

Título em Português: Explorando o papel de mudanças pós-traducionais na estrutura e interações moleculares da GRASP65 homolog protein 1

Título em Inglês: Exploring the role of post-translational modifications in the structure and molecular interactions of GRASP65 homolog protein 1

Autor: Marília Darini de Oliveira da Silva

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Luis Felipe Santos Mendes

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: USP - Programa Unificado de Bolsas

EXPLORANDO O PAPEL DE MUDANÇAS PÓS-TRADUCIONAIS NA ESTRUTURA E INTERAÇÕES MOLECULARES DA GRASP65 HOMOLOG PROTEIN 1

Marília Darini de Oliveira da Silva

Luís Felipe Santos Mendes

Universidade de São Paulo

mariliadarini@usp.br

Objetivos

O complexo de Golgi é uma organela eucariótica que desempenha papel fundamental na modificação, armazenamento e transporte de proteínas e lipídeos. A estrutura do Complexo de Golgi, determinada principalmente por Proteínas de Reorganização e Empilhamento do Golgi (GRASPs) e Golginas, é única e sua desestruturação está associada à progressão de diversas doenças, como vários tipos de câncer, doenças virais e neurodegenerativas. Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais essas proteínas alteram a estrutura da membrana do Golgi permanecem desconhecidos. O ancoramento membranar das GRASPs depende crucialmente de uma modificação pós-traducional. Neste projeto investigamos como a acetilação no N-terminal influencia as interações moleculares da proteína GRASP65 homóloga de *Saccharomyces cerevisiae* (Grh1) com modelos de membranas biológicas.

Métodos e Procedimentos

Neste projeto utilizamos as técnicas de Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular e Calorimetria Diferencial de Varredura. Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica

espectroscópica utilizada para monitorar mudanças de estruturas secundárias de proteínas de interesse (Grh1 e AcGrh1), bem como suas estabilidades térmicas. Realizamos experimentos de Dicroísmo Circular para caracterizar a termodinâmica de desenovelamento da AcGrh1, além de possíveis mudanças no conteúdo de estrutura secundária da AcGrh1 e da Grh1 na presença de diferentes modelos de membranas.

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica termoanalítica utilizada em estudos de transições de fase e mudanças conformacionais de biomoléculas. Neste projeto, o DSC foi utilizado para estudar a transição de fase de membranas puras e composições lipídicas, tanto sozinhas quanto na presença das proteínas Grh1 e AcGrh1.

Resultados

Os dados obtidos por Dicroísmo circular indicam que a proteína AcGrh1 apresenta uma conformação rica em desordem intrínseca e, ao interagir com modelos de membranas com carga superficial negativa sofre uma mudança conformacional, passando a apresentar uma estrutura mais rica em alfa-hélice. Porém, na presença de outros modelos de membranas, a AcGrh1 não sofre mudança conformacional detectável. Nenhuma mudança conformacional

da Grh1 foi observada em todos os casos estudados.

A análise por Calorimetria Diferencial de Varredura mostrou que a interação da AcGrh1 com modelos de membranas específicas altera a cooperatividade de transição térmica principal dessas membranas. Em modelos de membranas com carga superficial negativa, observou-se uma diminuição da cooperatividade de transição do estado gel lamelar para líquido-cristalino, acompanhado por um aumento na Temperatura de Transição de fase (T_m). Por outro lado, essa alteração não foi detectada em modelos de membranas com carga superficial neutra. A ausência de mudanças também foi observada em todos os modelos de membranas estudados quando a Grh1 não estava acetilada.

Conclusões

Os dados de Dicroísmo Circular mostram que a proteína AcGrh1 apresenta uma transição estrutural do tipo desordem/alfa-hélice na presença de modelos de membranas com carga superficial negativa, sendo a acetilação crucial para que essa transição ocorra. Os dados de Calorimetria Diferencial de Varredura indicam que a ancoragem eficiente da Grh1 às membranas requer a acetilação no N-terminal e a presença de cargas negativas nas membranas.

Portanto, em nosso modelo atual, propomos que a região N-terminal da Grh1 seja intrinsecamente desordenada em solução, no entanto, na presença de uma membrana com carga superficial negativa, essa região passa por uma transição de desordem para ordem. Especificamente, a região desordenada adota uma conformação de alfa-hélice, que é anfipática e responsável pelo ancoramento, sendo a acetilação no N-terminal essencial para esse processo. Provavelmente, essa modificação pós-traducional reduz a barreira energética da transição estrutural desordem/ordem responsável pela formação

da hélice anfipática, tornando-a crucial para o processo de ancoramento.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Instituto de Física de São Carlos. Agradeço também o Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas”.

Referências

- (1) Park K, Ju S, Kim N, Park SY. **The Golgi complex: a hub of the secretory pathway.** BMB Rep. 2021
- (2) Petrosyan, A. **Onco-Golgi: Is Fragmentation a Gate to Cancer Progression?** Biochem Mol Biol J. 2015.
- (3) Zhang J, Kennedy A, de Melo Jorge DM, Xing L, Reid W, Bui S, Joppich J, Rose M, Ercan S, Tang Q, Tai AW, Wang Y. **SARS-CoV-2 remodels the Golgi apparatus to facilitate viral assembly and secretion.** bioRxiv. 2024.
- (4) Joshi G, Bekier ME 2nd, Wang Y. **Golgi fragmentation in Alzheimer's disease.** Front Neurosci. 2015.
- (5) Joshi G, Chi Y, Huang Z, Wang Y. **A β -induced Golgi fragmentation in Alzheimer's disease enhances A β production.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2014.
- (6) Mendes LFS, Fontana NA, Reddy ST, Uversky VN, Costa-Filho AJ. **The exquisite structural biophysics of the Golgi Reassembly and Stacking Proteins.** Int J Biol Macromol. 2020.
- (7) Behnia R, Barr FA, Flanagan JJ, Barlowe C, Munro S. **The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic.** Journal of Cell Biology. 2007.

EXPLORING THE ROLE OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN THE STRUCTURE AND MOLECULAR INTERACTIONS OF GRASP65 HOMOLOG PROTEIN 1

Marília Darini de Oliveira da Silva

Luís Felipe Santos Mendes

University of São Paulo

mariliadarini@usp.br

Objectives

The Golgi Complex, an essential organelle in eukaryotic cells, plays a key role in modifying, storing and transporting proteins and lipids. The structure of the Golgi complex, determined mainly by Golgi Reassembly and Stacking Protein and Golgins is unique and its disruption is associated with the progression of several diseases, including various cancers, viral infections and neurodegenerative diseases. However, the molecular mechanisms by which these membrane proteins alter the Golgi membrane structure remain unknown. The membrane anchoring of GRASPs depends on a post-translational modification. In this project we investigate how N-terminal acetylation influences the molecular interactions of the *Saccharomyces cerevisiae* GRASP65 homolog protein with biological membrane models.

Materials and Methods

In this project, we used Circular Dichroism Spectropolarimetry and Differential Scanning Calorimetry techniques. Circular Dichroism (CD) is a spectroscopic technique used to monitor changes in the secondary structures of proteins of interest (Grh1 and AcGrh1), as well as their thermal stabilities. We performed

Circular Dichroism experiments to characterize the thermodynamics of AcGrh1 unfolding and to examine possible changes in the secondary structure content of AcGrh1 and Grh1 in the presence of different membrane models.

Differential Scanning Calorimetry (DSC) is a thermoanalytical technique used in studies of phase transitions and conformational changes of biomolecules. In this project, DSC was used to study the phase transition of pure membranes and lipid compositions, both alone and in the presence of Grh1 and AcGrh1.

Results

The data obtained by Circular Dichroism indicate that the AcGrh1 protein presents a conformation rich in intrinsic disorder, and, when interacting with membrane models with a negative surface charge, it undergoes a conformational change, adopting a structure richer in alpha-helices. However, in the presence of other membrane models, AcGrh1 does not undergo a detectable conformational change. No conformational change in Grh1 was observed in any of the cases studied.

The analysis by Differential Scanning Calorimetry showed that the interaction of AcGrh1 with specific membrane models alters the main thermal transition cooperativity of these membranes. In membrane models with a

negative surface charge, a decrease in the transition cooperativity from the lamellar gel to the liquid-crystalline state was observed, accompanied by an increase in the Phase Transition Temperature (T_{\square}). On the other hand, this change was not detected in membrane models with a neutral surface charge. The absence of changes was also observed in all membrane models studied when Grh1 was not acetylated.

Conclusions

Circular Dichroism data show that the AcGrh1 protein undergoes a disordered/alpha-helix structural transition in the presence of membrane models with negative charge, with N-acetylation being crucial for this transition to occur. Differential Scanning Calorimetry data indicate that efficient anchoring of Grh1 to membranes requires acetylation at the N-terminus and the presence of negative charges in the membranes.

Therefore, in our current model, we propose that the N-terminal region of Grh1 is intrinsically disordered in solution, however, in the presence of a membrane with negative surface charge, this region undergoes a transition from disorder to order. Specifically, the disordered region adopts an alpha-helix conformation, which is amphipathic and responsible for anchoring, with acetylation at the N-terminus being essential for this process. This post-translational modification likely reduces the energy barrier of the disorder/order structural transition responsible for the formation of the amphipathic helix, making it crucial for the anchoring process.

Acknowledgements

I would like to thank the University of São Paulo and the Institute of Physics of São Carlos. I would also like to thank the Group of Biophysics and Structural Biology "Sergio Mascarenhas".

References

- (1) Park K, Ju S, Kim N, Park SY. **The Golgi complex: a hub of the secretory pathway.** BMB Rep. 2021
- (2) Petrosyan, A. **Onco-Golgi: Is Fragmentation a Gate to Cancer Progression?** Biochem Mol Biol J. 2015.
- (3) Zhang J, Kennedy A, de Melo Jorge DM, Xing L, Reid W, Bui S, Joppich J, Rose M, Ercan S, Tang Q, Tai AW, Wang Y. **SARS-CoV-2 remodels the Golgi apparatus to facilitate viral assembly and secretion.** bioRxiv. 2024.
- (4) Joshi G, Bekier ME 2nd, Wang Y. **Golgi fragmentation in Alzheimer's disease.** Front Neurosci. 2015.
- (5) Joshi G, Chi Y, Huang Z, Wang Y. **A β -induced Golgi fragmentation in Alzheimer's disease enhances A β production.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2014.
- (6) Mendes LFS, Fontana NA, Reddy ST, Uversky VN, Costa-Filho AJ. **The exquisite structural biophysics of the Golgi Reassembly and Stacking Proteins.** Int J Biol Macromol. 2020.
- (7) Behnia R, Barr FA, Flanagan JJ, Barlowe C, Munro S. **The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic.** Journal of Cell Biology. 2007.