

**Estabelecimento de um método de HTS (*high-throuput screening*)  
para avaliar condições físico-químicas que influenciam na  
separação de fase líquido-líquido de proteínas *in vitro***

Pesquisador responsável: Dr. Ivan Rosa e Silva

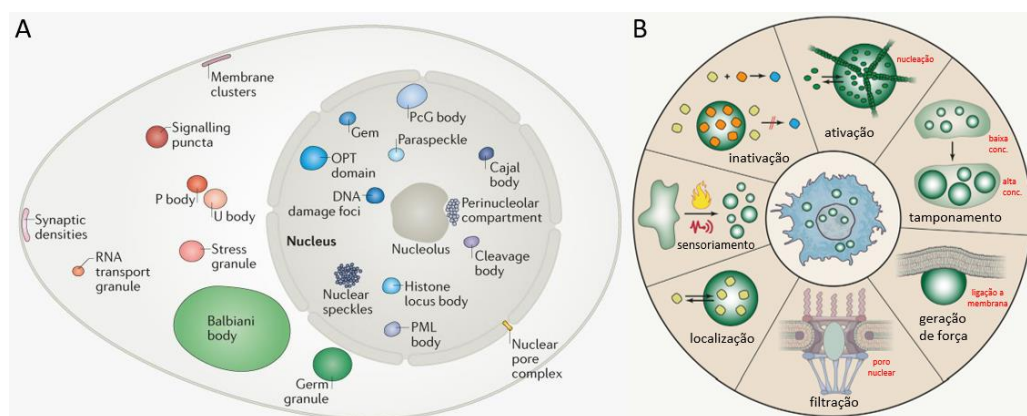
Pesquisadora corresponsável: Dra. Juliana Ferreira de Oliveira

Instituição Sede: Laboratório Nacional de Biociências (LN Bio)  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPem)

Campinas, Abril de 2023

## Introdução, estado da arte e motivação

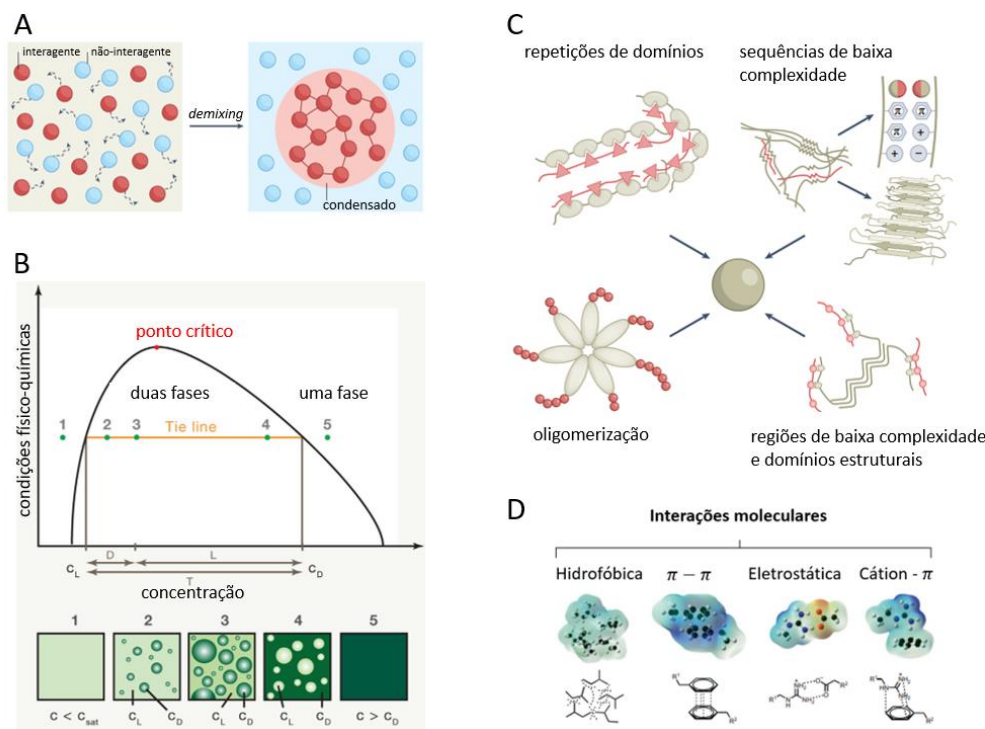
Macromoléculas biológicas são organizadas em compartimentos celulares conhecidos como organelas, separadas por membrana lipídica ou não, que permitem que a célula execute reações químicas complexas em ambiente que facilita a sua regulação (Mehta & Zhang, 2022, Wang et al, 2021). Várias dessas organelas não são separadas por membrana lipídica no ambiente celular (Figura 1A). Em 2009, pesquisas lideradas por Antony Hyman demonstraram, pela primeira vez, que condensados de proteína e RNA conhecidos como grânulos P de fato exibem comportamento de líquido no ambiente celular (Brangwynne et al, 2009). Recentemente, vários pesquisadores observaram o fenômeno de separação de fase líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid phase separation*, LLPS) em diversas organelas celulares sem membrana como corpos de Cajal, *speckles* nucleares, grânulos de estresse, entre outros (Figura 1A). Tais condensados biomoleculares facilitam funções de ativação/inativação proteica, podendo atuar em sensoriamento, (sub-)localização celular, filtração de moléculas e até mesmo geração de força ou tamponamento (Figura 1B). Além de seu papel fundamental em diferentes funções celulares, a LLPS também tem sido associada ao desenvolvimento de certas doenças como a esclerose lateral amiotrófica como consequência de mutações nos genes que codificam proteínas de grânulos de estresse como FUS e TDP-43 (Carey & Guo, 2022).



**Figura 1: Funções de condensados de macromoléculas biológicas na célula eucariótica.** A- Organelas livres de membrana que apresentam comportamento líquido/gel. Extraído de <https://hymanlab.org>. B- Repertório de funções de condensados biomoleculares. Adaptado de Alberti et al, 2018.

Em nível molecular, a LLPS corresponde ao processo de *demixing* metaestável (Figuras 2A e 2B) de proteínas e/ou ácidos nucleicos mediante interações multivalentes entre proteínas, proteína-ácido nucleico e ácido nucleico-ácido nucleico (Metha & Zhang, 2022) no qual duas fases líquidas (uma mais densa, com concentração  $c_D$ , e outra menos densa, com concentração  $c_L$ ) coexistem como função de condições físico-químicas como temperatura, pH, força iônica, entre outras (Figura 2B) (Alberti et al, 2018). Em concentrações menores que a concentração de saturação,  $c_{sat}$ , o sistema se apresenta em regime de apenas uma fase (Figura 2B). Vários tipos de interações químicas fracas (ex.  $\pi$ - $\pi$ , cátion-ânion, dipolo-dipolo, cátion- $\pi$  e hidrofóbica) (Figura 2D) definem a composição dos condensados moleculares (Alberti et al, 2018). Essas interações químicas que induzem LLPS são facilitadas em regiões não estruturadas de proteínas intrinsecamente desordenadas, em proteínas com módulos estruturados espaçados por regiões desordenadas e até mesmo domínios enovelados que direcionam localização específica de proteínas (ex. fatores de transcrição) (Figura 2C) (Alberti et al, 2018; Wang et al, 2021; Metha & Zhang, 2022). A rede de interações dessas biomoléculas em escala molecular (Angstrom a nanômetro) resulta em propriedades de material condensado (líquido ou gel) na mesoescala (nanômetro a micrometro) de modo que as funções celulares desses condensados moleculares são otimizadas (Alberti et al, 2018; Wang et al, 2021; Metha & Zhang, 2022).

Nosso grupo está interessado em compreender os mecanismos moleculares que governam a LLPS de proteínas que interagem com ácidos nucleicos, entre elas a proteína DDX3X (helicase de RNA com função no metabolismo de RNA) e a proteína FUBP1 (reguladora de transcrição e de metabolismo de RNA a partir de sua função de ligação a RNA e a DNA de fita simples). Ambas as proteínas são direcionadas para grânulos de estresse citoplasmáticos em condições de estresse com arsenito de sódio (Fonseca et al, 2021; Anders et al, 2021). Mutações em DDX3X provenientes de pacientes com transtorno de neurodesenvolvimento induzem a formação de grânulos de estresse aberrantes (Fonseca et al, 2021).



**Figura 2: Princípios básicos que governam a separação de fase líquido-líquido (LLPS) em condensados biomoleculares.** A- Interações intermoleculares favorecem demixing de biomoléculas levando à formação de condensados. Adaptado de Metha & Zhang, 2022. B- Esquema de um diagrama de fases mostrando a linha de coexistência (preta) que separa em um regime de fase única e um regime de duas fases em função de condições físico-químicas (pH, força iônica, temperatura, ...).  $c_L$  = concentração menor que a concentração de saturação ( $c_{sat}$ );  $c_D$  = concentração maior que  $c_{sat}$ . Verde escuro = fase mais densa (D). Verde claro = fase menos densa (L). Adaptado de Alberti et al, 2018. C- Arquitetura de proteínas que induzem LLPS. Adaptado de Gao et al, 2022. D- Tipos de interações intermoleculares presentes em condensados biomoleculares.

A separação de fase líquido-líquido de proteínas pode ser facilmente obtida *in vitro*, o que facilita o estudo dos mecanismos moleculares que regulam tal processo. Porém, a avaliação sistemática do espaço de condições físico-químicas que afetam a solubilidade de proteínas e, portanto, governam a LLPS de biomoléculas é bastante laboriosa. Para isso, vamos desenvolver um método de HTS (*high throughput screening*) que nos possibilite a construção de um diagrama de fases dessas proteínas em função de diversas condições físico-químicas. Esse novo método será validado no estudo da LLPS das proteínas de interesse do nosso grupo. Nosso método facilitará o estudo da LLPS de proteínas de interesse médico e poderá ser empregado em projetos futuros com o objetivo de identificar moléculas em bibliotecas químicas que inibam ou facilitem a LLPS dessas proteínas.

### Objetivos específicos

- Purificar, a partir de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, a(s) proteína(s) de interesse (FUBP1 e/ou DDX3X) contendo regiões desordenadas que induzem LLPS.
- Estabelecer protocolos automatizados de preparação de placas de HTS (*high throughput screening*) contendo soluções químicas baseadas em fatores que influenciam a solubilidade de proteínas, como pH, sal e agentes de *crowding* molecular.
- Implementar um método sistemático para a análise da formação de condensados líquidos *in vitro* por microscopia óptica, incluindo microscopia de fluorescência.
- Desenvolver um método de quantificação de LLPS a partir de imagens de microscopia para construção de diagrama de fases de proteína.

## Métodos

### Expressão e purificação da(s) proteína(s) de interesse (FUBP1 e/ou DDX3X)

Nosso grupo tem purificado com sucesso, a partir de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, a proteína de camundongo FUBP1 contendo mKO2 fusionada a sua extremidade C-terminal e a proteína humana DDX3X contendo mCherry fusionada a sua extremidade C-terminal. Brevemente, a indução da sua expressão com IPTG a partir de plasmídeo pET-TEV é realizada por 16 horas a 18°C. A proteína recombinante também apresenta uma extensão N-terminal de 6 resíduos de histidina que possibilita sua purificação por cromatografia de afinidade a íons cobalto a partir do extrato celular da bactéria. A proteína pura é então submetida a cromatografia de exclusão molecular. Os protocolos de purificação de FUBP1 e DDX3X serão otimizados. A amostra de proteína pura fresca será utilizada em experimentos de LLPS.

### Microscopia óptica

A microscopia óptica é capaz de detectar gotículas de dimensões de centenas de nanômetros a micrômetros em suspensão (Alberti et al, 2018; Wang et al, 2021; Gao et al, 2022). Inicialmente, as macromoléculas são observadas em condições em que não acontece a formação de LLPS. Em seguida, observa-se o efeito da adição de agentes químicos (sais, pH, RNA, ...) ou físicos (temperatura) que alteram a solubilidade da proteína por um certo período até que gotículas comecem a ser formadas. Para possibilitar a comparação de diferentes condições, o tempo de incubação e os parâmetros de imageamento devem ser mantidos constantes, já que os condensados tendem a sedimentar na superfície da lâmina de microscopia. A cobertura das lâminas de microscopia com lipídeos ou PEG pode facilitar a observação dessas gotículas de biomoléculas. Portanto, testaremos placas contendo lâminas tratadas com diferentes agentes químicos. Diferentes tipos de microscopia óptica podem ser utilizados na observação desses condensados biomoleculares, entre eles a microscopia de campo amplo estendido (*widefield*), a técnica de DIC (*differential interference contrast*) e a microscopia de fluorescência. O uso de marcador fluorescente estável, como a proteína de fusão mKO2, permite a estimativa da concentração da proteína na fase densa. O sistema Operetta CLS High Content Analysis System (PerkinElmer) será empregado para os experimentos de HTS utilizando microscopia óptica. Tal sistema permite a quantificação da área de gotículas sedimentadas e da intensidade de fluorescência da proteína.

## Cronograma

	1º bimestre	2º bimestre	3º bimestre	4º bimestre
Otimização da purificação da(s) proteína(s) de interesse				
Preparo de placas contendo soluções estoque				
Experimentos preliminares de LLPS				
Análise sistemática de LLPS no equipamento Operetta CLS (PerkinElmer)				
Escrita de relatório				

## Referências

- Alberti et al, 2018. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*. 2019. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
- Anders et al. Dynamic m6A methylation facilitates mRNA triaging to stress granules. *Life Science Alliance*. DOI: 10.26508/lsa.201800113.
- Brangwynne et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*. 2009. DOI: 10.1126/science.1172046.
- Carey & Guo. Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci*. 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.826719.
- Fonseca et al. Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X. *iScience*. 2021. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102841.
- Gao et al. A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates. *Nature Chemical Biology*. 2022. DOI: 10.1038/s41589-022-01204-2.
- Metha & Zhang. Liquid-liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2022. DOI: 10.1038/s41568-022-00444-7.
- Wang et al. Liquid-liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00678-1.