

Trabalho



Título em Português:	Elucidando mecanismos moleculares da agregação de amiloides funcionais formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano
Título em Inglês:	Elucidating the Molecular Mechanisms of Functional Amyloid Aggregation Formed by Human Corticotropin-Releasing Hormone
Autor:	Jessica de Oliveira Viana
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:	CNPq - PIBIC

ELUCIDANDO OS MECANISMOS MOLECULARES SUBJACENTES À AGREGAÇÃO DE AMILÓIDES FUNCIONAIS FORMADOS PELO HORMÔNIO LIBERADOR DE CORTICOTROPINA HUMANA

Jessica de Oliveira Viana

Murilo de Oliveira Souza

Luis Felipe Santos Mendes

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

jessicaoviana@usp.br

Objetivos

Proteínas intrinsecamente desordenadas podem formar condensados sólidos organizados, como os amiloides. Embora associados a doenças neurodegenerativas, esses agregados também exercem funções fisiológicas, como no armazenamento e liberação de neuropeptídeos em grânulos secretores. Um exemplo é o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que pode ser estocado na forma de amiloide, exigindo que a agregação seja reversível e regulada. No entanto, os mecanismos moleculares que controlam esse processo ainda não são compreendidos. Assim, este trabalho tem como objetivo investigar a formação de amiloides funcionais a partir do CRH, buscando elucidar aspectos morfológicos e cinéticos envolvidos.

Métodos e Procedimentos

O neuropeptídeo CRH foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* (BL21 Star (DE3)), a partir de um plasmídeo contendo sua sequência. A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade, clivagem proteolítica e exclusão molecular. Com o protocolo validado,

iniciaram-se os estudos de amiloidogênese. A caracterização estrutural foi realizada por dicroísmo circular (CD), que permite distinguir a conformação nativa em alfa-hélice da forma amiloide, rica em folhas beta. A fibrilação foi monitorada pela fluorescência da tioflavina T (ThT) [1], e, a partir dos dados cinéticos, foram determinadas constantes associadas à formação de amiloides por meio de uma equação mestra [2], definindo também um limiar temporal para análises futuras.

Resultados

Com a proteína expressa e purificada, a análise das melhores condições para a indução da formação de amiloides foi feita utilizando ambientes que mimetizam espaços intracelulares relevantes. Utilizando a técnicas de CD, foi possível observar uma alteração estrutural de alfa-hélices, para folhas beta em 72h de incubação para 20 μ M de CRH, principalmente em ambientes de pH's mais ácidos (100 mM de tampão fosfato, pH 5,4), temperaturas de incubação de 37°C sob agitação moderada (~250 rpm) para homogeneizar a solução sem interferir na nucleação. (Figura 1). Esse valor de pH é característico do interior dos grânulos de secreção.

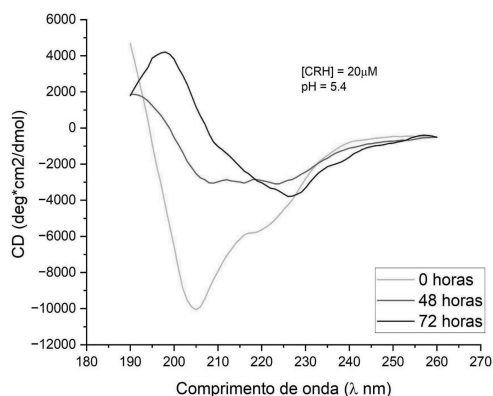


Figura 1 - Espectros de dicroísmo circular do CRH obtidos em diferentes tempos de incubação (0 h, 48 h e 72 h) sob condições miméticas de grânulos de secreção. Observa-se a transição conformacional da proteína ao longo do tempo, evidenciada pelas alterações no perfil espectral.

A incubação de 50 μM de CRH em condições que mimetizam o ambiente fisiológico, incluindo o pH característico do interior dos grânulos de secreção, na presença de 40 μM de ThT para análise de fluorescência, resultou na obtenção de uma curva sigmoidal típica do processo de formação de amiloides. (Figura 2).

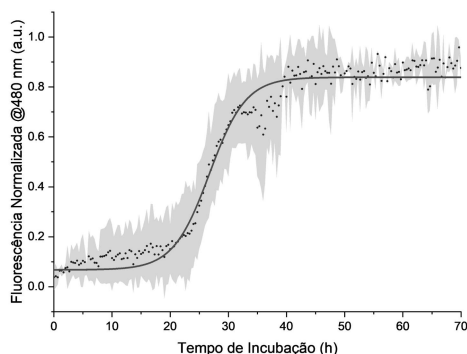


Figura 2: Curva de fluorescência do ThT (40 μM) em função do tempo, monitorando a formação de estruturas amiloides pelo CRH. Observa-se o perfil sigmoidal típico do processo de agregação amiloide.

Seguindo os parâmetros da equação mestra [2] utilizada como *fitting* e as análises

gráficas, podemos, para essa solução, inferir os seguintes parâmetros relacionados à formação dos amiloides: $t_{lag} = (20,6 \pm 0,9)$ horas e $t_{1/2} = (26 \pm 1)$ horas, além da constante $k_{off} = (0,30 \pm 0,07)$ horas⁻¹.

Conclusões

Por meio deste projeto, foi estabelecido um protocolo reprodutível para a expressão e purificação do CRH, e os resultados obtidos fornecem evidências consistentes de sua capacidade de formar amiloides. Essa conclusão é sustentada por mudanças conformacionais detectadas por CD, pelo aumento de fluorescência do ThT e pela observação de curvas cinéticas características do processo de fibrilação. Os dados indicam que o CRH pode assumir conformações amiloides em condições experimentais específicas, com cinética relativamente rápida quando comparada à escala celular e a processos patológicos. Assim, os resultados obtidos fornecem fortes indícios de que o CRH é capaz de formar amiloides funcionais associados ao armazenamento e à secreção celular, contribuindo para o avanço da compreensão dos mecanismos que regulam essa transição e de seu impacto na adaptação das funções fisiológicas.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] Krebs, M.R.H.; Bromley, E.H.C.; Donald, A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of Structural Biology*, v. 149, n. 1, p. 30–37, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847704001534?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- [2] Knowles, Tuomas P. J.; Waudby, Christopher A.; Devlin, Glyn L.; *et al.* An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science*, v. 326, n. 5959, p. 1533–1537, 2009. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1178250?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed>. Acesso em: 24 ago. 2025.

ELUCIDATING THE MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING THE AGGREGATION OF FUNCTIONAL AMYLOIDS FORMED BY HUMAN CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE

Jessica de Oliveira Viana

Murilo de Oliveira Souza

Luis Felipe Santos Mendes

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo

jessicaoviana@usp.br

Objectives

Intrinsically disordered proteins can form organized solid condensates, such as amyloids. Although associated with neurodegenerative diseases, these aggregates also perform physiological functions, such as the storage and release of neuropeptides in secretory granules. One example is corticotropin-releasing hormone (CRH), which can be stored in amyloid form, requiring aggregation to be reversible and regulated. However, the molecular mechanisms that control this process are not yet understood. Thus, this study aims to investigate the formation of functional amyloids from CRH, seeking to elucidate the morphological and kinetic aspects involved.

Materials and Methods

The neuropeptide CRH was obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* (BL21 Star (DE3)), from a plasmid containing its sequence. The recombinant protein was purified by affinity chromatography, proteolytic cleavage, and molecular exclusion. With the validated protocol, amyloidogenesis studies were initiated. Structural characterization was

performed by circular dichroism (CD), which allows distinguishing the native alpha-helix conformation from the amyloid form, rich in beta sheets. Fibrillation was monitored by thioflavin T (ThT) fluorescence [1], and, based on the kinetic data, constants associated with amyloid formation were determined using a master equation [2], also defining a time threshold for future analyses.

Results

With the protein expressed and purified, the analysis of the best conditions for inducing amyloid formation was performed using environments that mimic relevant intracellular spaces. Using CD techniques, it was possible to observe a structural change from alpha-helices to beta sheets after 72 hours of incubation at 20 μ M CRH, mainly in more acidic pH environments (100 mM phosphate buffer, pH 5.4), incubation temperatures of 37°C under moderate agitation (~250 rpm) to homogenize the solution without interfering with nucleation. (Figure 1). This pH value is characteristic of the interior of secretion granules.

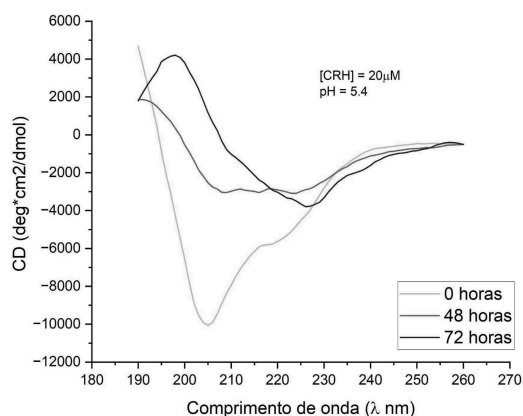


Figure 1 - Circular dichroism spectra of CRH obtained at different incubation times (0 h, 48 h, and 72 h) under conditions mimicking secretory granules. The conformational transition of the protein over time is observed, evidenced by changes in the spectral profile.

Incubation of 50 μM CRH under conditions mimicking the physiological environment, including the characteristic pH of the interior of secretory granules, in the presence of 40 μM ThT for fluorescence analysis, resulted in a sigmoidal curve typical of the amyloid formation process. (Figure 2)

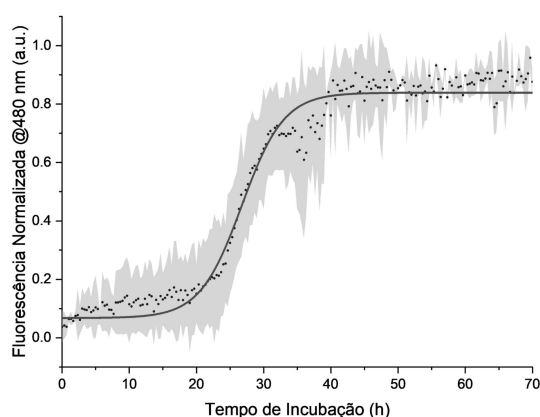


Figure 2: Fluorescence curve of ThT (40 μM) as a function of time, monitoring the formation of amyloid structures by CRH. The typical sigmoidal profile of the amyloid aggregation process can be observed.

Following the parameters of the master equation [2] used as fitting and graphical analysis, we can infer the following parameters related to amyloid formation for this solution: $t_{lag} = (20.6 \pm 0.9)$ hours and $t_{1/2} = (26 \pm 1)$ hours, in addition to the constant $k_{off} = (0.30 \pm 0.07)$ hours⁻¹.

Conclusions

Through this project, a reproducible protocol for the expression and purification of CRH was established, and the results obtained provide consistent evidence of its ability to form amyloids. This conclusion is supported by conformational changes detected by CD, by the increase in ThT fluorescence, and by the observation of kinetic curves characteristic of the fibrillation process. The data indicate that CRH can assume amyloid conformations under specific experimental conditions, with relatively fast kinetics when compared to the cellular scale and pathological processes. Thus, the results obtained provide strong evidence that CRH is capable of forming functional amyloids associated with cellular storage and secretion, contributing to the advancement of understanding of the mechanisms that regulate this transition and its impact on the adaptation of physiological functions.

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Krebs, M.R.H.; Bromley, E.H.C.; Donald, A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of Structural Biology*, v. 149, n. 1, p. 30–37, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847704001534?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 aug. 2025.
- [2] Knowles, Thomas P. J.; Waudby, Christopher A.; Devlin, Glyn L.; *et al.* An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science*, v. 326, n. 5959, p. 1533–1537, 2009. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1178250?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed>. Acesso em: 24 aug. 2025.