Título: Mimetização da matriz extracelular com hidrogel supramolecular: design de um sistema *in vitro* mais realista para investigação estrutural de proteínas.
Pesquisador responsável: Juliana Sakamoto Yoneda
Unidade do CNPEM: Laboratório Nacional de Luz Sincrotron - LNLS

Introdução e motivação

Proteínas são biomacromoléculas com uma impressionante diversidade de funções biológicas. A função de uma determinada proteína está relacionada à sua estrutura no espaço tridimensional, que por sua vez, é consequência da sua estrutura primária (sequência de aminoácidos). Um enovelamento apropriado é necessário para que a proteína exerça corretamente a sua função. Por outro lado, um dobramento incorreto, desnaturação e agregação implicam em perda de função, o que está intimamente ligado a diversas doenças [1]. Devido a essa importante relação estrutura-função que as proteínas apresentam, estudos estruturais são fundamentais na investigação do envolvimento dessas macromoléculas em funções biológicas.

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD – do inglês *Circular Dichroism*) é uma das técnicas aplicadas no estudo estrutural de proteínas. Essa técnica é baseada na absorção diferencial da luz circularmente polarizada para esquerda e para direita por uma molécula quiral. A partir do espectro de CD de uma proteína é possível determinar o conteúdo de sua estrutura secundária (por exemplo, a porcentagem de alfa-hélice, folhas-beta e regiões desordenadas) [2] e também identificar possíveis mudanças conformacionais devido à interação com ligantes, o que é valioso no desenvolvimento de novas drogas. Do ponto de vista experimental, as medidas de CD são normalmente conduzidas em soluções diluídas. No entanto, sabe-se que o sistema *in vivo* é um ambiente aglomerado onde as proteínas estão confinadas em um sistema com uma complexidade muito superior ao sistema simplificado *in vitro* tipicamente analisado [3].

Os termos “crowding” e “confinement” em inglês são utilizados para descrever diferentes mecanismos pelos quais a estrutura e difusividade da proteína são alteradas por interações com moléculas ou estruturas vizinhas. *Crowding* está relacionado com o volume excluído causado pela presença de moléculas solúveis na vizinhança em altas concentrações e o termo *confinement* se refere a exclusão de volume por estruturas rígidas ou fixas [4]. Portanto, para a realização de medidas em situações mais próximas das fisiológicas, agentes aglomerantes (*crowders*) em diferentes concentrações podem ser adicionados. Ainda, hidrogéis podem ser utilizados para mimetizar o efeito de confinamento do citoesqueleto e da matriz extracelular. Para essa finalidade, as proteínas podem ser incorporadas dentro da malha tridimensional do hidrogel e essa pode ser uma plataforma interessante para determinar se o ambiente de confinamento da proteína interfere na sua estrutura e estabilidade. Vale ressaltar que as propriedades físicas da matriz (tamanho da malha, poros, viscosidade) de um hidrogel podem ser controladas, possibilitando analisar como esses parâmetros influenciam na estrutura proteica.

Apesar de que essa característica de ambiente tumultuado e complexo do meio biológico seja amplamente conhecida e aceita, ela é corriqueiramente negligenciada em estudos *in vitro*, onde a proteína é normalmente analisada em seu estado puro, em solução diluída ou em cristais. Portanto, estabelecer sistemas *in vitro* mais complexos que se aproximem das condições encontradas *in vivo* é essencial para a evolução dos estudos estruturais dessas importantes biomacromoléculas.

Como a técnica de CD fornece informações a respeito da estrutura proteica, ela pode ser uma ferramenta valiosa na avaliação do efeito *crowding*. No entanto, realizar medidas de CD em um ambiente complexo não é trivial e uma relevante atenção deve ser dada a possíveis artefatos devido ao sistema escolhido, como a alta absorção de luz do próprio suporte, espalhamento e sinais interferentes de CD. Assim, esse projeto pretende analisar a viabilidade de medidas de CD de uma proteína incorporada em um ambiente confinado, produzindo um sistema *in vitro* com propriedades mais compatíveis com o que é encontrado *in vivo*.

Objetivo

Geral

O objetivo desse projeto é analisar, por dicroísmo circular, possíveis efeitos na estrutura de proteínas em um ambiente confinado, utilizando o hidrogel supramolecular de guanosina como plataforma.

Específicos

- Produzir um sistema *in vitro* (hidrogel + proteína) simulando a situação de confinamento de proteínas;
- Obter os espectros de CD da proteína em ambiente confinado e em solução diluída para fins comparativos; realizando as adaptações necessárias para a viabilidade da medida;
- Realizar o estudo comparando diferentes proteínas: citocromo C (CitC), albumina de soro bovina (BSA) e lisozima (LIS).

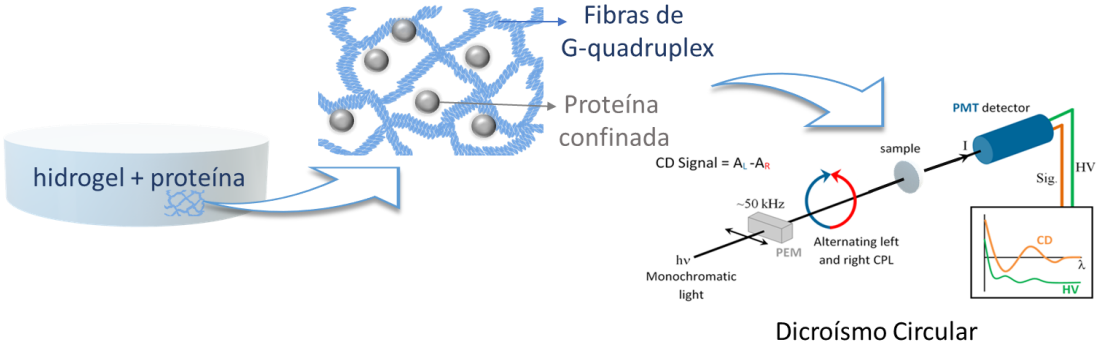

Figura 1. Representação esquemática do objetivo do projeto. A proteína de estudo é encapsulada na matriz do hidrogel para a simulação de um ambiente de confinamento. A amostra (hidrogel + proteína) é analisada por dicroísmo circular.

Metodologia

Preparação do sistema de hidrogel para o confinamento de proteínas

O hidrogel de guanosina será utilizado como plataforma para a simulação do ambiente confinado. A sua preparação foi previamente descrita pela responsável do projeto [5]. Esse hidrogel é produzido pela mistura de guanosina monofosfato (GMP) e guanosina (G) e dependendo da proporção entre os dois componentes, as características físicas (tamanho da malha, viscosidade, temperatura de transição) são reguláveis [6].

Encapsulamento das proteínas na malha do hidrogel de guanosina

A investigação será realizada utilizando diferentes proteínas modelo: CitC, BSA e LIS. As soluções de proteínas serão preparadas em água e colocadas sobre os hidrogéis para permeação das moléculas de proteínas dentro da matriz do suporte como descrito anteriormente [5].

Dicroísmo Circular

As medidas de dicroísmo circular com radiação sincrotron serão realizadas na linha de luz CEDRO – LNLS, utilizando um espectrômetro de CD (DSM-20, Olis).

Devido à quiralidade do hidrogel baseado em guanosina, o sinal de CD do complexo hidrogel + proteína será a soma do sinal de cada componente. Assim, para obtermos o sinal da proteína, o sinal referente ao hidrogel deverá ser descontado. Na região acima de 240 nm a proteína não apresenta sinal enquanto a guanosina sim, então poderemos usar essa região como controle da quantidade de hidrogel presente na amostra. Devido à alta absorção do hidrogel na região de interesse (200 - 300 nm) teremos que minimizar o caminho óptico da célula, pois caso contrário haverá um bloqueio e poucos (ou nenhum) fótons chegarão no detector, prejudicando o sinal. Particular atenção deverá ser dada a possíveis efeitos de espalhamento. Para minimizar esse efeito, a amostra deverá ser posicionada bem próxima ao tubo do detector

(fotomultiplicadora) aumentando o ângulo de detecção. Caso as estratégias para permitir uma medida confiável de CD não sejam bem-sucedidas, poderemos optar pela utilização de um agente aglomerante transparente na região UV de interesse, como o polietileno glicol (PEG).

Com o desenvolvimento desse projeto o(a) estudante de iniciação científica aprenderá, ou se já possuir alguma experiência prévia, aprofundará os conhecimentos na técnica de CD, detectando possíveis artefatos e traçando estratégias para minimizá-los e/ou corrigi-los. Ainda, o(a) aluno(a) irá desenvolver habilidades em relação ao processamento de dados (espectros de CD) com o uso softwares para análise quantitativa do conteúdo de estrutura secundária de proteínas. Além disso, o(a) estudante irá adquirir experiência em produzir e caracterizar biomateriais (hidrogeis supramoleculares biocompatíveis e biodegradáveis formados por G-quadruplex) com potencial aplicação em biomedicina.

Referências

[1] F.U. Hartl, Protein misfolding diseases, Annu. Rev. Biochem. (2017). https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044518.
[2] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, Biochim Biophys Acta. 1751 (2005) 119–139. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
[3] M.L. Ross, J. Kunkel, S. Long, P. Asuri, Combined effects of confinement and macromolecular crowding on protein stability, Int. J. Mol. Sci. (2020). https://doi.org/10.3390/ijms21228516.
[4] L.W. Simpson, T.A. Good, J.B. Leach, Protein folding and assembly in confined environments: Implications for protein aggregation in hydrogels and tissues, Biotechnol. Adv. (2020). https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107573.
[5] J.S. Yoneda, D.R. de Araujo, F. Sella, G.R. Liguori, T.T.A. Liguori, L.F.P. Moreira, F. Spinozzi, P. Mariani, R. Itri, Self-assembled guanosine-hydrogels for drug-delivery application: Structural and mechanical characterization, methylene blue loading and controlled release, Mater. Sci. Eng. C. 121 (2021) 111834. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111834.
[6] F. Carducci, J.S. Yoneda, R. Itri, P. Mariani, On the structural stability of guanosine-based supramolecular hydrogels, Soft Matter. 14 (2018) 2938–2948. https://doi.org/10.1039/C8SM00299A.