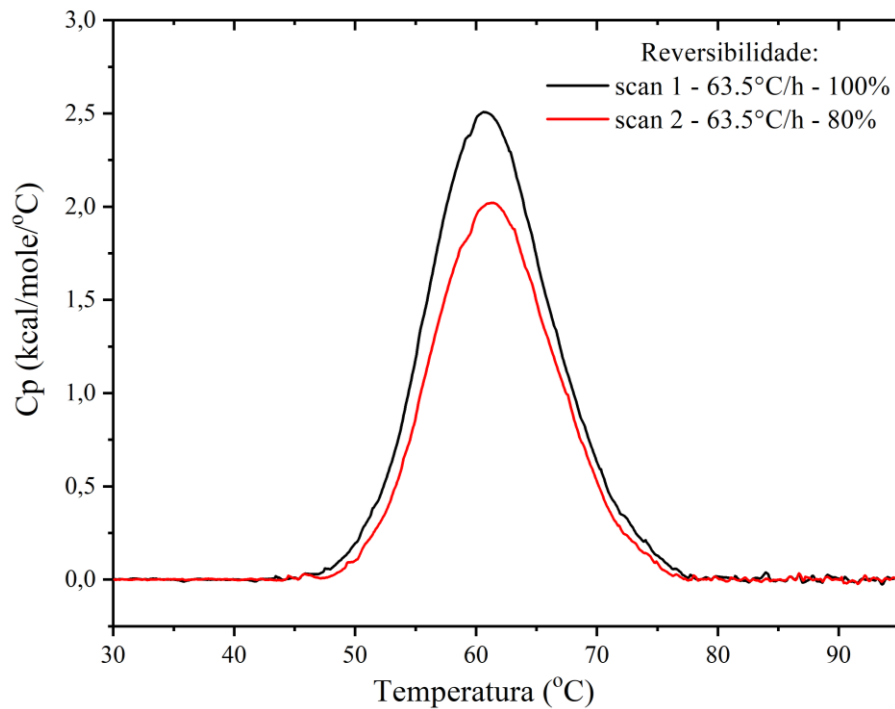


Figura 11: Termogramas de DSC monitorando a reversibilidade térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 por meio do registro de varreduras de aquecimento consecutivas. A porcentagem na inserção é calculada com base no valor  $\Delta H$  de cada varredura em relação à primeira desnaturação térmica.

Ainda explorando a transição de desenovelamento térmico do domínio GOLD da proteína TMED 1, usamos a técnica de Fluorimetria diferencial de varredura (DSF). Esta técnica monitora o desenovelamento térmico de proteínas na presença de um corante fluorescente e geralmente é realizado usando-se um instrumento de PCR em tempo real. Os corantes fluorescentes normalmente usados são altamente fluorescentes em ambiente não polar, como os locais hidrofóbicos expostos pela proteína no início do processo de desenovelamento. Em ambientes polares, tais como a solução aquosa, a intensidade de fluorescência tende a ser significativamente mais baixa. Neste trabalho, o corante fluorescente utilizado foi o SYPRO<sup>TM</sup> Orange, cuja intensidade da fluorescência é representada em função da temperatura. Isto gera uma curva que pode ser descrita por uma transição de dois estados. O ponto de inflexão da curva de transição ( $T_M$ ) é estimado como o máximo de sua primeira derivada. Foram realizados ensaios de estabilidade térmica em função da variação do pH indo de 2 a 10, na presença e ausência de sal (NaCl).

Na ausência de sal, o domínio GOLD da proteína TMED 1 apresentou dependência sigmoidal do  $T_M$  em relação ao pH (**Figura 12**). Em pHs muito ácidos (pHs 2, 3, 4), o valor de

$T_M$  se mostra elevado, entre 56 e 60 °C. Em pH neutro (7-8), o  $T_M$  decai para aproximadamente 48 °C e é ainda mais reduzido em pHs básicos. A razão do comportamento incomum em pHs muito ácidos (pH < 4) ainda não está clara.

Na presença de sal, a dependência do  $T_M$  com a variação do pH se altera significativamente (**Figura 12**). Um aumento considerável de  $T_M$  é observado em comparação aos dados na ausência de sal (**Figura 12**). Isso indica que a força iônica do meio possui uma importante contribuição na estabilidade estrutural desse domínio protéico. Também podemos observar um platô aparente no intervalo de pH 5 ao 8 ( $T_M$  variando entre 70 e 72 °C), enquanto nas extremidades ácidas e básicas ocorre uma queda significativa na estabilidade térmica.

Os valores de  $T_M$  observados no DSF são significativamente maiores do que os observados no DSC em valores de pH próximos ao neutro. O DSF é um método indireto para monitorar o desenovelamento e requer uma concentração muito menor da proteína. Portanto, sugerimos que a estabilidade do domínio GOLD pode ser dependente da concentração devido a uma provável auto associação/oligomerização. Este tópico será discutido com mais detalhes adiante no texto.

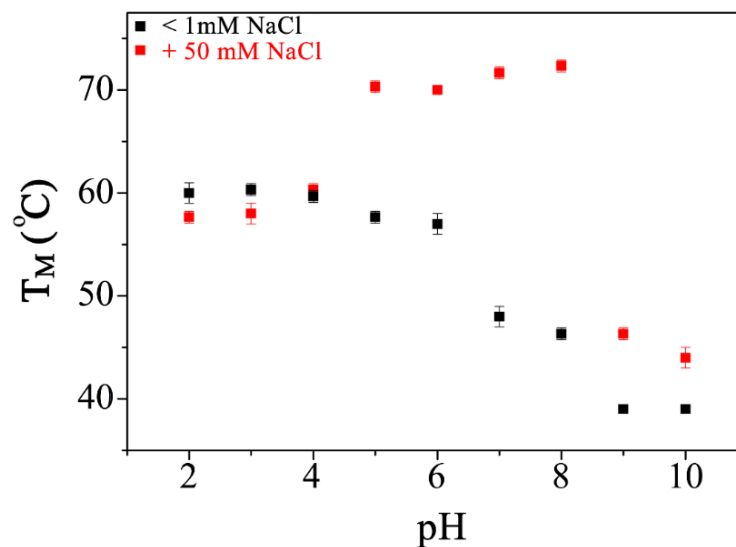


Figura 12: Estabilidade térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 em função do pH, com 8 mg/mL, monitoradas pela fluorescência do SYPRO™ Orange medida por DSF. O  $T_M$  foi obtido a partir da primeira derivada da fluorescência pela temperatura. Os valores de  $T_M$  para as soluções com NaCl inferior a 1 mM e NaCl 50 mM são apresentados em preto e vermelho, respectivamente. A desnaturação foi realizada com variação de pH 2-10. Fonte: elaborada pela autora.



### 3.2.4 Estudos de cristalização

A condição 37 do Crystal Screen TM Hampton com o domínio GOLD da proteína TMED 1 resultou em cristais proteicos confirmados e difratados em alta resolução para a determinação da estrutura (**Figura 13**). O conjunto de dados foi processado no grupo espacial P622. A resolução alcançada foi de 1,7 Å conforme a **Tabela 4**. As condições 40 e 41 do Index também originaram cristais proteicos confirmados, no entanto com baixa resolução ou anisotropia alta, não podendo ser utilizados para a determinação da estrutura.

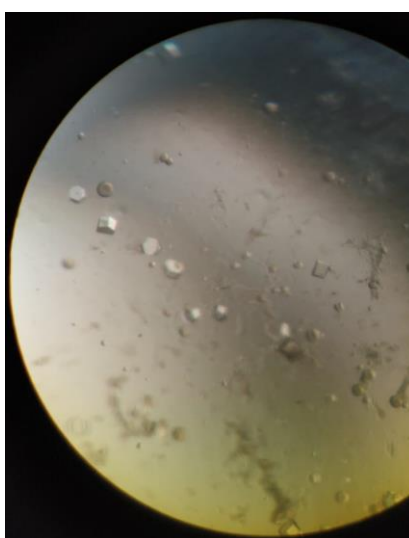


Figura 13: Cristal obtido durante os estágios iniciais de triagem (condição 37 Crystal Screen HR2 - 110 Hampton Research). Fonte: elaborada pela autora.

Cada unidade assimétrica contém três cópias do domínio GOLD sem a presença do peptídeo sinal, compreendendo os resíduos Ala29 e Asp135 da proteína TMED 1 humana (UniProtKB - Q13445). Na estrutura cristalográfica, os resíduos 29-32 e 132-135 foram excluídos do modelo, pois a densidade eletrônica não era identificável. A estrutura final contém três cadeias polipeptídicas (A, B e C) (**Anexo- Figura 1**) e 94 sítios de solvente tratados como oxigênio e água. O refinamento final atingiu um  $R_{\text{work}}$  de 21,2% e  $R_{\text{free}}$  de 23,6%. Os dados cristalográficos envolvendo a coleta de dados, as estatísticas do refinamento e os parâmetros estão na **Tabela 4**. A estrutura cristalográfica foi depositada no banco de dados Protein Data Bank (PDB) sob o código de acesso 7K49 (*Structure of the human TMED1 (p24gamma1) Golgi dynamics domain*).

Tabela 4: Dados cristalográficos e estatísticos para o conjunto de dados coletados

---

<i>Coleta de dados</i>	
Linha de luz	Proxima 1 (SOLEIL)
Grupo espacial	P 6 2 2
Parâmetros de rede	
$a, b, c$ (Å)	151.77, 151.77, 56.12
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90, 120
Faixa de resolução (Å)	45.12 – 1.70 (1.75 – 1.70)
CC-half	1.00 (0.32)
$I/\sigma(I)$	19.5 (0.6)
Completeza (%)	99.8 % (99.7%)
Multiplicidade	39.7 (37.3)
<i>Refinamento da estrutura</i>	
Resolução (Å)	1.70
Nº de reflexões únicas	42,147
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.212/0.236
Número total de átomos	2323
Fatores de temperatura (Å <sup>2</sup> )	34.8
R.m.s. desvios	
<i>Comprimentos de ligação</i> (Å)	0.006
<i>Ângulos de ligação</i> (°)	0.848
Ramachandran Plot	
<i>Favoráveis</i> (%)	98.3%
<i>Permitidos</i> (%)	1.7%

---

O domínio GOLD da proteína TMED 1 apresenta folhas  $\beta$  que também estão presentes em outros domínios GOLD de proteínas TMED (NAGAE et al., 2016, 2017). As folhas  $\beta$  estão organizadas em dois conjuntos de quatro fitas que acabam por definir uma estrutura com um lado côncavo (fitas  $\beta 2$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 4$  e  $\beta 5$ ) e um convexo (fitas  $\beta 6$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 8$  e  $\beta 1$ ) (**Figura 14**). Dois resíduos de cisteína, Cys50 e Cys111, formam uma ligação dissulfeto que faz a ligação entre as cadeias  $\beta 2$  e  $\beta 7$ , indicando um papel estrutural no enovelamento do domínio GOLD da proteína TMED 1. A ligação dissulfeto formada pelas duas cisteínas conservadas também é vista nas estruturas cristalográficas dos domínios GOLD das proteínas TMED 2, 5 e 10 (NAGAE et al., 2016, 2017). Embora a ligação dissulfeto esteja conservada, exposta à água e seja essencial para o enovelamento de proteínas, ainda não está claro se ela poderia desempenhar outras funcionalidades no transporte de proteínas.

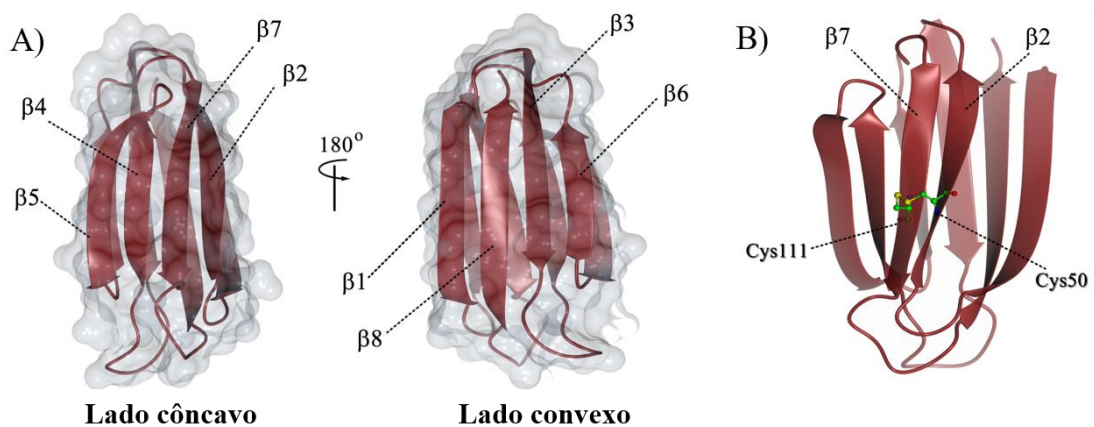


Figura 14: Análises estruturais do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. A) Representação da estrutura cristalográfica com uma superfície parcialmente transparente de ambos os lados côncavo e convexo. Cada fita  $\beta$  que compõe a estrutura é rotulada sequencialmente. B) Representação da ligação dissulfeto formada por ambas as cisteínas 50 e 111 conectando as fitas  $\beta 2$  e  $\beta 7$ .

A presença de uma pequena  $\alpha$  hélice na região C-terminal, foi observada na estrutura do domínio GOLD da proteína TMED 5, submembro da mesma família, e a sua provável importância na organização e manutenção da estrutura para que ocorra a formação de cristal foi discutida (NAGAE et al., 2017). No entanto, em nosso trabalho, a cristalização ocorreu mesmo na ausência desta curta hélice C-terminal (**Figura 15**). Interessante observar que a sobreposição estrutural entre  $C_{\alpha}$  do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana com o domínio GOLD da

proteína TMED 5 de camundongo da espécie *Mus musculus* tem um RMSD de apenas 1,1 Å (Figura 15). A sobreposição do domínio GOLD da TMED 1 monomérico com domínio GOLD da TMED 2 e com o domínio GOLD da TMED 10 monomérica, usando o mesmo método, resulta em um RMSD do  $C_{\alpha}$  de 1,20 e 1,64 Å, respectivamente. Esses dados sugerem que o domínio GOLD possui uma estrutura terciária altamente conservada entre as subfamílias das proteínas TMED.

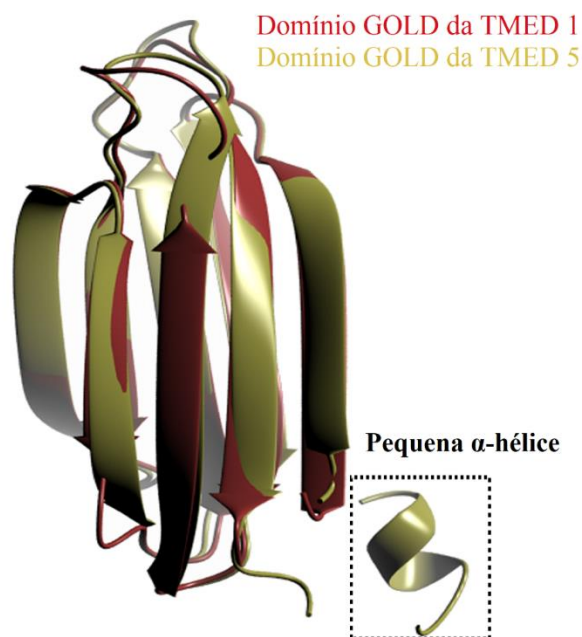


Figura 15: Superposição das estruturas dos monômeros do domínio GOLD da proteína TMED 1 (vermelho escuro) e do domínio GOLD da proteína TMED 5 (dourado) usando o método Gesamt/SSM, conforme implementado em CCP4MG (MCNICHOLAS et al., 2011). A figura foi preparada usando Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG.

### 3.2.5 Formação de oligômeros do domínio GOLD da proteína TMED 1

Existe uma extensa discussão sobre a oligomerização das proteínas TMEDs, tanto em situações de homo quanto de heteroassociação. Foi observado, por exemplo, que os domínios GOLD das proteínas TMED 2 e TMED 10 formam heterodímeros (NAGAE et al., 2016), que foram sugeridos como receptor primário para a Arf1-GDP, uma pequena GTPase que está envolvida na formação das vesículas COPI (CONTRERAS; ORTIZ-ZAPATER; ANIENTO, 2004). Através de abordagens bioquímicas, foi sugerido que as TMEDs formariam

heterotetrâmeros compostos por um membro de cada subfamília (MARZIOCH et al., 1999). Mas em outros estudos foi visto que as TMEDs ocorrem principalmente na forma de monômeros e de dímeros, dependendo de sua localização subcelular (JENNE et al., 2002; STRATING et al., 2009).

Os estudos das proteínas TMEDs *in vivo* indicam a possibilidade que a oligomerização seja conduzida pela região *coiled coil* da proteína (CIUFO; BOYD, 2000; EMERY; ROJO; GRUENBERG, 2000). As análises da estrutura cristalográfica do domínio GOLD da proteína TMED 5 de camundongo sugerem a possibilidade da formação de dímero com base na interação de um monômero na unidade assimétrica com uma molécula relacionada pela operação de simetria  $(x, x - y, -z + 2/3)$  (NAGAE et al., 2017). Para este modelo, a estabilização do dímero se dá por meio das fitas  $\beta_1$  e  $\beta_2$  de cada cadeia e, curiosamente, a hélice  $\alpha$  da região C-terminal preenche o espaço entre as duas fitas  $\beta_2$  (NAGAE et al., 2017). Mesmo com a hipótese da formação de um dímero, não foram fornecidos dados em solução pelos autores. Em nossa estrutura cristalográfica, as três cadeias do domínio GOLD da TMED 1 observadas na unidade assimétrica (A, B, C) podem formar dímeros entre as cadeias A e C e entre a cadeia B e uma molécula a ela relacionada pela operação de simetria  $(-y, -x, -z)$  (**Figura 16**). Além disso, podemos observar que, para o domínio GOLD da proteína TMED 1, a interação entre as cadeias é estabilizada pelas fitas  $\beta_1$  e  $\beta_2$  de cada monômero, que estão estruturalmente organizadas em uma orientação antiparalela (**Figura 16**).

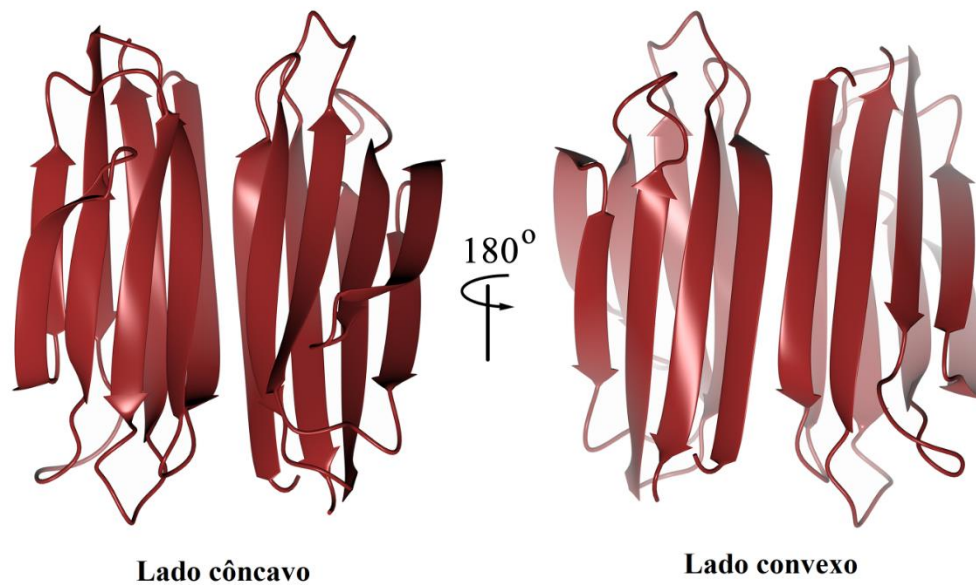


Figura 16: Representação estrutural, em cartoon, do dímero do domínio GOLD da TMED 1 observado na unidade assimétrica. A dimerização preserva os lados côncavos e convexos observados na estrutura do monômero. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG.

Apesar dos modelos de dímero de TMED 1 e TMED 5 envolverem as fitas  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , existe uma área de contato maior entre as fitas opostas na estrutura do domínio GOLD da proteína TMED 1. As fitas  $\beta_2$  interagem diretamente umas com as outras, enquanto no domínio GOLD da proteína TMED 5 elas estão estruturalmente ligadas por meio da curta região de hélice  $\alpha$  (NAGAE et al., 2017).

Os resíduos responsáveis pela manutenção da montagem do dímero do domínio GOLD das proteínas TMED 1 e TMED 5 são totalmente conservados entre esses dois membros da subfamília  $\gamma$ . Entretanto, a sobreposição entre as formas diméricas observadas nos dois casos leva a um RMSD dos  $C_\alpha$  de aproximadamente 13 Å, indicando uma grande disparidade nas suas oligomerização (**Figura 17**).

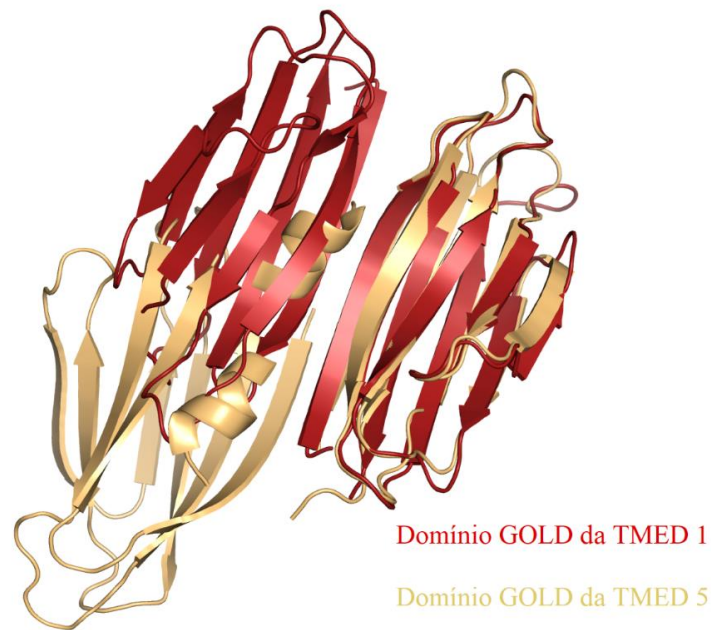


Figura 17: Sobreposição das estruturas do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 (em vermelho) e do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 5 (em dourado). A figura foi preparada usando-se PyMOL.

Por outro lado, quando comparamos nossa estrutura com o domínio GOLD da TMED 10 (PDB: 5AZY), o valor RMSD dos  $C_{\alpha}$  diminui para aproximadamente 2 Å, apesar de sua baixa identidade sequencial. Portanto, com base na montagem dimérica conservada do domínio GOLD da TMED 1 em comparação com TMED 10, é razoável especular que a presença da região de hélice  $\alpha$  no domínio GOLD da TMED 5 está de alguma forma influenciando como a oligomerização ocorre, uma vez que a hélice  $\alpha$  curta está ausente em ambas as construções do domínio GOLD da proteína TMED 1 e da TMED 10.

Conforme nossos estudos, o domínio GOLD da proteína TMED 1 pode formar dímeros independentemente dos domínios restantes que estão ausentes nesta construção e sem ser necessário a presença da estrutura  $\alpha$ -helicoidal que foi predita como necessária para a cristalização do domínio GOLD da proteína TMED 5.

### 3.2.6 Estudos de simulação computacional e cálculo de energia livre para avaliação do provável dímero

Para obtermos mais informações sobre o dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 proposto, a estrutura também foi analisada por simulações de dinâmica molecular (DM). Para avaliar a estabilidade das simulações para os modelos de monômero e dímero, os valores RMSD para a cadeia principal da proteína inteira ao longo de todas as trajetórias foram calculados usando a estrutura cristalográfica como referência. O RMSD dos  $C_{\alpha}$  para o monômero e o dímero permaneceu relativamente baixo ao longo das simulações conforme se observa na **Figura 18**. Embora o RMSD médio para o monômero isolado indicasse maior flexibilidade em comparação com os monômeros ao formar dímeros, este efeito foi provavelmente devido ao aumento da flexibilidade da alça conectando  $\beta_3$  e  $\beta_4$  (resíduos 68 a 75) e não refletiu qualquer mudança conformacional significativa ou desestabilização estrutural (**Figura 18A-B**). Além disso, a distância do centro de massa (do inglês *center of mass distance*, COM) entre os monômeros foi monitorada durante as simulações (**Figura 18C**). Conforme mostrado pelo RMSD e a distância do centro de massa (COM), o dímero TMED 1 é muito estável durante as simulações MD e permanece próximo à estrutura cristalográfica inicial.



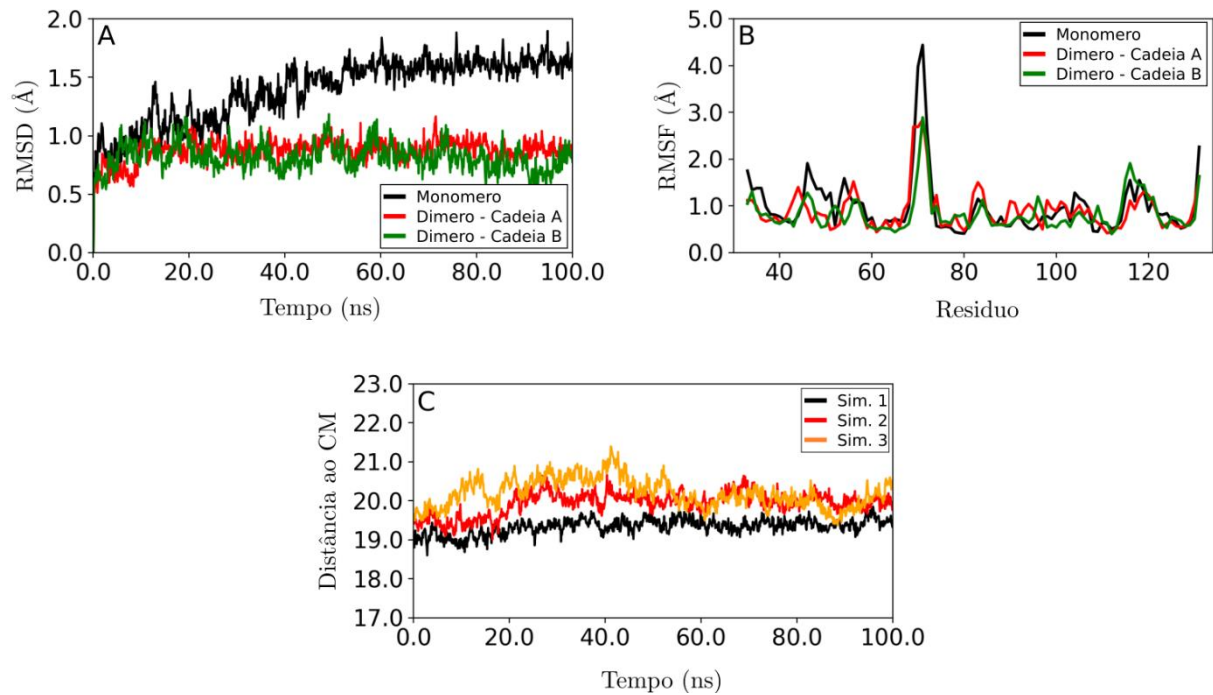


Figura 18: (A) Valores de RMSD ao longo das trajetórias para os átomos da cadeia principal do monômero (curva preta) e cada monômero do dímero (curvas vermelha e verde). (B) RMSD médio do  $C_{\alpha}$  em função do número dos resíduos. (C) Distância do centro de massa (COM) em função do tempo para cada simulação de produção.

A energia livre de ligação foi obtida realizando-se o cálculo de MM/PBSA do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1. A energia livre de ligação é composta por um termo entálpico, com as contribuições da mecânica molecular e da solvatação e um termo entrópico, que é responsável pela diferença nas entropias translacional, rotacional e vibracional. O dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 é entalpicamente estabilizado por aproximadamente -28 kcal/mol. Para sistemas com monômeros semelhantes, o termo entrópico é pequeno quando comparado com o termo entálpico (KOLLMAN et al., 2000; CAMPANERA; POUPLANA, 2010). Para obtermos uma imagem detalhada do mecanismo de dimerização, o  $\Delta G_{\text{bind}}$  foi decomposto por resíduo (**Figura 19**). As contribuições mais significativas para a energia livre de ligação vieram dos resíduos Phe39, Thr40, Phe41, Pro44, Arg47, Phe51, Tyr52, Asp107 e Lys122. Esses resíduos estão localizados na interface de dimerização e estabelecem interações importantes para estabilizar o complexo.

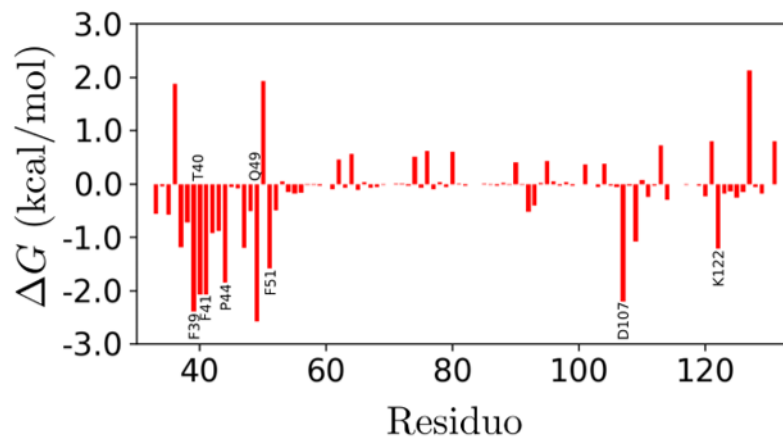


Figura 19: Contribuição por resíduo para a energia livre de dimerização total do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Os resíduos com  $\Delta G < -1,5$  kcal/mol foram marcados.

As cadeias laterais dos resíduos carregados Asp36, Arg47, Asp107 e Lys122 de  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_7$  e  $\beta_8$  formam ligações de hidrogênio intermoleculares (**Figura 20**). Outra ligação de hidrogênio observada nas simulações envolve a cadeia principal de Tyr52 e a cadeia lateral de Gln49 (**Figura 20**).

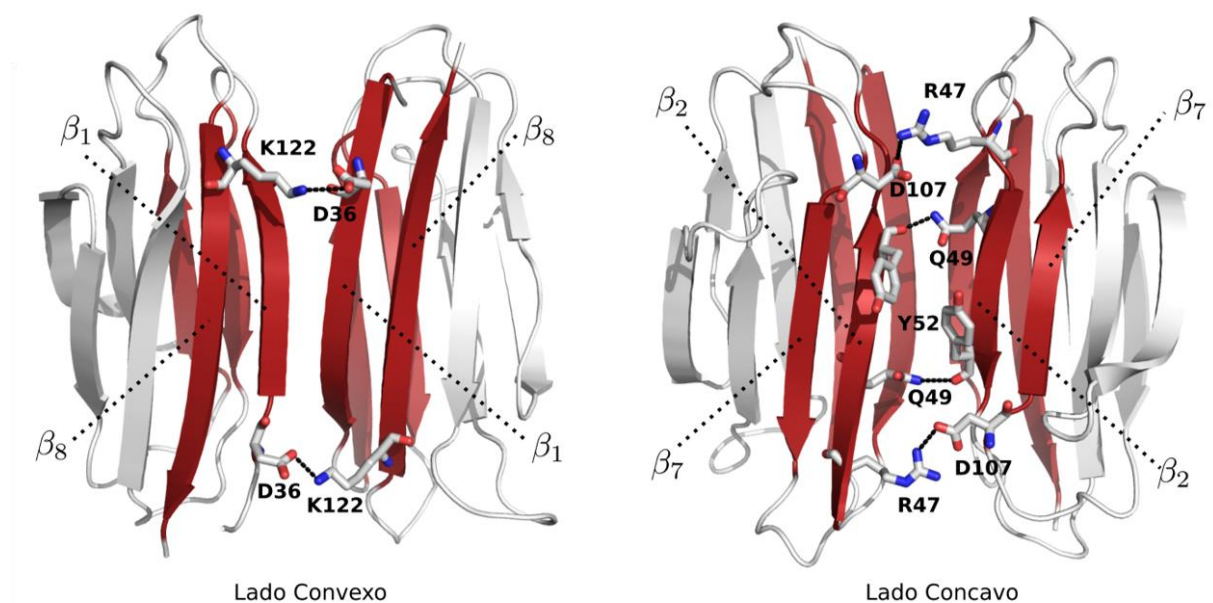


Figura 20: Representação dos pares de ligações de hidrogênio intermoleculares (destacadas em linhas pontilhadas pretas) que contribuem para a estabilização do dímero. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Além das ligações de hidrogênio entre fitas, os resíduos hidrofóbicos localizados na interface (Phe39, Thr40 e Phe51 - **Figura 21**) exibem uma diminuição de sua área de solvente acessível à superfície (SASA) após a dimerização. As reduções no valor de SASA de resíduos hidrofóbicos favorecem a ligação dos monômeros. A ocorrência de interações  $\pi$ - $\pi$  entre três pares aromáticos (Tyr52-Tyr52, Phe39-Phe51 e Phe51-Phe51) também foi observada ao longo das simulações. Portanto, a dimerização é favorecida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações  $\pi$ - $\pi$ .

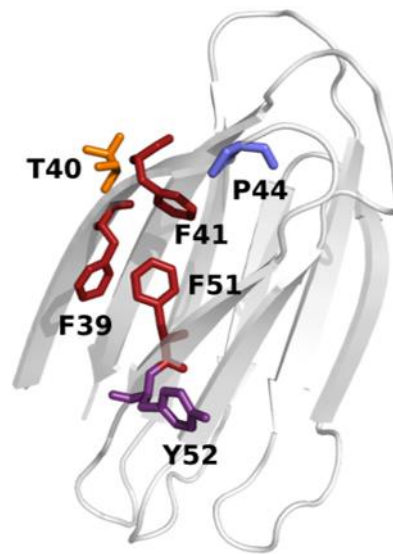


Figura 21: Posição dos resíduos hidrofóbicos e aromáticos na interface de ligação do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Para simplificar, apenas um monômero foi mostrado. A figura foi preparada usando-se Adobe Fireworks® CS6 e VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

### 3.2.7 Estudos de oligomerização em solução

Para determinarmos o estado oligomérico de TMED 1 em solução, foram utilizadas duas técnicas: cromatografia de exclusão molecular e SEC-MALS. Uma vez que a estabilidade do domínio GOLD é fortemente afetada pela concentração de NaCl em solução (**Figura 12**), começamos a analisar o estado oligomérico desta proteína com base no perfil de eluição na cromatografia de exclusão molecular em função da concentração de sal. O perfil de eluição de cada amostra em uma ordem crescente de concentração de NaCl é mostrado na **Figura 22A**. Observa-se que cada pico é estreito e único, sugerindo a pureza e monodispersividade das amostras. É possível acompanhar o volume de eluição das amostras em função da concentração

de sal (**Figura 22B**). O perfil de eluição da proteína mudou de um pico centrado em um volume de 13,5 mL em alta concentração de sal (**Figura 22A**), para volumes de eluição menores com a diminuição na concentração de sal (**Figura 22B**). É importante enfatizar que a mudança no volume de eluição observada para o domínio GOLD da proteína TMED 1 em baixos níveis de sal, especialmente na ausência dele, não pode ser associada a uma interação não específica com a matriz Superdex 75. Se fosse este o caso, esperaríamos maior retenção da proteína na coluna, levando a um maior volume de eluição do que aqueles com alta concentração de sal.

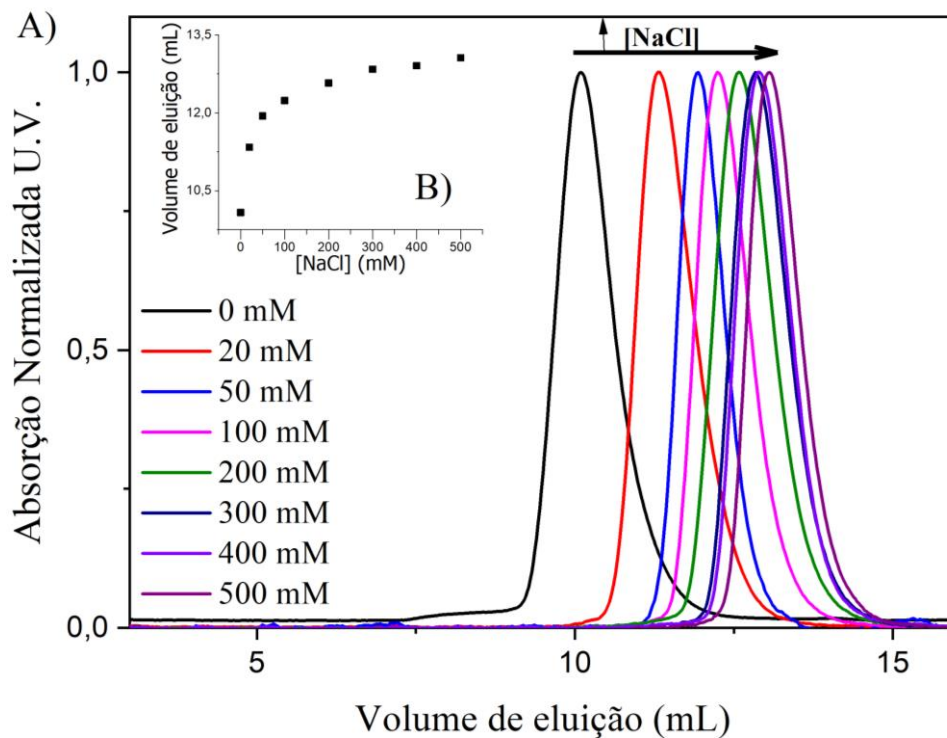


Figura 22: Resultados de cromatografia líquida em coluna de exclusão molecular. O comportamento hidrodinâmico do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana é avaliado com relação ao aumento da concentração de NaCl. A) Resultados de coluna de exclusão molecular para analisar a propensão de oligomerização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana de acordo com a concentração de sal em solução. B) Volume de eluição do domínio *versus* o aumento da concentração de NaCl na solução. Fonte: elaborada pela autora.

O perfil de eluição do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana foi comparado com o de outras proteínas com a massa molecular já conhecida, como descrito na Sessão 2.2.5, e a curva de calibração foi obtida pela relação linear entre o coeficiente de partição de cada uma das proteínas usadas como referência e o logaritmo da massa molecular (**Figura 23**). A massa

molecular aparente encontrada em solução para o domínio GOLD de TMED 1 em baixas concentrações de sal sugere uma estrutura quaternária dimérica.

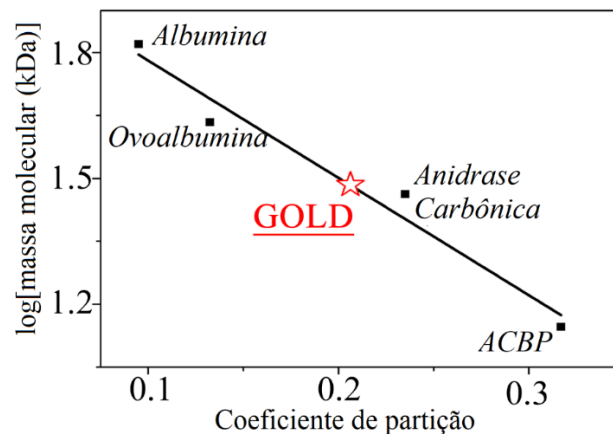


Figura 23: Regressão linear da constante de partição em função do logaritmo da massa molecular, reconstruída utilizando-se proteínas comerciais padrões, na condição de baixa força iônica (20 mM de Tris-HCl, pH8 + 20 mM de NaCl). O valor da constante de partição obtida corresponde a aproximadamente 30 kDa, destaque em vermelho, sugerindo uma organização quaternária dimérica. Fonte: elaborada pela autora.

A técnica de SEC-MALS permite estimar a massa molar (MM) e o raio hidrodinâmico da proteína em solução sem a necessidade de usar proteínas globulares como padrões moleculares (SOME et al., 2019). O domínio GOLD da proteína TMED 1 foi analisado após a purificação. Os dados de SEC-MALS (**Figura 24**) mostram que a solução protéica possui baixo índice de polidispersividade e que o domínio GOLD apresenta uma massa molecular de 13,7 kDa. A massa molecular obtida sugere que o domínio GOLD da proteína TMED 1 humana, nas condições experimentais utilizando máxima concentração de NaCl, existe como um monômero.

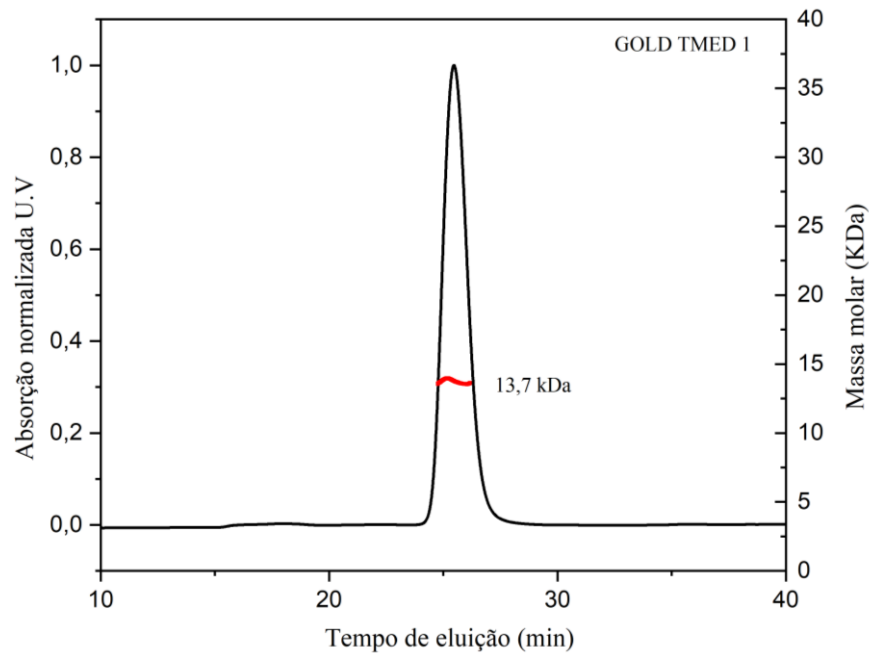


Figura 24: Resultado de SEC-MALS: a oligomerização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana, na concentração de 2,15 mg/mL, foi analisada na condição de alta força iônica (20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 + NaCl 500 mM). Fonte: elaborada pela autora.

A fim de aprofundarmos o entendimento sobre os efeitos da força iônica e da concentração sobre a suposta dimerização, foram realizadas também análises de DSC em alta e baixa concentração de sal (300 mM e 20 mM de NaCl). Normalmente, a comparação entre a variação de entalpia calorimétrica ( $\Delta H_{cal}$ ) e variação da entalpia de van't Hoff ( $\Delta H_{VH}$ ) fornece informações valiosas para avaliar a existência do estado de intermediários ou de oligômeros na transição de um estado enovelado para um estado desenovelado da proteína (FREIRE, 1989). Em um processo ideal de dois estados para o desenovelamento térmico de proteínas, o  $\Delta H_{VH}$  é calculado a partir do  $\Delta H_{cal}$  obtido experimentalmente. Este comportamento foi visto em vários estudos com pequenas proteínas globulares que tem um domínio único (PRIVALOV, 1979; FREIRE, 1995). Se  $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH} < 1$ , o processo de desenovelamento provavelmente envolve a formação de estados intermediários (PRIVALOV PL, 1986; FREIRE, 1995). Por outro lado, uma razão  $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH} > 1$ , indica uma cooperação intermolecular, como é o caso da oligomerização (FREIRE, 1989; BITTAR et al., 2003). Neste caso, a proporção fornece a unidade básica de cooperatividade, ou seja, o número de moléculas que cooperam entre si na transição do desenovelamento.

Os termogramas de DSC para o domínio GOLD da proteína TMED 1 em baixa e em alta concentração de NaCl estão mostrados na **Figura 25**. A relação entre  $\Delta H_{VH}$  e  $\Delta H_{cal}$  varia

entre 1,7 e 2,0 sugerindo a formação de dímero. Em alta força iônica, não apenas o domínio GOLD da proteína TMED 1 é mais estável termicamente ( $T_M$  mais alto), mas também a transição de desenovelamento é mais cooperativa, conforme mostrado pelo estreitamento do pico (valores mais baixos da largura de linha na metade da altura,  $\Delta T_{1/2}$ ).

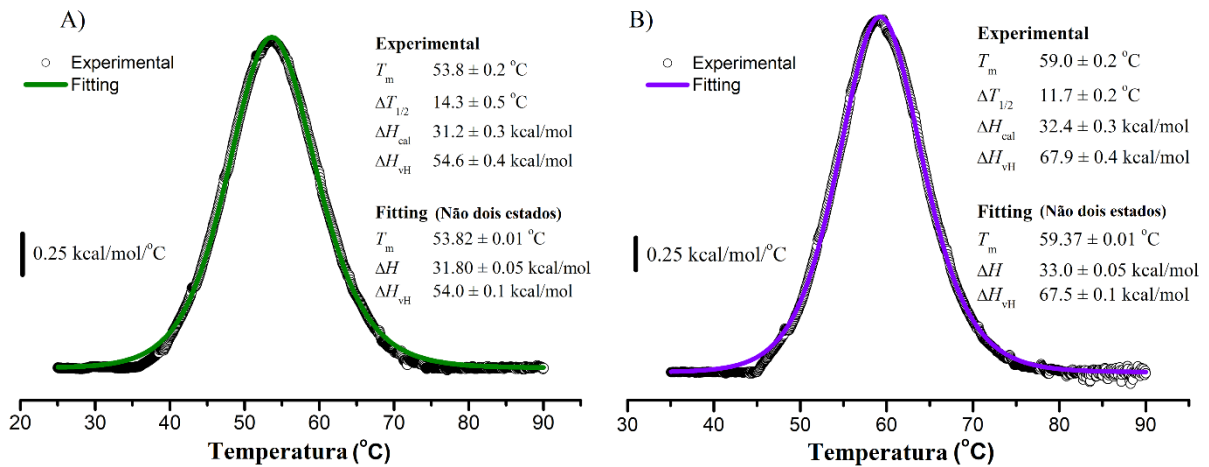


Figura 25: Termogramas do domínio GOLD da proteína TMED 1 em diferentes forças iônicas. A) Força iônica baixa (20 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8) e B) Alta força iônica (300 mM de NaCl e 20mM de Tris-HCl, pH 8), com 205  $\mu$ M e 130  $\mu$ M de proteína respectivamente. Os termogramas corrigidos da linha de base foram desconvoluídos com um modelo de não-dois-estados para o desenovelamento da proteína.

Este resultado sugere que o pico de DSC não se deva a um processo de desenovelamento entre dois estados, mas sim a um que envolva, provavelmente, um intermediário. Na verdade, um modelo de dois estados se ajusta mal às transições em desenvolvimento, conforme mostra a **Figura 26**.

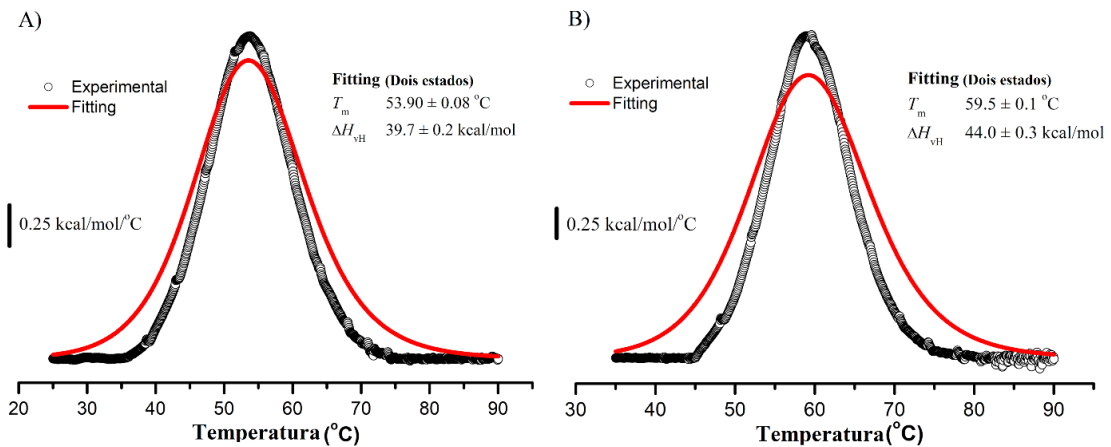


Figura 26: Termogramas do domínio GOLD da proteína TMED 1 em diferentes forças iônicas e ajustes baseados em uma transição que seguiria um modelo de dois estados. A) Força iônica baixa (20 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8) e B) Alta força iônica (300 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 8).

Curiosamente, a normalização do termograma bruto correspondente à condição de alto teor de sal da **Figura 26B** pela concentração de dímero, considerando-a a unidade cooperativa de proteína, produz um processo de dois estados com  $\Delta H_{cal} = \Delta H_{vH}$  de aproximadamente 67 kcal/mol (dados não mostrados) (JOHNSON et al., 1995). Vale ressaltar que, devido a questões de sensibilidade, as concentrações de proteínas usadas nos experimentos de DSC ( $>100 \mu\text{M}$ ) são significativamente maiores do que as usadas nas análises hidrodinâmicas. Portanto, a propensão de dimerização observada nos dados de DSC, em soluções tampão de baixa e alta concentração de sal (**Figuras 10, 25 e 26**), é mais provavelmente devido à concentração de proteína muito maior em comparação com aquelas usadas nas análises de coluna de exclusão molecular (**Figura 22**). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o domínio GOLD da proteína TMED 1 forma dímeros em solução de forma dependente do sal e da concentração e que o dímero observado na estrutura cristalina é estável e energeticamente favorável, portanto, provavelmente sendo a sua organização *in vivo*.

### 3.2.8 Proposta de modelo de ancoragem a COPs

Com base na posição da hélice  $\alpha$  estendida (localizada na região flanqueadora) observada na estrutura cristalina do domínio GOLD da proteína TMED 5, foi proposto que o lado côncavo do domínio GOLD estaria voltado para a superfície da membrana no contexto da



proteína de comprimento total (NAGAE et al., 2017). Nesta situação, o lado convexo estaria orientado para a solução. Poderíamos esperar o mesmo comportamento para o domínio da proteína TMED 1, uma vez que ambos pertencem à mesma subfamília  $\gamma$  e compartilham alta identidade sequencial. Diferente da TMED 5, onde o domínio GOLD se mostra orientado para o lado luminal dos compartimentos intermediários, o domínio GOLD da TMED 1 e o domínio GOLD da TMED 7 foram observados orientados para o citosol, uma característica única dentro da família TMED (CONNOLLY; O'NEIL; MCGETTRICK, 2013). Esta orientação é necessária para a ancoragem e secreção do receptor ST2 (CONNOLLY; O'NEIL; MCGETTRICK, 2013).

A fim de expandir a discussão sobre a orientação do domínio GOLD em relação à superfície da membrana, exploramos o potencial eletrostático da superfície estrutural dos dímeros formados pelo GOLD das proteínas TMED 1 e da TMED 5 (**Figura 27**). Uma característica conservada entre os dímeros propostos para tais proteínas é a grande superfície carregada negativamente formada no lado convexo (**Figura 27**).

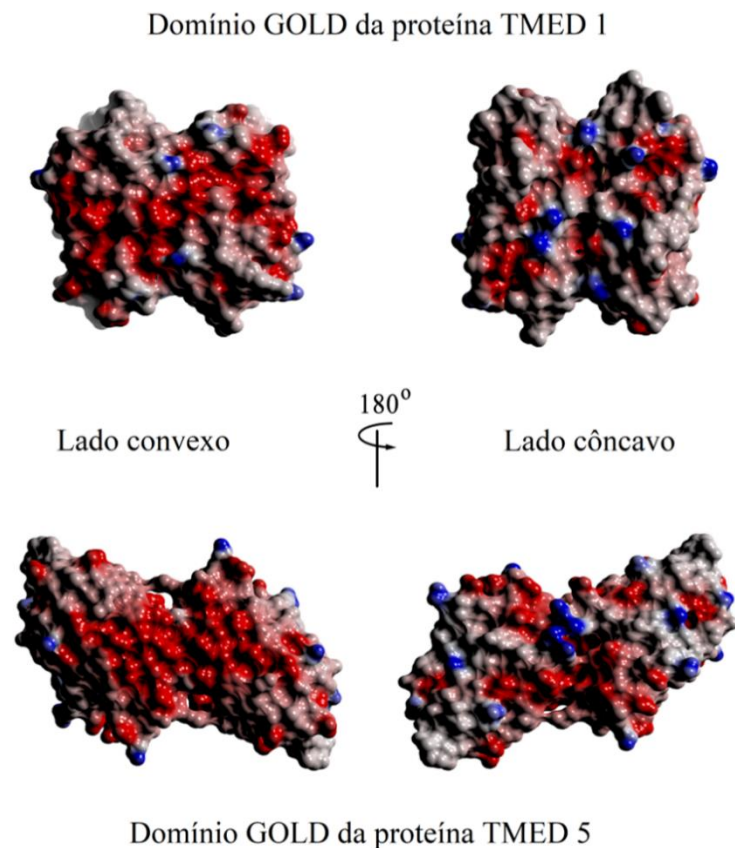
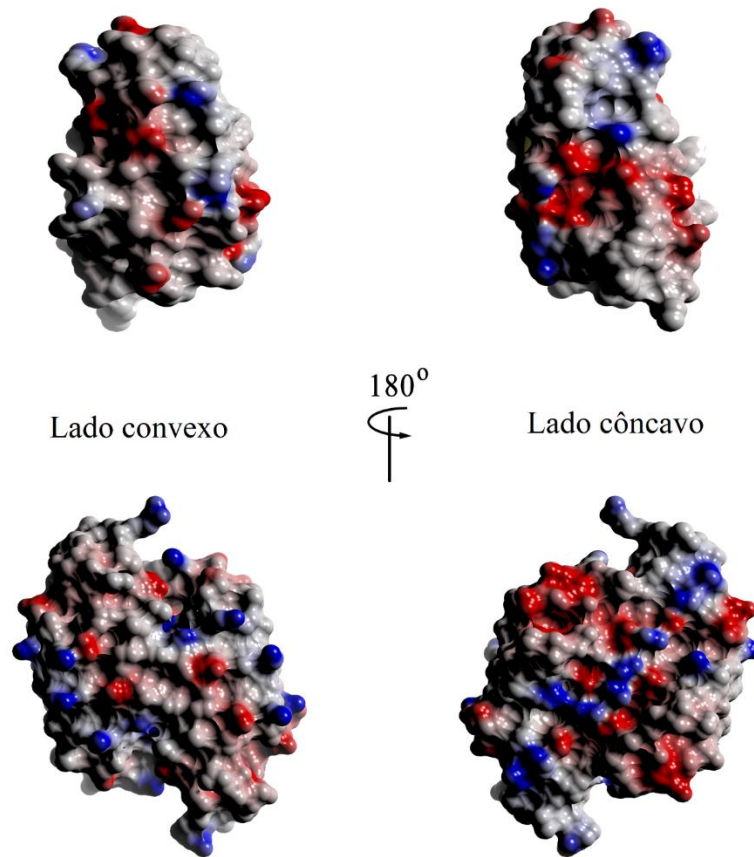


Figura 27: Potencial eletrostático de superfície das estruturas de dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana e do domínio GOLD da proteína TMED 5. A cor da superfície representa o potencial eletrostático na superfície da proteína, indo do azul (potencial de +0,5 V) ao vermelho (potencial de -0,5 V). A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG.

Curiosamente, esta superfície carregada negativamente observada no lado convexo dos dímeros de TMED 1 e da TMED 5 não é observada na TMED 2 e TMED 10 (**Figura 28**), sugerindo que pode ser exclusiva da subfamília  $\gamma$ .

## Domínio GOLD da proteína TMED 2 (Monômero)



## Domínio GOLD da proteína TMED 10 (Dímero)

Figura 28: Mapas do potencial eletrostático de superfície do monômero da proteína TMED 2 (PDB ID 5AZW) e do dímero do domínio GOLD da proteína TMED 10 (PDB ID 5AZY). A cor da superfície representa o potencial eletrostático na superfície da proteína, indo do azul (potencial de +0,5 V) ao vermelho (potencial de -0,5 V). A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG.

Essa característica fortalece o modelo proposto quanto à orientação dos domínios GOLD em relação à superfície da membrana, uma vez que tanto as membranas de Golgi quanto as do RE são enriquecidas em lipídios carregados negativamente, incluindo fosfatidilinositol e esfingolipídios (VAN MEER; DE KROON, 2011). Portanto, espera-se que a superfície carregada negativamente do domínio GOLD da proteína TMED 1 permaneça voltada para o citosol durante seu tráfego na via secretora inicial, enquanto o lado côncavo ficaria voltado para a superfície da membrana (**Figura 29**).

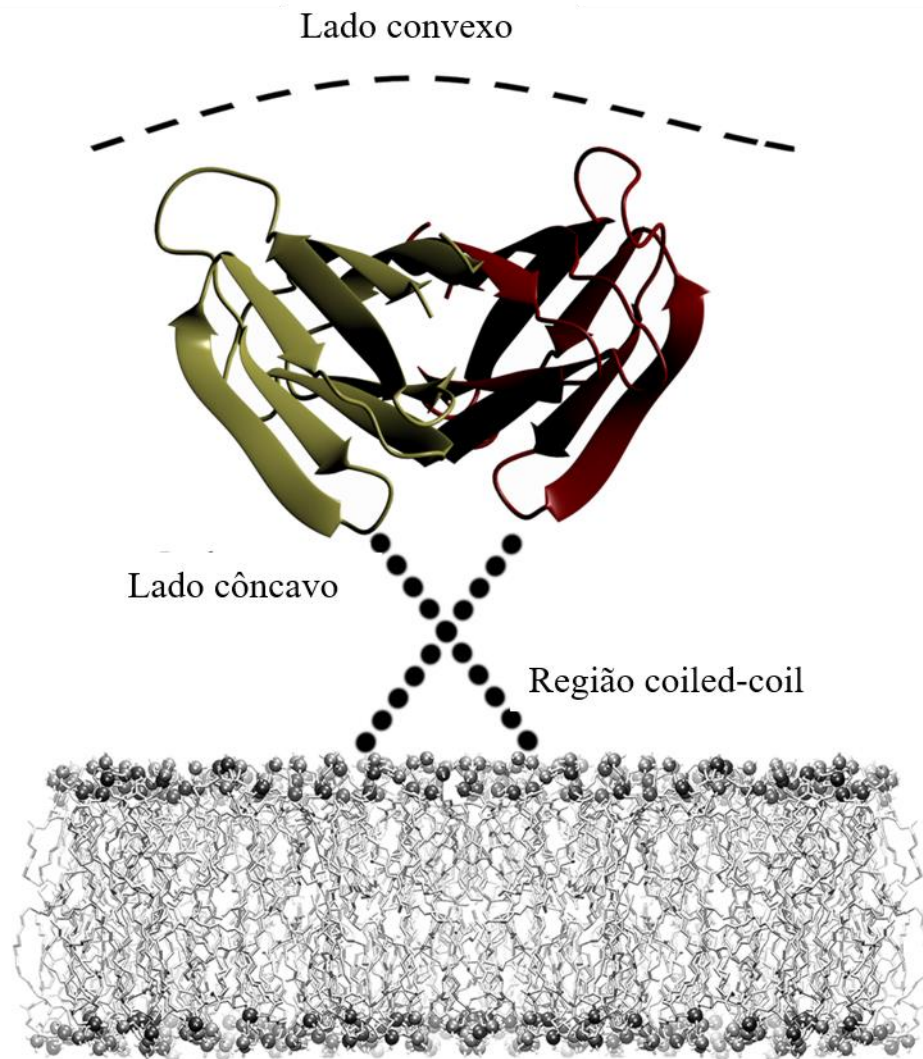


Figura 29: Modelo proposto para orientação do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana em membranas, expondo a superfície carregada negativamente formada pelo lado convexo ao lúmen. Neste modelo, o lado côncavo é orientado para a superfície da membrana. A figura foi preparada em Adobe Fireworks® CS6 e CCP4MG.

Como isso poderia desempenhar um papel durante os processos associados às TMEDs, especialmente no tráfego de proteínas, permanece desconhecido. Estudos futuros, incluindo os parceiros de ligação desses domínios GOLD, podem fornecer algumas dicas sobre as regiões de sinal de carga que os levam à inserção em COP dependente de TMED.

Foi demonstrado que o domínio GOLD da proteína TMED 1 forma dímeros em todos os subcompartimentos da via secretora inicial (RE, Golgi e compartimentos intermediários) (JENNE et al., 2002). Esta propensão de dimerização foi única entre as diferentes TMEDs testadas (JENNE et al., 2002). Neste trabalho, mostramos que a formação do dímero TMED 1 é alcançada pelo domínio GOLD isolado e estudos futuros serão realizados para incluir a

participação e discutir a relevância da região *coiled coil* na oligomerização do domínio GOLD da proteína TMED 1.

### 3.3 DOMÍNIO GOLD DA PROTEÍNA TMED 1 SEM A CAUDA DE HISTIDINA

#### 3.3.1 Expressão e purificação

O objetivo principal deste tópico foi verificarmos uma possível influência da cauda de histidina na estrutura do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana. Para isto, foi realizada a clivagem da cauda de histidina da região N-terminal por via proteolítica conforme descrito na Seção 2.1.4 de Materiais e Métodos. A análise por SDS-PAGE indica que a TEV é eficiente para a remover a cauda (**Figura 30**). A massa molecular aparente entre 11 e 17 kDa é condizente com os 11,7 kDa (**Figura 30** – retângulo vermelho) calculados teoricamente pelo programa ProtParam quando removidos os 2 kDa da cauda de histidina e do sítio de TEV.



Figura 30: Resultado da purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 visualizado em eletroforese em gel de poliacrilamida de Tricina 16%. Coluna 1 - marcador de massa molecular. Coluna 2 - Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime Mono q 5/50 GL com a presença da cauda de histidina. Coluna 3 - Proteína purificada em sistema ÄKTA Prime Mono q 5/50 GL após digestão proteolítica da cauda de histidina, destacada no retângulo de cor vermelha. Fonte: elaborada pela autora.

O perfil de eluição também foi verificado e comparado ao obtido com a proteína com a cauda de histidinas e novamente apresenta um pico intenso e fino (**Figura 31**). Observamos que sem a cauda de histidina a eluição ocorre em um volume menor (21,0 mL), quando comparados com 22,3 mL da eluição na construção completa. O sucesso da purificação final da proteína em sua forma solúvel é confirmado também por SDS-PAGE (**Figura 30** - Coluna 3), observa-se que ela apresenta uma massa molecular aparente próxima de 11 kDa, que é condizente com os 11,6 kDa calculados teoricamente pelo programa ProtParam após a clivagem.

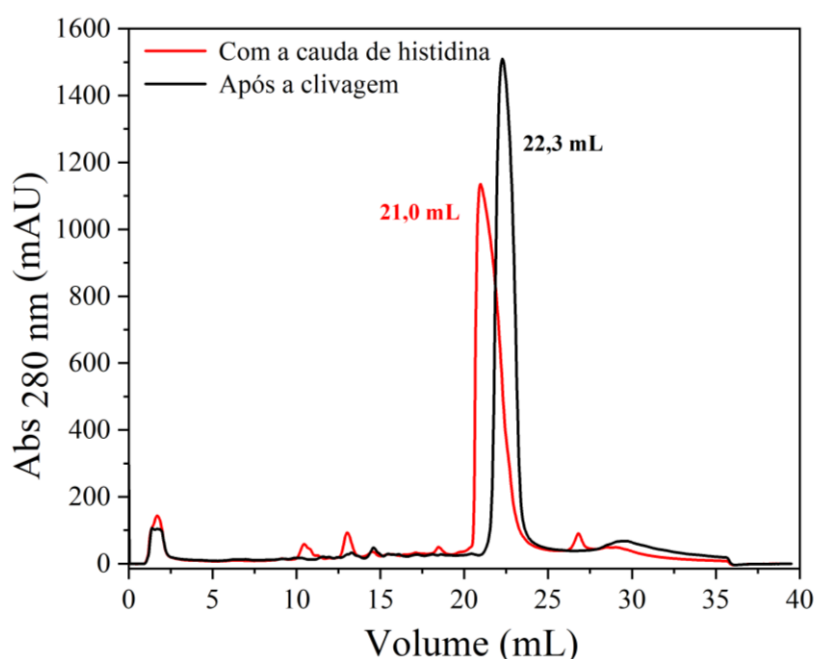


Figura 31: Perfil de eluição comparativo na coluna Mono q 5/50 equilibrada com tampão 20 mM de Tris (pH 8) e 20 mM de NaCl. Em vermelho, o perfil de eluição do domínio GOLD da proteína TMED 1 com a remoção da cauda de histidina e, em preto, na presença da cauda de histidina. Fonte: elaborada pela autora.

### 3.3.2 Avaliação da estrutura secundária

O perfil da estrutura secundária foi acompanhado por CD, conforme a **Figura 32**. O dado de CD mostra que a proteína exibe um pico negativo na região de 216 nm e um pico positivo em torno de 200 nm. Esse perfil de absorção sugere uma presença predominante de estruturas secundárias do tipo  $\beta$ . Foi realizada uma sobreposição dos espectros da proteína com

e sem a cauda de histidinas (**Figura 32**) e não foram observadas alterações significativas na estrutura secundária após a remoção proteolítica.

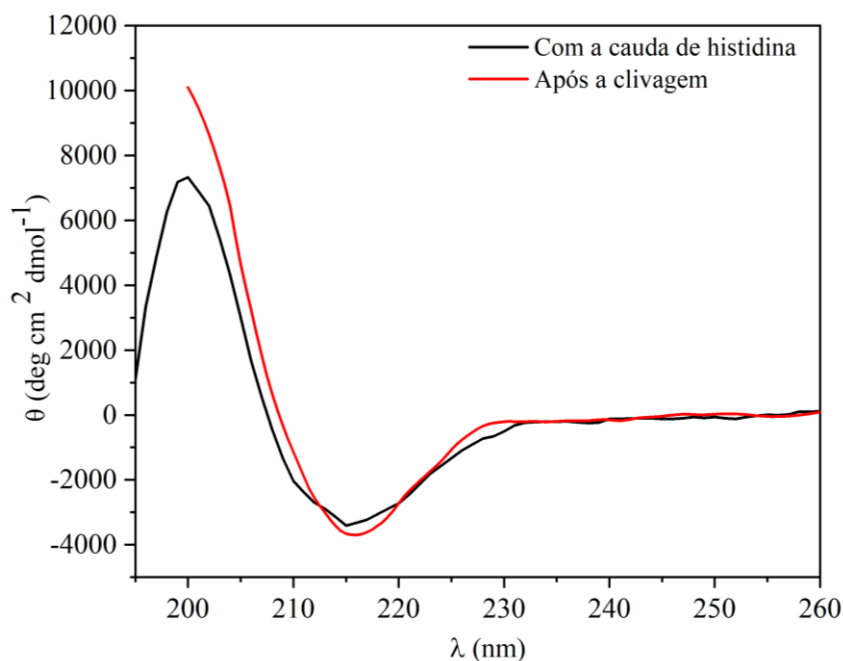


Figura 32: Espectros de CD das estruturas secundárias das proteínas TMED 1 com e sem a cauda de histidinas. Em preto, com a presença da cauda de histidina e, em vermelho, após a sua remoção. Fonte: elaborada pela autora.

### 3.3.3 Estudos de desenovelamento térmico para avaliação do impacto da cauda de histidina

Os estudos de desenovelamento térmico com espectroscopia de CD no UV distante foram realizados com a variação de temperatura de 20 até 90 °C. Inicialmente, foi analisado com a cauda de histidina e os resultados seguintes com a clivagem desta porção. A variação na estrutura secundária do domínio GOLD da proteína TMED 1 com a cauda de histidina (**Anexo – Figura 2A**) foi seguida pelo monitoramento da elipticidade em 205 nm (**Figura 33**), mostrando que a elipticidade do domínio GOLD da proteína TMED 1 diminui gradualmente com o aumento da temperatura, indicando a perda de estrutura secundária. Após o resfriamento, as amostras foram novamente aquecidas para verificar se este domínio apresentava comportamento reversível de sua transição (**Anexo – Figura 2B**). Com estas condições o

domínio GOLD da proteína TMED 1 na presença da cauda de histidina apresenta comportamento reversível (**Figura 33**).

O ponto médio da transição entre o estado enovelado e desenovelado ocorre em aproximadamente 48 °C na presença da cauda de histidina. Com o aumento da temperatura, a estrutura é completamente perdida e a elipticidade se mantém constante até 80 °C. Na **Figura 33**, é mostrada a elipticidade em 205 nm da desnaturação térmica inicial (em preto) e da reversibilidade (em vermelho) sobrepostas. A elipticidade diminui gradativamente com o aumento da temperatura e o ponto médio continua em torno de 48 °C para ambos os casos. Acima do ponto médio, observamos a perda da estrutura secundária, que é completamente perdida acima de 60 °C. Em seguida, observamos que a proteína retorna ao seu enovelamento inicial e mantém um comportamento semelhante ao anterior.

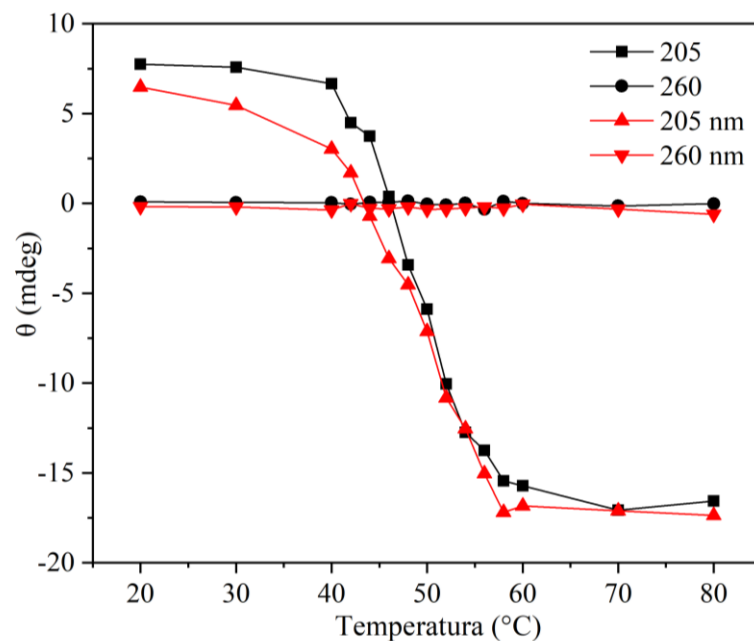


Figura 33: Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 na presença da cauda de histidina. Os gráficos mostram a variação da elipticidade (mdeg) em 205 nm para avaliação da estrutura secundária e 260 nm para a linha de base. Fonte: elaborada pela autora.

Em comparação com esses dados, foram realizados experimentos após a remoção da cauda de histidina (**Anexo – Figura 3 A e B**). Na **Figura 34**, são sobrepostas as curvas de transição da elipticidade em 205 nm com a curva de reversibilidade para o domínio GOLD da proteína TMED 1 humana clivada. A elipticidade diminui gradativamente com a elevação da



temperatura, indicando a perda da sua estrutura secundária. O ponto médio de transição ocorre em aproximadamente 48 °C e acima disso ocorre o desenovelamento com, a partir de cerca de 60 °C, a estrutura sendo completamente perdida e a elipticidade se mantém constante até 80 °C. Em seguida, a proteína retorna ao seu enovelamento inicial e mantém um comportamento semelhante ao anterior.

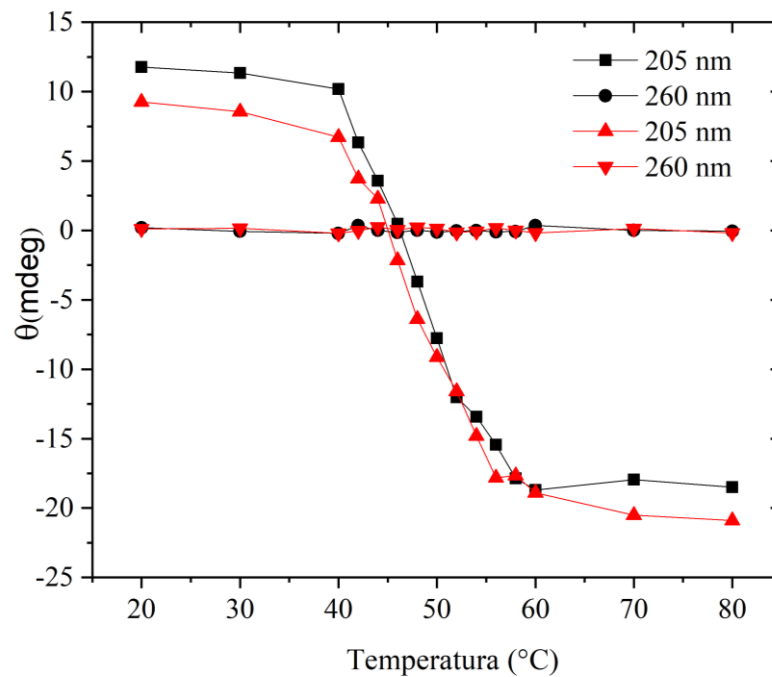


Figura 34: Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 após a remoção da cauda de histidina. Os gráficos mostram a variação da elipticidade (mdeg) em 205 nm para avaliação da estrutura secundária e 260 nm para a linha de base. Fonte: elaborada pela autora.

Em conjunto, esses dados de desenovelamento térmico por CD mostram que as análises de estrutura secundária para domínio GOLD da proteína TMED 1 com a cauda de histidina e após a clivagem (**Figuras 33 e 34**, respectivamente) não se alteram e mantêm o mesmo comportamento térmico reversível. Por fim, os dados de DSC para o domínio GOLD da proteína TMED 1 clivada, revelam que a transição endotérmica exibe o mesmo pico de transição em cerca de 60 °C (**Figura 35**), quando comparado com o DSC do domínio GOLD sem a sua clivagem (**Figura 10**).

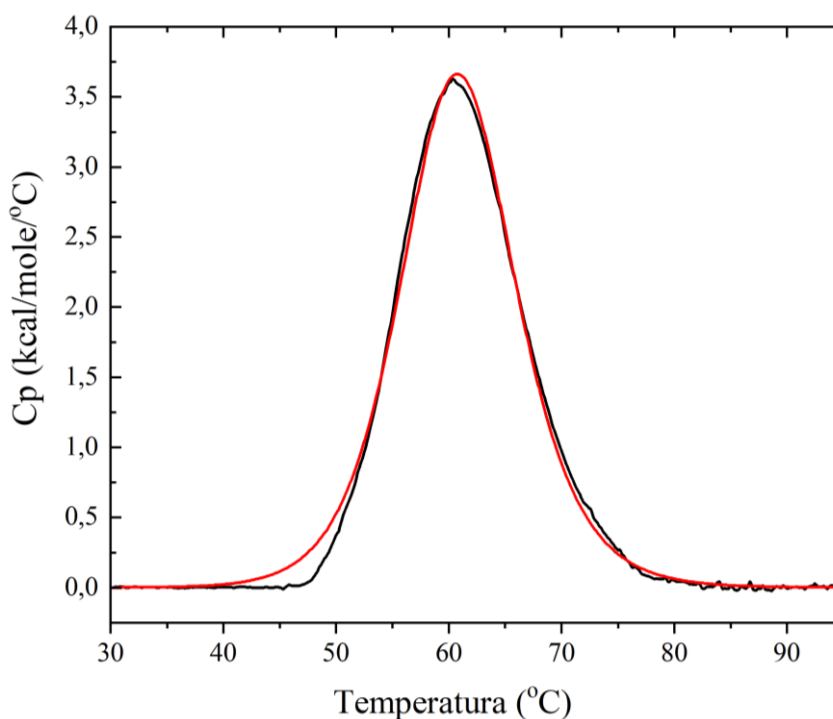


Figura 35: Análises de estabilidade térmica por calorimetria diferencial de varredura do domínio GOLD da proteína TMED 1 após a clivagem da cauda de histidina. A linha em preto indica o termograma após a subtração da linha de base e a linha em vermelho representa a curva teórica com o melhor ajuste dos dados do termograma. A transição do desenovelamento foi ajustada a um modelo de não-dois-estados. Fonte: elaborada pela autora.

#### 4 CONCLUSÃO

O principal objetivo desta dissertação foi o de contribuir, com dados de biofísica molecular, para a maior compreensão estrutural/funcional de membros da família das TMEDs, com possível impacto no entendimento dos processos de secreção de proteínas em humanos dependente da ação das TMEDs. Sendo assim, aqui apresentamos uma detalhada caracterização *in vitro* das propriedades biofísicas e bioquímicas do domínio GOLD da proteína TMED 1.

O primeiro passo foi o desenvolvimento de um protocolo eficiente de expressão heteróloga e purificação do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana, que foi realizado com sucesso. O principal desafio dessa etapa foi a de lidar com a ineficiência das linhagens modificadas de BL21 (DE3) em conseguir enovelar corretamente a proteína expressa, com parte substancial da amostra sendo insolúvel e dificultando os estudos espectroscópicos subsequentes. A utilização da linhagem *E. coli* Origami 2 (DE3) foi suficiente para solucionar os problemas de baixo rendimento, que se relacionavam com a presença de uma ligação dissulfeto que não era corretamente catalisada e provocava problemas de enovelamento. Assim, a proteína foi purificada com sucesso para as posteriores análises biofísicas.

A espectroscopia de CD mostrou que a proteína possui predominância de estruturas secundárias do tipo  $\beta$  em solução. O alto conteúdo em folhas  $\beta$  (~ 44%) estimado a partir da deconvolução espectral de CD foi consistente com estruturas homólogas encontradas no banco de dados PDB.

Utilizando também a espectroscopia de CD, foi observado que a desnaturação química induzida pelo agente caotrópico uréia segue uma curva do tipo sigmoide, sugerindo uma cooperatividade na transição para o estado desenovelado, e que a concentração de meia transição é aproximadamente 2,8 M. A desnaturação química foi também monitorada utilizando-se a fluorescência intrínseca da tirosina, visto que o domínio GOLD da proteína TMED 1 não apresenta triptofanos em sua constituição. Os dados mostram que a transição ocorreu em torno de 1,2 M, indicando uma menor estabilidade química, mas mantendo o comportamento cooperativo.

O comportamento termotrópico utilizando DSC indica que a proteína é estável, com um  $T_M$  de aproximadamente 60 °C. A razão entre a entalpia de van't Hoff e a entalpia calorimétrica sugeriu que o desenovelamento não segue um modelo de dois estados, sugerindo uma dissociação de dímero para monômeros. Além disso, a transição térmica apresentou-se reversível.

O ensaio de estabilidade térmica em função da variação do pH foi realizado pela técnica de DSF. Na ausência de sal, o comportamento do valor de  $T_M$  em relação ao pH se apresentou sigmoide, com valores elevados de  $T_M$  (entre 56 e 60 °C) em pHs ácidos. Na presença de sal, a dependência do  $T_M$  em função da variação de pH foi diferente com uma maior estabilidade térmica entre os pHs 5 e 8 (entre 70 e 72 °C). Esses dados dão fortes indícios de que a força iônica do meio é importante para a estabilidade estrutural desse domínio.

Estudos adicionais com a remoção da cauda de histidina foram realizados para verificar o impacto dessa região para a estrutura e estabilidade. Em conjunto, estes dados não demonstraram diferenças estruturais, ou de estabilidade, significativas com a cauda de histidina ou após a sua clivagem.

O domínio GOLD da TMED 1 foi cristalizado, a sua estrutura resolvida com alta resolução e o modelo determinado foi depositado no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código de acesso 7K49. Semelhante a outros domínios GOLDS já cristalizados, este domínio apresenta folhas  $\beta$  organizadas em quatro fitas que definem um lado côncavo da proteína e quatro fitas em seu lado convexo. As cisteínas presentes, que são conservadas nas proteínas TMED, formam uma ligação dissulfeto em nosso modelo e indicam um papel estrutural relevante para o

enovelamento. A pequena hélice  $\alpha$  não foi necessária para a manutenção da estrutura para a formação do cristal, diferentemente do que ocorreu para o domínio GOLD da proteína TMED 5.

O modelo de dímero do domínio GOLD da proteína TMED 1 observado na unidade assimétrica foi submetido a análises de DM e se mostrou estável temporalmente durante a simulação. A energia livre de ligação do domínio também foi avaliada e os resíduos que mais contribuíram energeticamente para a estabilização do dímero estão na interface de dimerização. As análises sugerem que a dimerização se apresenta favorecida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações  $\pi$ - $\pi$ .

Dada a influência da força iônica para a estabilidade da proteína, foram realizados estudos de oligomerização em função da concentração de NaCl. O máximo do perfil de eluição em cromatografia de exclusão molecular é deslocado para volumes maiores na medida em que a concentração de sal é também aumentada. A dependência do volume de máxima eluição em função da concentração de sal segue um perfil hiperbólico, sugerindo uma transição do tipo sal-dependente. Como o volume de eluição na cromatografia de exclusão molecular é dependente das dimensões da proteína, buscamos entender o comportamento oligomérico nos diferentes extremos de concentração de sal. Utilizando a técnica de SEC-MALS em altas concentrações de sal, o estado oligomérico da proteína se apresentou como monomérico. Por outro lado, a técnica de regressão linear com uso de proteínas de massa molecular conhecida em cromatografia de exclusão por tamanho, em condições de baixa concentração de sal, mostrou que a proteína se apresenta na forma dimerica. De forma complementar, a técnica de DSC foi também utilizada para explorar o comportamento da proteína em condições de baixa e alta força iônica. Entretanto, ao contrário da análise hidrodinâmica, o domínio GOLD se apresentou na forma dimerica em ambas as condições. O dímero se mostrou termicamente mais estável e o desenovelamento mais cooperativo em altas concentrações de sal, quando comparado ao com baixa concentração de sal. Esses resultados sugerem que o domínio GOLD da proteína TMED 1 humana forma dímeros dependente da concentração e da força iônica, sendo estável e energeticamente favorável.

Uma análise da superfície eletrostática mostra que o dímero do domínio GOLD da TMED 1 apresenta uma grande superfície eletrostática carregada negativamente no lado convexo, semelhante ao que mostramos também ocorrer no GOLD da TMED 5. Essa superfície negativa não ocorre para a TMED 2 e TMED 10, sugerindo que deva ser uma característica particular da subfamília  $\gamma$ . Baseado nessas observações, apresentamos um modelo de orientação

do domínio GOLD em relação à superfície da membrana e que leva em conta tanto a posição em que se encontra a pequena hélice observada no homólogo TMED 5 quanto as características das membranas que formam o complexo de Golgi e o RE, que são ricas em lipídeos carregados negativamente.

## 5 PERSPECTIVAS FUTURAS

- A partir dos resultados apresentados nesta dissertação pretendemos inicialmente, por técnicas de Biologia Molecular, estender a construção do domínio GOLD da proteína TMED 1 para incluir a parte que envolva a hélice.
- Realizar novas construções que possibilitem a expressão e purificação de toda a proteína TMED 1, pois até o momento ainda não existe o estudo com a construção completa.
- Além disso, caracterizar *in vitro* a capacidade do domínio GOLD de interagir com parceiros. Um parceiro de interação seria o domínio solúvel TIR do receptor ST2, visto apenas em estudos *in vivo* que foram apresentados na introdução desta dissertação. Ao longo do desenvolvimento deste projeto de mestrado, houve tentativas de expressar este domínio, mas este apresentou-se em corpos de inclusão e estratégias de *refolding* não foram capazes de solucionar o problema.
- Fazer ensaios de interação com a utilização de técnicas de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica para caracterizar a formação do complexo e, por fim, tentativas de cristalização do domínio GOLD da proteína TMED 1 com o domínio TIR.
- Além disso, foi visto que as proteínas TMED contribuem na modulação do transporte de proteínas específicas, como as proteínas ancoradas por cauda de GPI. Então verificar possibilidades de interação do domínio GOLD da proteína TMED 1 com alguma GPI.

## 6 REFERÊNCIAS

ABER, R. et al. Transmembrane emp24 domain proteins in development and disease. **Genetics Research**, n. May, p. 1–11, 2019.

AISENBREY, C. et al. Investigations of the Structure, Topology, and Interactions of the Transmembrane Domain of the Lipid-Sorting Protein p24 Being Highly Selective for Sphingomyelin-C18. **Biochemistry**, v. 58, n. 24, p. 2782–2795, 2019.

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 701–721.e70, 2011.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

AMARTELY, H. et al. Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. **Genome biology**, v. 3, n. 5, p. 1–7, 2002.

BARLOWE, C.; HELENIUS, A. Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 32, n. 1, p. 197–222, 2016.

BASSO, L. G. M. Interações com membranas de peptídeos de fusão da glicoproteína S do SARS-CoV. Tese (Doutorado em Física Básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2014., v. 1, p. 163, 2014.

BECK, R. et al. The COPI system: Molecular mechanisms and function. **FEBS Letters**, v. 583, n. 17, p. 2701–2709, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.032>>.

BITTAR, E. R. et al. Characterization of  $\beta$ -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1621–1627, 2003.

BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 2, p. 192–206, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.002>>.

BONNON, C. et al. Selective export of human GPI-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 10, p. 1705–1715, 2010.

BRANDIZZI, F.; BARLOWE, C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 382–392, 2013.

BROCKER, C. et al. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human Genomics**, v. 5, n. 1, p. 30–55, 2010.

CAMPANERA, J. M.; POUPLANA, R. MMPBSA decomposition of the binding energy throughout a molecular dynamics simulation of amyloid-beta (A $\beta$ 10-35) aggregation. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2730–2748, 2010.

CASE, D. A. et al. Amber 18. **University of California, San Francisco. 2018**, 2018. Disponível em: <<http://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>>.

CASTILLON, G. A. et al. Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. **Traffic**, v. 10, n. 2, p. 186–200, 2009.

CHEN, A. H.; SILVER, P. A. Designing biological compartmentalization. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 12, p. 662–670, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.002>>.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

CHEN, Y. et al. Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 12, p. 4141–4151, 2017.

CIUFO, L. F.; BOYD, A. Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8382–8388, 2000.

CONNOLLY, J.; O'NEIL, L. A. J.; MCGETTRICK, A. F. The gold domain-containing protein TMED1 is involved in interleukin-33 signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 8, p. 5616–5623, 2013.

CONTRERAS, I.; ORTIZ-ZAPATER, E.; ANIENTO, F. Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatamer. **Plant Journal**, v. 38, n. 4, p. 685–698, 2004.

COWTAN, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 9, p. 1002–1011, 2006.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

DIEKMANN, Y.; PEREIRA-LEAL, J. B. Evolution of intracellular compartmentalization. **Biochemical Journal**, v. 449, n. 2, p. 319–331, 2013.

DOMINGUEZ, M. et al. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 4, p. 751–765, 1998.

DOYLE, S. L. et al. The GOLD domain-containing protein TMED7 inhibits TLR4 signalling from the endosome upon LPS stimulation. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

DUDEN, R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. **Molecular Membrane Biology**, v. 20, n. 3, p. 197–207, 2003.

EMERY, G.; GRUENBERG, J.; ROJO, M. The p24 family of transmembrane proteins at the interface between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. **Protoplasma**, v. 207, n. 1–2, p. 24–30, 1999.

EMERY, G.; ROJO, M.; GRUENBERG, J. Coupled transport of p24 family members. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 13, p. 2507–2516, 2000.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010.

ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289–298, 2006.

FREIRE, E. Statistical thermodynamic analysis of the heat capacity function associated with protein folding-unfolding transitions. In: **Comments on molecular and cellular biophysics**. [s.l: s.n.]p. 123–140.

FREIRE, E. Differential scanning calorimetry. **Methods in Molecular Biology**, v. 40, p. 191–218, 1995.

FUJITA, M. et al. Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 1, p. 61–75, 2011.

FÜLLEKRUG, J. et al. Localization and recycling of gp27 (hp24 $\gamma$ 3): Complex formation with other p24 family members. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 6, p. 1939–1955, 1999.

GARBES, L. et al. Mutations in SEC24D, encoding a component of the COPII machinery, cause a syndromic form of osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human**



**Genetics**, v. 96, n. 3, p. 432–439, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.01.002>>.

GAYNOR, E. C.; GRAHAM, T. R.; EMR, S. D. COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: Do yeast COPI mutants point the way? **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1404, n. 1–2, p. 33–51, 1998.

GOLDFISHER, S. The Internal Reticular Apparatus of Camillo Golgi: A complex, Heterogeneous Organelle, Enriched in Acid, Neutral, and Alkaline Phosphatases, and Involved in Glycosulation, Secretion, Membrane Flow, Lysosome Formation, and Intracellular Digestion. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, p. 17–733, 1982.

GOMEZ-NAVARRO, N.; MILLER, E. Protein sorting at the ER-Golgi interface. **Journal of Cell Biology**, v. 215, n. 6, p. 769–778, 2016a.

GOMEZ-NAVARRO, N.; MILLER, E. A. COP-coated vesicles. **Current Biology**, v. 26, n. 2, p. R54–R57, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.017>>.

GUI, W. S. et al. Interleukin-1 $\beta$  overproduction is a common cause for neuropathic pain, memory deficit, and depression following peripheral nerve injury in rodents. **Molecular Pain**, v. 12, n. 74, p. 1–15, 2016.

HIRATA, R.; NIHEI, C. I.; NAKANO, A. Isoform-selective oligomer formation of *saccharomyces cerevisiae* p24 family proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 52, p. 37057–37070, 2013.

HOU, W. et al. Non-alcoholic fatty liver disease in mice with heterozygous mutation in TMED2. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–19, 2017.

HUANG, S.; WANG, Y. Open Peer Review Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells [version 1; peer review: 5 approved]. v. 6, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.12688/f1000research.11900.1>>.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. Sartorius products. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. October 1995, p. 33–38, 1996. Disponível em: <<https://www.tapbiosystems.com/tap/products/index.htm>>.

JENNE, N. et al. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46504–46511, 2002.

JOHNSON, C. R. et al. Thermodynamic Analysis of the Structural Stability of the Tetrameric Oligomerization Domain of p53 Tumor Suppressor. **Biochemistry**, v. 34, n. 16, p. 5309–5316, 1995.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating

liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

JOSHI, G.; WANG, Y. Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease. **BioEssays**, v. 37, n. 3, p. 240–247, 2015.

KABSCH, W. et al. XDS. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444909047337>>.

KINOSHITA, T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. **Open Biology**, v. 10, n. 3, 2020.

KINOSHITA, T.; FUJITA, M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: Special emphasis on GPI lipid remodeling. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 1, p. 6–24, 2016.

KIRCHHAUSEN, T. Making COPII Coats. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1251–1252, 2007.

KOLLMAN, P. A. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889–897, 2000.

KREIS, T. E. COPs Regulating Membrane Traffic. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 677–706, 1995.

LIAUNARDY-JOPEACE, A.; BRYANT, C. E.; GAY, N. J. The COPII adaptor protein TMED7 is required to initiate and mediate the anterograde trafficking of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane. **Science Signal**, v. 7, n. 336, 2015.

LIEW, F. Y.; LIU, H.; XU, D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. **Immunology Letters**, v. 96, n. 1, p. 27–31, 2005.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: The new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–110, 2010.

LIM, W. K. GPCR drug discovery: Novel ligands for CNS receptors. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 107–112, 2007.

LIN, X. et al. Increased expression of TMED2 is an unfavorable prognostic factor in patients with breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 2203–2214, 2019.

LIU, L.; FUJINO, K.; NISHIMURA, M. Pre-synaptic localization of the  $\gamma$ -secretase-inhibiting protein p24 $\alpha$ 2 in the mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 3, p. 422–431, 2015.

LOPEZ, S. et al. Dual Independent Roles of the p24 Complex in Selectivity of Secretory Cargo Export from the Endoplasmic Reticulum. **Cells**, v. 9, n. 5, 2020.

LUO, W.; WANG, Y.; REISER, G. p24A, a type I transmembrane protein, controls

ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 30246–30255, 2007.

LUO, W.; WANG, Y.; REISER, G. Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and  $\mu$ -opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 1, p. 71–81, 2011.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.

MAKOWSKI, S. L.; TRAN, T. T.; FIELD, S. J. Emerging themes of regulation at the Golgi. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 45, p. 17–23, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.004>>.

MAO, D.; WACHTER, E.; WALLACE, B. A. Folding of the Mitochondrial Proton Adenosinetriphosphatase Proteolipid Channel in Phospholipid Vesicles. **Biochemistry**, v. 21, n. 20, p. 4960–4968, 1982.

MARTÍNEZ, L., ANDRADE, R., BIRGIN, E. G., & MARTÍNEZ, J. M. PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 13, p. 2157–2164, 2009.

MARTÍNEZ, J. M.; MARTÍNEZ, L. Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 819–825, 2003.

MARZIOCH, M. et al. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 6, p. 1923–1938, 1999.

MAZZARELLO, P.; GARBARINO, C.; CALLIGARO, A. How Camillo Golgi became “the Golgi”. **FEBS Letters**, v. 583, n. 23, p. 3732–3737, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.018>>.

MCNICHOLAS, S. et al. Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 386–394, 2011.

MICHELETTO, M. C. et al. Lipid membranes and acyl-CoA esters promote opposing effects on acyl-CoA binding protein structure and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 284–296, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.197>>.

MICSONAI, A. et al. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2018.

MILLER, A. M.; LIEW, F. Y. The IL-33/ST2 pathway - A new therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 131, n. 2, p. 179–186, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.02.005>>.

MILLER, B. R. et al. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.

MONTESINOS, J. C. et al. Putative p24 complexes in Arabidopsis contain members of the delta and beta subfamilies and. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 11, p. 3147–3167, 2013.

MURSHUDOV, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 355–367, 2011.

NAGAE, M. et al. 3D Structure and Interaction of p24 $\beta$  and p24 $\delta$  Golgi Dynamics Domains: Implication for p24 Complex Formation and Cargo Transport. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 20, p. 4087–4099, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.023>>.

NAGAE, M. et al. Crystallographic analysis of murine p24 $\gamma$ 2 Golgi dynamics domain. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 4, p. 764–770, 2017.

NAKANO, N. et al. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling by disrupting TGF- $\beta$  receptor complex formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 4099–4112, 2017.

NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-Term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

NEESS, D. et al. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 1–25, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.001>>.

NEUBERT, P.; STRAHL, S. Protein O-mannosylation in the early secretory pathway.

**Current Opinion in Cell Biology**, v. 41, p. 100–108, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.010>>.

OBOKI, K. et al. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. **Allergology International**, v. 59, n. 2, p. 143–160, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.10-RAI-0186>>.

PALADE, G. Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. **Science**, v. 189, n. 4206, p. 867–867, 1975.

PANNWITT, S.; STANGL, M.; SCHNEIDER, D. Lipid Binding Controls Dimerization of the Coat Protein p24 Transmembrane Helix. **Biophysical Journal**, v. 117, n. 9, p. 1554–1562, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.021>>.

PASCUAL-FIGAL, D. A.; JANUZZI, J. L. The biology of ST2: The international ST2 consensus panel. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 3B-7B, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.01.034>>.

PASTOR-CANTIZANO, N. et al. P24 Family Proteins: Key Players in the Regulation of Trafficking Along the Secretory Pathway. **Protoplasma**, v. 253, n. 4, p. 967–985, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00709-015-0858-6>>.

PASTOR-CANTIZANO, N. et al. N-Linked Glycosylation of the p24 Family Protein p24 $\delta$ 5 Modulates Retrograde Golgi-to-ER Transport of K/HDEL Ligands in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 10, n. 8, p. 1095–1106, 2017.

PEI, J. et al. TMED3 promotes cell proliferation and motility in breast cancer and is negatively modulated by miR-188-3p. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-019-0791-4>>.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

POPOFF, V. et al. COPI budding within the Golgi stack. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 11, p. 1–20, 2011.

PRIVALOV, P. L. Stability of proteins: Small Globular Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 33, n. C, p. 167–241, 1979.

PRIVALOV PL, P. S. [2] Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. **Methods Enzymol**, v. 131, p. 4–51, 1986.

RAOTE, I.; MALHOTRA, V. Protein transport by vesicles and tunnels. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 3, p. 737–739, 2019.

ROTH, J. Protein N-glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to

organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 285–303, 2002.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SCHIMMÖLLER, F. et al. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 7, p. 1329–1339, 1995.

SCHUIKI, I.; VOLCHUK, A. Diverse roles for the p24 family of proteins in eukaryotic cells. **Biomolecular Concepts**, v. 3, n. 6, p. 561–570, 2012.

SICARI; IGBARIA; CHEVET. Control of Protein Homeostasis in the Early Secretory Pathway: Current Status and Challenges. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1347, 2019.

SOME, D. et al. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (Sec-mals). **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 148, p. 1–9, 2019.

STRATING, J. R. P. M. et al. A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: Identification of a novel tissue-specifically expressed member. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 8, p. 1707–1714, 2009.

SWANSON, J. M. J.; HENCHMAN, R. H.; MCCAMMON, J. A. Revisiting Free Energy Calculations: A Theoretical Connection to MM/PBSA and Direct Calculation of the Association Free Energy. v. 86, n. January, p. 67–74, 2004.

T. ZHANG, E. BERTELSEN, T.; ALBER. © 199 4 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/nsmb>. **Nature**, 1994.

THEILER, R. et al. The  $\alpha$ -helical region in p24 $\gamma$ 2 subunit of p24 protein cargo receptor is pivotal for the recognition and transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 16835–16843, 2014.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010.

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5–8, 2011.

VILLACORTA, H.; MAISEL, A. S. Soluble ST2 testing: a promising biomarker in the management of heart failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 2, p. 145–152, 2016.

VIOTTI, C. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. **Methods in Molecular Biology**, v. 1459, p. 3–29, 2016.

WANG ET AL. ER-to-Golgi Trafficking and Its Implication in Neurological Diseases. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 408, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/408/htm>>.

WANG, X. et al. Transmembrane emp24 protein transport domain 6 is selectively expressed in pancreatic islets and implicated in insulin secretion and diabetes. **Pancreas**, v. 41, n. 1, p. 10–14, 2012.

WEI, J. H.; SEEMANN, J. Unraveling the Golgi ribbon. **Traffic**, v. 11, n. 11, p. 1391–1400, 2010.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011.

XIANG, Y. et al. Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

**7 ANEXO**

Figura 1: Representação das três cadeias polipeptídicas A, B e C. Fonte: elaborada pela autora.



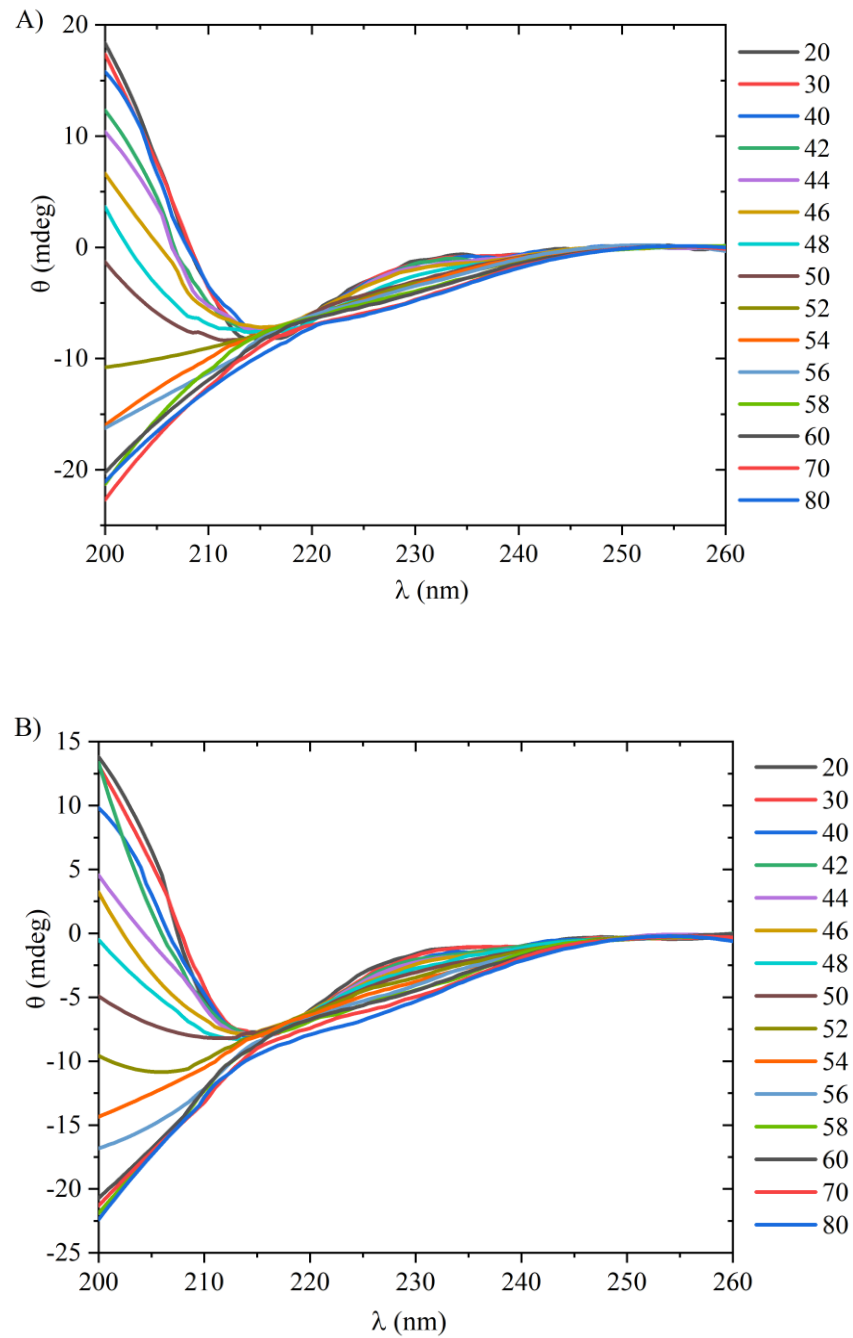


Figura 2: Monitoramento da estrutura secundária por CD no desenovelamento térmico com a presença da cauda de histidina (20 a 80°C representados pelos espectros das curvas coloridas. A) Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1. B) Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 em processo de reversibilidade.

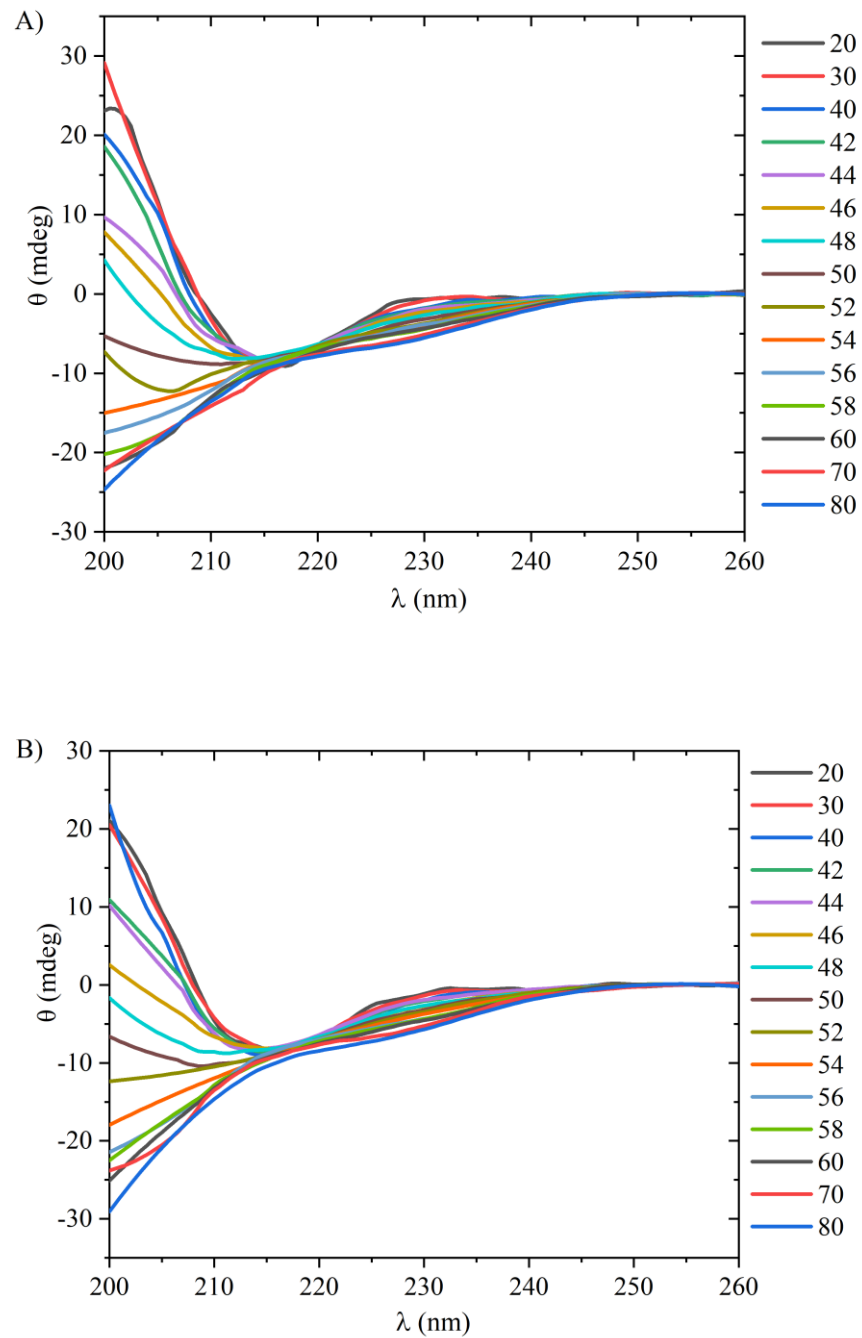


Figura 3: Monitoramento da estrutura secundária por CD no desenovelamento térmico após a remoção da cauda de histidina (20 a 80°C representados pelos espectros das curvas coloridas). A) Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1. B) Desnaturação térmica do domínio GOLD da proteína TMED 1 em processo de reversibilidade.