

**Trabalho**

|                                    |                                                                                                                         |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Título em Português:</b>        | Elucidando os mecanismos moleculares de amiloides funcionais formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano. |
| <b>Título em Inglês:</b>           | Elucidating Molecular Mechanisms of Functional Amyloid Formed by Human Corticotropin-Releasing Hormone.                 |
| <b>Autor:</b>                      | Gabriel Machado de Oliveira                                                                                             |
| <b>Instituição:</b>                | Universidade de São Paulo                                                                                               |
| <b>Unidade:</b>                    | Instituto de Física de São Carlos                                                                                       |
| <b>Orientador:</b>                 | Luis Felipe Santos Mendes                                                                                               |
| <b>Área de Pesquisa / SubÁrea:</b> | Biofísica Molecular                                                                                                     |
| <b>Agência Financiadora:</b>       | CNPq - PIBIC                                                                                                            |

## **Elucidando os mecanismos moleculares de amiloides funcionais formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano**

**Gabriel Machado de Oliveira**

**Murilo de Oliveira Souza**

**Prof. Dr. Luis Felipe Santos Mendes**

**Instituto de Física de São Carlos - USP São Carlos**

**g.machado@usp.br**

### **Objetivos**

O estudo da cinética de agregação de amiloides é particularmente relevante para o desenvolvimento de terapias contra doenças neurodegenerativas, uma vez que a interrupção desse processo pode constituir uma estratégia terapêutica eficaz. Neste trabalho, o principal objetivo foi estabelecer um protocolo eficiente para a expressão e purificação do Hormônio Liberador de Corticotrofina humano (CRH). Além disso, buscamos validar o sistema de produção e iniciar a caracterização físico-química da proteína, estabelecendo as bases para investigações futuras sobre os mecanismos de agregação do CRH. A implementação bem-sucedida deste protocolo abre caminho para novos estudos detalhados sobre a agregação amilóide e contribui para o avanço na compreensão dos processos associados a doenças neurodegenerativas.

### **Métodos e Procedimentos**

O gene do CRH foi clonado em pET28a fusionado com tioredoxina (TRX) para aumentar a sua solubilidade. Sua expressão

ocorreu por 17 horas à 18°C com indução via isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Para a purificação, as células foram lisadas por sonicação, e o CRH foi majoritariamente encontrado em corpos de inclusão.

Realizaram-se o protocolo de reenovelamento por congelamento e descongelamento lento e a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel como mostra a Figura 1, clivagem no sítio de Tobacco Etch Virus (TEV) e posterior cromatografia por exclusão molecular.

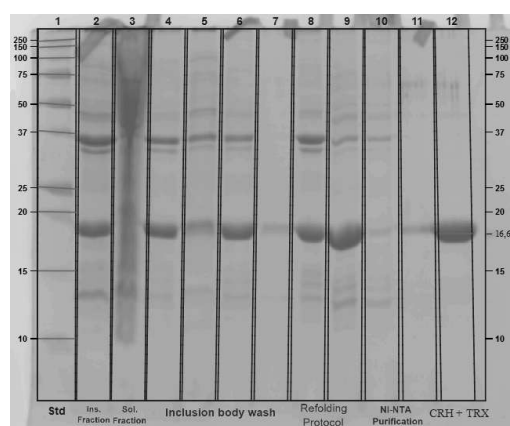


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) como análise dos primeiros passos do protocolo de purificação

Para caracterização, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD) para analisar a estrutura secundária do CRH. Também foi avaliada a estabilidade térmica pelo CD, determinando a temperatura de melting ( $T_m \approx 41^\circ\text{C}$ ), confirmando que as mudanças observadas não se devem à desnaturação, mas ao processo de agregação.

## Resultados

O CRH apresenta uma estrutura majoritariamente desordenada em solução. Após cerca de 48 horas de incubação, ocorre uma transição estrutural com redução das regiões desordenadas e aumento no conteúdo de folhas  $\beta$ , indicando a formação de agregados amilóides. O processo de agregação é fortemente influenciado pelo pH, como demonstrado na figura 2.

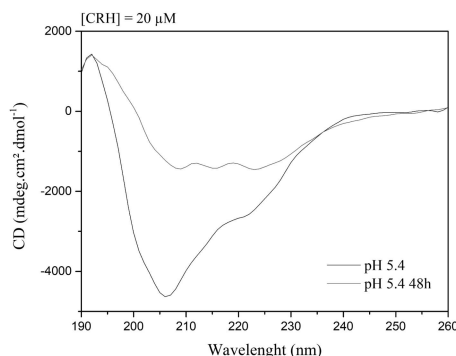


Figura 2 - Espectro de dicroísmo circular para o CRH em pH 5.4 em tampão fosfato.

## Conclusões

Este trabalho estabeleceu com sucesso um protocolo eficiente para a expressão e purificação do CRH, resultando na obtenção da proteína com alto grau de pureza. Além disso, as análises iniciais indicam que o CRH possui uma estrutura predominantemente

desordenada em estado solúvel, mas que, ao longo de 48 horas de incubação, ocorre uma transição estrutural com diminuição do conteúdo desordenado e aumento nas folhas  $\beta$ , característico de agregados amilóides. Esse comportamento corrobora a hipótese de que o microambiente químico, especialmente o pH e a temperatura, influencia significativamente o processo de agregação. Contudo, para um entendimento completo dos mecanismos envolvidos na agregação do CRH, ainda são necessárias caracterizações adicionais. A implementação bem-sucedida deste protocolo estabelece uma base sólida para futuros estudos detalhados sobre a agregação amilóide e contribui para a compreensão dos processos moleculares por trás desse fundamental processo biológico.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

- 1 - G. Serafini, M. Pompili, D. Lindqvist, Y. Dwivedi, P. Girardi, **The Role of Neuropeptides in Suicidal Behavior: A Systematic Review**. Biomed Research International 2013, (2013).
- 2 - Nespovitaya N, Gath J, Barylyuk K, Seuring C, Meier BH, Riek R. **Dynamic Assembly and Disassembly of Functional  $\beta$ -Endorphin Amyloid Fibrils**. Journal of the American Chemical Society. (2016).
- 3 - Otzen, D. & Riek, R. **Functional Amyloids**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 11 (2019).
- 4 - Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, et al. **Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules**. Science. (2009).
- 5 - T. P. J. Knowles and R. Mezzenga, **Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials**. Advance Materials. (2016).
- 6 - N. Jain, N. D. Hammer, X. Wang, B. A. McGuffie, M. R. Chapman, **Amyloid: Friend and Foe**. Handbook of Infection and Alzheimer's Disease 5, 297-311 (2017).

## Elucidating Molecular Mechanisms of Functional Amyloid Formed by Human Corticotropin-Releasing Hormone.

**Gabriel Machado de Oliveira**

**Murilo de Oliveira Souza**

**Prof. Dr. Luis Felipe Santos Mendes**

São Carlos Institute of Physics - USP São Carlos

g.machado@usp.br

### Objectives

The study of amyloid aggregation kinetics is particularly relevant for the development of therapies against neurodegenerative diseases, since interrupting this process may constitute an effective therapeutic strategy. In this work, the main objective was to establish an efficient protocol for the expression and purification of human corticotropin-releasing hormone (CRH). In addition, we sought to validate the production system and begin the physical-chemical characterization of the protein, laying the groundwork for future investigations into the aggregation mechanisms of CRH. The successful implementation of this protocol paves the way for new detailed studies on amyloid aggregation and contributes to advancing the understanding of the processes associated with neurodegenerative diseases.

### Materials and Methods

The CRH gene was cloned into pET28a fused with thioredoxin (TRX) to increase its solubility. Its expression occurred for 17 hours at 18°C with induction via isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

For purification, the cells were lysed by sonication, and CRH was mostly found in inclusion bodies.

The protocol of slow freezing and thawing was performed, followed by purification by affinity chromatography on a nickel column, as shown in Figure 1, cleavage at the Tobacco Etch Virus (TEV) site, and subsequent molecular exclusion chromatography.

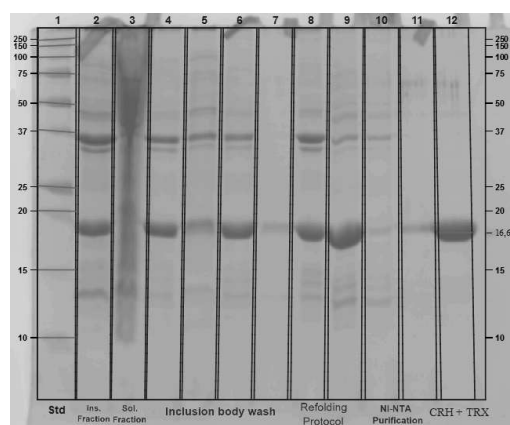


Figure 1 - Polyacrylamide gel electrophoresis (15%) as an analysis of the first steps of the purification protocol.

For characterization, circular dichroism (CD) experiments were performed to analyze the secondary structure of CRH. Thermal stability

was also evaluated by CD, determining the melting temperature ( $T_m \approx 41^\circ\text{C}$ ), confirming that the changes observed are not due to denaturation, but to the aggregation process.

## Results

The protein presents a mostly disordered structure in solution. After approximately 48 hours of incubation, a structural transition occurs with a reduction in disordered regions and an increase in  $\beta$ -sheet content, indicating the formation of amyloid aggregates. The aggregation process is strongly influenced by pH, as shown in Figure 2.

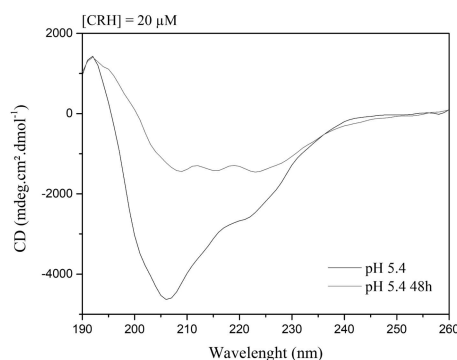


Figure 2 - Circular dichroism spectrum for CRH at pH 5.4 in phosphate buffer.

## Conclusions

This study successfully established an efficient protocol for the expression and purification of CRH, resulting in the obtaining of a protein with a high degree of purity. Furthermore, initial analyses indicate that CRH has a predominantly disordered structure in its soluble state, but that, over 48 hours of incubation, a structural transition occurs with a decrease in disordered content and an increase in  $\beta$ -sheets, characteristic of amyloid aggregates. This behavior supports the hypothesis that the

chemical microenvironment, especially pH and temperature, significantly influences the aggregation process. However, for a complete understanding of the mechanisms involved in CRH aggregation, further characterization is still needed. The successful implementation of this protocol establishes a solid foundation for future detailed studies on amyloid aggregation and contributes to the understanding of the molecular processes behind this fundamental biological process.

The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 - G. Serafini, M. Pompili, D. Lindqvist, Y. Dwivedi, P. Girardi, **The Role of Neuropeptides in Suicidal Behavior: A Systematic Review**. Biomed Research International 2013, (2013).
- 2 - Nespovitaya N, Gath J, Barylyuk K, Seuring C, Meier BH, Riek R. **Dynamic Assembly and Disassembly of Functional  $\beta$ -Endorphin Amyloid Fibrils**. Journal of the American Chemical Society. (2016).
- 3 - Otzen, D. & Riek, R. **Functional Amyloids**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 11 (2019).
- 4 - Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, et al. **Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules**. Science. (2009).
- 5 - T. P. J. Knowles and R. Mezzenga, **Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials**. Advance Materials. (2016).
- 6 - N. Jain, N. D. Hammer, X. Wang, B. A. McGuffie, M. R. Chapman, **Amyloid: Friend and Foe**. Handbook of Infection and Alzheimer's Disease 5, 297-311 (2017).