UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

SABRINA DORTA DE OLIVEIRA

**Caracterização estrutural e funcional da construção do domínio *core* da Hep1
humana (hHep1_*core*)**

São Carlos
2021

SABRINA DORTA DE OLIVEIRA

Caracterização estrutural e funcional da construção do domínio *core* da Hep1 humana (hHep1_*core*)

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química orgânica e biológica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges.

São Carlos
2021

Agradecimentos

Inicio meus agradecimentos dedicando a Deus toda minha gratidão por seu imenso amor que tem me sustentado em todos os dias da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Júlio César Borges pela oportunidade e pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto, também sou grata por sua disponibilidade e atenção às minhas dúvidas durante este período.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório M.Sc Amanda, Carlos, Dra. Noeli e M.Sc Vanessa; por tudo que me ensinaram na bioquímica e fora dela, pelas palavras de encorajamento e pela companhia nos longos experimentos, simplesmente para me apoiar. Vocês são incríveis! Nunca vou me esquecer do quanto me ajudaram.

Agradeço também às Pós Doutorandas Dra. Silvia e Dra. Milene que me ensinaram muito sobre química e bioquímica, mas me ensinaram ainda mais sobre humildade, responsabilidade, amor e compromisso com a ciência. Admiro muito vocês meninas!

Aqui agradeço ao apoio das pessoas mais importantes da minha vida: minha família! Aos meus pais, Isaac e Luciana, à minha irmã, Gabrieli, e à minha avó, Aparecida que sempre me apoiaram em toda a minha carreira acadêmica comemorando cada pequeno passo em rumo aos meus sonhos. Eu amo vocês! Também agradeço aos meus tios, Alberto e Silvana, à minha priminha, Lavínia, e aos meus sogros, Silvana e Marcos, pelo cuidado, encorajamento e por suas orações por mim. Agradeço especialmente ao meu marido, Cainã, por permanecer me protegendo e sempre me ajudando a me reerguer, acreditando em mim mais do que eu mesma. Sem você, meu amor, eu não teria sido capaz.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil - Código de Financiamento 130998/2019-2.

“Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles” (CURIE, 1938)

Resumo

As chaperonas moleculares ou *Heat shock proteins* (Hsps) da família Hsp70 atuam em diversos compartimentos celulares cooperando para a manutenção da proteostase celular. Dentre elas, a HSPA9 (Hsp70 mitocondrial humana) tem sido amplamente estudada como alvo molecular pela gama de funções que exerce, principalmente na mitocôndria, e sua correlação com doenças neurodegenerativas e na apoptose celular. Entretanto, devido à sua tendência à autoagregação, sua manutenção estrutural e funcional depende da interação com a *Hsp70 escort protein 1* (Hep1), uma cochaperona pequena, conservada em eucariotos, que a mantém solúvel tanto *in vivo*, como *in vitro*. Além da manutenção à solubilidade, a Hep1 humana (hHep1) apresenta uma capacidade de estímulo à atividade ATPásica da HSPA9 e interação com outras HSPAs (Hsp70 de humanos). Este trabalho desenvolveu uma caracterização estrutural e funcional comparativa da hHep1 com uma mutante, cujos terminais N e C foram truncados, denominada hHep1_*core*. Esta construção mantém o motivo *zinc finger* e resíduos que já se mostraram essenciais à interação da hHep1 com a HSPA9. Análises estruturais realizadas neste trabalho mostraram que a hHep1_*core* possui uma estrutura muito semelhante à da hHep1, indicando que esta construção pode ser utilizada como uma ferramenta de estudos para a elucidação de aspectos estruturais e energéticos da interação entre hHep1 e HSPAs. No entanto, a ausência das regiões truncadas afeta a estabilidade da mutante, indicando uma possível função do N e/ou C-terminal da hHep1 na estabilização de sua estrutura tridimensional. Os resultados mostram que a hHep1_*core* foi capaz de interagir e estimular a atividade ATPásica da HSPA9. Contudo a mutante não preveniu a agregação da HSPA9 ou de proteínas-cliente padrão, sugerindo que as regiões truncadas também podem cooperar para a atividade chaperona intrínseca da hHep1.

Palavras-chave. Hsp70 *escort protein*. mtHsp70. Mortalina. HSPA9. hHep1. hHep1_*core*.

Abstract

Molecular chaperones or Heat shock proteins (Hsps) of the Hsp70 family act in several cellular compartments cooperating for the maintenance of cellular proteostasis. Among them HSPA9 (human mitochondrial Hsp70) has been widely studied as a molecular target due to the range of functions it plays and its correlation with neurodegenerative diseases and cell apoptosis, especially in mitochondria. Nevertheless due to its tendency to self-aggregate, its structural and functional maintenance depends on the interaction with Hsp70 escort protein 1 (Hep1), a small cochaperone, conserved in eukaryotes, which keeps it soluble both *in vivo* and *in vitro*. In addition to maintaining solubility, human Hep1 (hHep1) has the ability to stimulate the ATPase activity of HSPA9 and interact with other HSAs (Hsp70 from humans). This work developed a comparative structural and functional characterization of hHep1 with a mutant, whose N and C terminals were truncated, named hHep1_core. This construction maintains the zinc finger motif and residues that have proven essential to the interaction of hHep1 with HSPA9. Structural analyzes performed in this work showed that hHep1_core has a structure very similar to that of hHep1, indicating that this construction can be used as a study tool to elucidate structural and energetic aspects of the interaction between hHep1 and HSAs. However the absence of truncated regions affects the stability of the mutant indicating a possible role of the N and/or C-terminus of hHep1 in stabilizing its three-dimensional structure. The results show that hHep1_core was able to interact and stimulate the ATPase activity of HSPA9. Yet the mutant did not prevent aggregation of HSPA9 or standard client proteins, suggesting that the truncated regions may also cooperate for the intrinsic chaperone activity of hHep1.

Keywords: Hsp70 escort protein. mtHsp70. Mortalin. HSPA9. hHep1. hHep1_core.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de superfície de energia em funil que as proteínas recém sintetizadas percorrem	13
Figura 2: Funções das chaperonas moleculares no sistema de proteostase celular.	15
Figura 3: Domínios proteicos das Hsp70s.	18
Figura 4: Esquema do ciclo realizado pela maquinaria das Hsp70s.	20
Figura 5: Modelo de enovelamento e manutenção da solubilidade da mtHsp70 auxiliada pela Hep1.	23
Figura 6: Esquema do modelo de ação da hHep1 sobre conjuntos supramoleculares de HSPAs.	24
Figura 7: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das homólogas hHep1 e yHep1.	26
Figura 8: Estrutura 3D da Tim15c	27
Figura 9: Alinhamento da sequência de aminoácidos da hHep1.	29
Figura 10: Modelo da estrutura tridimensional da hHep1 Δ_{mts}	30
Figura 11: Diagrama esquematizando as regiões da hHep1	33
Figura 12: Análise das condições de indução à expressão da hHep1 _{core}	44
Figura 13: Esquematização das etapas do processo de purificação em função das trocas de pH do meio.	45
Figura 14: Etapas do processo de purificação da hHep1 _{core}	46
Figura 15: Modelo computacional por homologia da hHep1 _{core}	49
Figura 16: Caracterização estrutural da hHep1 _{core} em solução.	51
Figura 17: Avaliação da integridade estrutural de amostras de hHep1 _{core} em função do tempo.	54

Figura 18: SDS-PAGE de amostras de hHep1_core purificadas na ausência de íons fosfato.	55
Figura 19: Estabilidade da hHep1_core em função da concentração.....	56
Figura 20: Avaliação da estabilidade química da hHep1_core frente aos agentes desnaturantes ureia e GndHCl..	59
Figura 21: Estabilidade da hHep1_core na presença do agente quelante EDTA.	62
Figura 22: Efeito combinado de agente quelante e caotrópico.....	63
Figura 23: Interação entre hHep1_core e HSPA9.	65
Figura 24: Comparação entre cromatogramas da mistura de BSA	67
Figura 25: Atividade chaperona intrínseca da hHep1_core..	68
Figura 26: Modelo da ação de hHep1_core.....	70
Figura 27: Efeito da hHep1_core sobre a atividade ATPásica da HSPA9.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Chaperonas: suas funções e cofatores	16
Tabela 2: Condições de Indução à expressão da hHep1_core	34
Tabela 3: Proteínas globulares padrões	38
Tabela 4: Comparativo entre a deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD para hHep1_core e hHep1 Δ_{mts}	52
Tabela 5: Comparativo de dados hidrodinâmicos entre hHep1 Δ_{mts} e hHep1_core	53
Tabela 6: MM _{app} e R _s em função da concentração de hHep1_core	57
Tabela 7: Tempos de eluição das amostras de misturas de HSPA9 e hHep1_core em diferentes proporções e das proteínas puras.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- [θ]**: elipticidade molar residual média;
- < λ >**: Centro de massa espectral;
- aSEC**: cromatografia de exclusão por tamanho analítica (do inglês *analytical size exclusion chromatography*);
- ATP**: adenosina trifosfato;
- BSA**: albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*);
- CD**: dicroísmo circular (do inglês *circular dichroism*);
- C_m**: Concentração média de transição;
- ΔG** : Energia livre de Gibbs;
- DLN**: domínio de ligação de nucleotídeos adenosina das Hsp70s;
- DLP**: domínio de ligação de proteínas-cliente das Hsp70s;
- DLP α** : subdomínio em hélice α do DLP;
- DLP β** : subdomínio em folhas β pregueadas do DLP;
- DnaK**: Hsp70 de *E. coli*;
- DO_{600nm}**: densidade ótica do meio medida por absorção em 600 nm;
- DOPE**: *discrete optimized protein energy*;
- EC₅₀**: *Half maximal effective concentration*;
- EDTA**: ácido etilenodiaminotetracético;
- f/f_0** : Razão friccional;
- f** : Coeficiente friccional;
- GndHCl**: cloridrato de guanidina
- Hep1**: Hsp70 *escort protein* 1;
- Hep2**: Hep plastídica;
- hHep1_{core}**: mutante correspondente à região *core* da hHep1;
- hHep1 Δ_{mts}** : construção mutante da hHep1 sem a região correspondente ao peptídeo sinal;
- Hsp**: proteína de choque térmico (do inglês *Heat shock protein*)
- IPTG**: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
- K_{AV}**: coeficiente de partição;
- K_D**: constante de dissociação
- LB**: meio de cultura Lysogeny Broth
- LBBP**: Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas –IQSC/USP

LbHep1: Hep1 de *Leishmania brasiliensis*.

MM: massa molecular

MM_{app}: massa molecular aparente

mtHsp70: Hsp70 mitocondrial

NEF: fator de troca de nucleotídeo (do inglês *nucleotide exchange fator*)

PDB: banco de dados de estrutura em alta resolução de proteínas (do inglês *Protein Data Bank*)

P_i: fosfato inorgânico;

RMN: ressonância magnética nuclear;

R_s: raio de Stokes

SEC-MALS: Cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *size exclusion chromatography*) acoplada à um detector de dispersão de luz em múltiplos ângulos (do inglês *Multi Angle Light Scattering*);

SMAs: complexos supramoleculares;

Tim15: yHep1

yHep1: Hep1 de levedura

λ: Comprimento de onda;

λ_{max}: Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência;

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA	12
Chaperonas moleculares	14
Hsp70s e suas cochaperonas	16
HSPA9	20
<i>Hsp70 escort proteins</i>	24
hHep1	27
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
METODOLOGIA.....	34
Obtenção e purificação	34
Análise estrutural	36
Estudos de estabilidade	39
Estudos de interação	41
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
Obtenção e purificação	44
Expressão da hHep1_core	44
Purificação da hHep1_core	44
Análise estrutural	48
Modelagem computacional	48
Análise estrutural em solução	51
Análises de estabilidade.....	54
Estabilidade temporal.....	54
Estabilidade em diferentes concentrações.....	56
Estabilidade Química	58
Estudos de interação	64
Análise da interação entre hHep1_core e HSPA9	64
Atividade chaperona intrínseca da hHep1_core.....	67
Ação sobre atividade ATPásica da HSPA9.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
Sugestões para trabalhos futuros.....	75
BIBLIOGRAFIA	77

REVISÃO DA LITERATURA

Proteínas são macromoléculas extremamente essenciais aos processos celulares. A diversidade de funções que estas macromoléculas executam provém das complexas estruturas tridimensionais flexíveis que podem adquirir¹. Tais estruturas são codificadas pelas informações genéticas contidas nos ácidos nucleicos, gerando assim uma sequência de aminoácidos (estrutura primária) que guiará a formação das estruturas secundárias e terciárias. Atualmente, o modelo que melhor descreve o processo de enovelamento destas macromoléculas, consiste em uma superfície rugosa de energia potencial em funil, onde a formação de uma rede de interações intramoleculares direciona para a obtenção de uma conformação funcional que corresponda ao mínimo de energia potencial, denominada conformação nativa, conforme esquematizado na Figura 1 (HAYER-HARTL; HARTL; BRACHER, 2011; DAHIYA; BUCHNER, 2019). Apesar disso, seu ΔG é pouco negativo, permitindo assim movimentos necessários à execução de suas funções (CAMBERG et al., 2013; HAYER-HARTL; HARTL; BRACHER, 2011; DAHIYA; BUCHNER, 2019).

A extensão da cadeia polipeptídica e a topologia da estrutura a ser formada definem a complexidade do processo de enovelamento para a formação das várias conformações possíveis. Quanto mais intrincada e longa a estrutura tridimensional maior o número de intermediários possíveis, aumentando as barreiras cinéticas impostas. Proteínas recém-sintetizadas emergentes do ribossomo, ao entrar em contato com o meio aquoso, tendem a sofrer um colapso hidrofóbico, enterrando seus aminoácidos apolares. Este processo leva à formação de intermediários não nativos ou glóbulos desorganizados que necessitam reorganizar suas interações para alcançar o estado nativo (KERNER et al., 2005; HAYER-HARTL; HARTL; BRACHER, 2011; DAHIYA; BUCHNER, 2019).

A conformação nativa é essencial para a funcionalidade e estabilidade proteica. Quando proteínas estão fora desta conformação elas expõem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que podem levar à formação de agregados de alta toxicidade. Estes agregados são capazes de formar agregados fibrilares que podem danificar a membrana

¹ Desafiando o princípio clássico de terem suas funções definidas por estruturas tridimensionais bem definidas, algumas proteínas ocorrem nativamente desenoveladas. A desordem conformacional destas estruturas se mostram essenciais para suas funções celulares. (DYSON; WRIGHT, 2005; DEIANA et al., 2019).

celular (SAIBIL, 2013; HAYER-HARTL; HARTL; BRACHER, 2011; DAHIYA; BUCHNER, 2019).

A fim de garantir que as proteínas encontrem-se corretamente enoveladas e funcionais, as células possuem um sistema de proteostase que consiste na integração de várias classes de proteínas: chaperonas moleculares, sistema ubiquitina-proteassoma e sistema autofágico. Falhas nestes sistemas estão correlacionadas à doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e Huntington; demência; diabetes tipo 2; amiloidose periferal; doenças de armazenamento lisossomal; fibrose cística; câncer e doenças cardiovasculares (POWERS et al., 2009; HAYER-HARTL; HARTL; BRACHER, 2011).

Figura 1: Diagrama de superfície de energia em funil que as proteínas recém sintetizadas percorrem. Evidencia-se a competição entre o estabelecimento de interações inter ou intramoleculares, levando ao enovelamento nativo ou a formação de agregados, respectivamente. A rugosidade da superfície representa as barreiras cinéticas a serem vencidas pelos intermediários. A atuação das chaperonas moleculares auxilia acelerando estes passos cinéticos.

Fonte: Modificado de (a) Hayer-Hartl, Hartl e Bracher (2011) e (b) Camberg et al. (2013).

Chaperonas moleculares

O enfoque deste trabalho está nas chaperonas moleculares que são definidas por Hayer-Hartl, Hartl e Bracher (2011) como “*qualquer proteína que interage com, estabiliza ou ajuda outra proteína a adquirir sua conformação funcionalmente ativa, sem estar presente em sua estrutura final.*” Essas proteínas são necessárias para garantir o enovelamento proteico de forma eficiente na escala de tempo necessária para seu emprego na célula, evitando a agregação de estruturas intermediárias no meio celular. Este papel das chaperonas moleculares também é representado na Figura 1, onde elas atuam auxiliando as proteínas desenoveladas a superar as barreiras cinéticas dos intermediários não nativos.

Além de atuarem protegendo cadeias polipeptídicas nascentes e auxiliando no enovelamento *de novo*, as chaperonas também auxiliam o re-enovelamento de proteínas danificadas por processos de estresse celular, como choque térmico ou estresse oxidativo; promovem a reversão da agregação; medeiam processos de desmontagem direcionada, assistindo a degradação proteolítica, e atuam no tráfego de proteínas, conforme apresentado na Figura 2 (CAMBERG et al., 2013). As proteínas assistidas pelas chaperonas moleculares são denominadas proteínas-cliente.

Condições de estresse celular promovem uma regulação positiva na expressão de chaperonas moleculares, por isso elas foram inicialmente nomeadas *Heat shock proteins* (*Hsp*), no entanto, muitas delas também são constitutivamente expressas (LINDQUIST; CRAIG, 1988; BORGES; RAMOS, 2005). As chaperonas moleculares são classificadas em famílias quanto as suas massas moleculares, sendo as mais representativas as Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e as smHsp (do inglês *small Hsp*) (KAMPINGA; CRAIG, 2010). Estas famílias não conservam semelhanças em suas estruturas primárias ou mecanismos de ação, mas compartilham a característica de atuarem sobre uma ampla variedade de proteínas não nativas, com baixa especificidade ao substrato, e auxiliam em processos complexos e altamente específicos, o enovelamento proteico (BLATCH; EDKINS, 2015; SAIBIL, 2013).

Figura 2: Funções das chaperonas moleculares no sistema de proteostase celular. Os diversos papéis exercidos pelas famílias das chaperonas moleculares são correlacionados aos eventos celulares.

Fonte: Modificado de Camberg et al. (2013).

As Hsp100, Hsp90, Hsp70 e Hsp60 são chaperonas ATP-dependentes que formam maquinarias moleculares integrando proteínas parceiras e sofrendo regulações por cofatores. Quando estes cofatores consistem em outras chaperonas estes são denominados cochaperonas. As Hsp70s e Hsp90s possuem estruturas assimétricas que permitem a exposição de sítios de regulação, desta forma, atuam como sistemas altamente interativos, empregando diversos parceiros e cofatores. As Hsp60 e Hsp100, por outro lado, com seus sítios ativos enterrados, formam sistemas mais “solitários” atuando com poucos parceiros (SAIBIL, 2013).

As *smHsp* são uma classe de chaperonas com massa molecular entre 15-40 kDa que diferem em sua sequência e tamanho, o que sugere uma ampla diversidade de funções. Elas atuam em situações de estresse celular protegendo proteínas não nativas e auxiliando em seu re-enovelamento em cooperação com Hsp70s (FRANCK et al., 2004 *apud* DAHIYA; BUCHNER, 2019; HASLBECK; BUCHNER, 2002; TISSIERES;

MITCHELL; TRACY, 1974). A **Tabela 1** relaciona as famílias de chaperonas moleculares às suas principais funções e cofatores.

Tabela 1: Chaperonas: suas funções e cofatores

Chaperonas ATP-dependentes		
Chaperonas	Cofatores	Funções
smHsp		Primeira linha de defesa em situações de estresse celular; estabilizam proteínas desenoveladas/mal enoveladas até seu re-enovelamento correto por sistemas chaperonas ATP-dependentes; mantêm índice de refração da lente ocular (vertebrados).*
Hsp60	Hsp10 (CPN10) e GroES	Enovelamento proteico e prevenção à agregação.
Hsp70	Hsp40, DnaJ, Sis1, Hdj1, NEFs, GrpE, Hsp110	Desenovelamento, desagregação, estabilização de cadeias, translocação através das membranas de organela, dobramento, regulação da resposta ao choque térmico, direcionando substratos para degradação;
Hsp90	HOP, p50, AHA1, p23, FKP52, UNC45	Ligação, estabilização e maturação de receptores de esteroides e proteína quinases, entrega a proteases, tampão para variação genética, regulação da seleção de substrato e destino, montagem de miosina;
Hsp100	Hsp70s, ClpP, ClpS	Desenovelamento, proteólise, termotolerância, ressolubilização de agregados, remodelação.

Fonte: Adaptado de Saibil (2013) e Strauch e Haslbeck (2016)*

Hsp70s e suas cochaperonas

As Hsp70s são as chaperonas moleculares mais abundantes sendo altamente conservadas entre organismos procariotos e eucariotos, nos quais possuem ortólogas em diferentes compartimentos celulares (SAIBIL, 2013). As proteínas que compõem esta família estão envolvidas em processos de enovelamento e re-enovelamento, maturação, sinalização, transporte celular e por membranas, marcação e degradação de proteínas e desagregação de agregados moleculares (BLATCH; EDKINS, 2015; DAHIYA; BUCHNER, 2019). Estas proteínas também atuam como sentinelas protegendo a célula de uma ampla gama de estresses proteotóxicos relacionados à diversas patologias (ROSENZWEIG et al., 2019). A diversidade de funções e a ampla gama de proteínas clientes das Hsp70s são essenciais para o crescimento celular tornando estas chaperonas objetos de estudo de grande interesse (ROSENZWEIG et al., 2019).

As estruturas das Hsp70s compartilham pelo menos duas das quatro estruturas do arquétipo da Hsp70 (DnaK): o domínio de ligação ao nucleotídeo (DLN), em N-terminal (45 kDa); seguido pelo domínio de ligação proteína cliente (DLP β) de cerca de 15 kDa; um domínio helicoidal (DLP α), de 10 kDa, e um segmento C-terminal de estrutura desordenada e tamanho variável (ROSENZWEIG et al., 2019).

O DLN possui baixa atividade de hidrólise de nucleotídeos adenosina trifosfatados (ATP). Sua estrutura é composta por quatro subdomínios flexíveis que se arranjam em torno de uma fenda profunda onde se encontra o sítio de ligação ao nucleotídeo. O DLP consiste em uma estrutura fina com uma fenda (DLP β) coberta por uma tampa móvel (DLP α). A fenda ou sítio de ligação de proteínas-cliente se encontra em meio a uma estrutura em β -sanduíche capaz de reconhecer extensões ricas em resíduos hidrofóbicos, preferencialmente próximas à resíduos de aminoácidos positivamente carregados. A tampa móvel é formada por uma estrutura α helicoidal (RÜDIGER; BUCHBERGER; BUKAU, 1997; ZHU et al., 1996). Um esquema desta estrutura é apresentado na Figura 3a.

Os domínios DLN e DLP formam um sistema alostérico bidirecional heterotrópico, ou seja, a estrutura proteica sofre alterações conformacionais induzidas por ligantes que são transmitidas em ambas as direções (DA SILVA; BORGES, 2011). As estruturas chave para a regulação deste mecanismo são a região *linker* e seu sítio de ligação em DLN, no estado ligado a ATP, que são responsáveis pela transmissão de informações intradomínios (SAIBIL, 2013; DA SILVA; BORGES, 2011).

Durante o ciclo alostérico das Hsp70s, após a ligação de ATP, a fenda do DLN se fecha provocando uma sinalização que expõe um sítio de acoplamento para a região *linker* que, por sua vez, recruta o DLP. Neste processo, o DLP sofre uma distorção que faz com que a tampa α -helicoidal esteja em uma conformação extremamente aberta, quase envolvendo o DLN. Esta distorção expõe a fenda de ligação à sequência de aminoácidos da proteína-cliente no subdomínio β -sanduíche, possibilitando a ligação das mesmas (Figura 3b). Após a hidrólise de ATP, a fenda de DLN se abre revertendo o processo de distorção e promovendo o fechamento da tampa α -helicoidal em DLP, impedindo que a proteína-cliente seja liberada (Figura 3a) (SAIBIL, 2013).

Figura 3: Domínios proteicos das Hsp70s. O DLN é representado em verde e o DLP tem o subdomínio que constitui a tampa helicoidal (DLP α) representada em laranja e a estrutura em β -sanduíche em azul (DLP β). Os nucleotídeos ATP e ADP são representados por uma estrutura em esferas coloridas pela composição atômica. (a) Estado ligado à ADP: Na parte superior é apresentada a estrutura 3D composta pelo DLN, baseado na estrutura do 3HSC do PDB, conectado pela região *linker* ao DLP, cuja estrutura β -sanduíche é baseada na 1DKZ do PDB: Abaixo um esquema indica a conformação fechada da tampa α helicoidal, na presença de ADP ligado. (b) Estado ligado à ATP: Na parte superior é apresentada a estrutura 3D em uma nova conformação baseada na estrutura 4B9Q do PDB. O esquema indica a conformação aberta adquirida pelo DLP, na presença de ATP.

Fonte: Adaptado de Saibil (2013).

Diferente da ação das Hsp60s, que encerram as proteínas não nativas em uma cavidade interna até que esta esteja corretamente enovelada, as Hsp70s atuam estabilizando a proteína-cliente e a liberam para que esta complete seu enovelamento em solução. Por isso elas podem realizar vários ciclos capturando uma mesma proteína até que esta seja capaz de se enovelar corretamente ou seja encaminhada para o sistema proteolítico (SAIBIL, 2013). Estes ciclos dependem de sua interação com cochaperonas que modulam sua atividade ATPásica. As *J-domain proteins* e os fatores de troca de nucleotídeo (NEFs, do inglês *Nucleotide exchange factors*) são cofatores essenciais para a manutenção destes ciclos (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

As *J-domain proteins* são proteínas que conservam o motivo His, Pro e Asp (HPD) em uma alça entre duas hélices α , formando o domínio J. Estas cochaperonas são capazes de recrutar proteínas-cliente do meio e através de seu domínio J interagir tanto com DLN, estimulando sua atividade ATPásica; quanto com o DLP, entregando o

polipeptídeo recrutado. As *J-domain proteins* possuem uma ampla divergência estrutural quando comparadas às Hsp70s. Segundo Kampinga e Craig (2010) isto coopera para uma multifuncionalidade destas maquinarias, uma vez que, pela ação de diferentes *J-domain proteins*, uma mesma Hsp70 pode atuar sobre diversas proteínas-cliente.

Por outro lado, atualmente há quatro tipos de NEFs já identificados: GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 e *Bag domain* (BRACHER; VERGHESE, 2015). Eles não possuem similaridade sequencial e atuam por mecanismos distintos para promover a redução da afinidade do DLN das Hsp70s por nucleotídeos adenosina. Enquanto alguns possuem apenas domínios envolvidos na liberação de nucleotídeos, outros podem possuir domínios adicionais que permitem funções como, por exemplo, impedir a religação de substratos, por meio do bloqueio direto do DLP da Hsp70, e localizar estruturas subcelulares específicas para permitir a transferência de proteínas-cliente entre Hsp70s e outros sistemas (KAMPINGA; CRAIG, 2010; ROSENZWEIG et al., 2019).

A Figura 4 esquematiza um ciclo realizado por uma Hsp70 e a ação de suas cochaperonas. O esquema mostra que inicialmente uma *J-domain protein* encaminha uma proteína não nativa para ligação ao DLP da Hsp70. Em seguida, estimula a hidrólise de ATP pela interação de seu domínio J com o DLN. A clivagem provoca uma alteração conformacional no DLP que aumenta sua afinidade pela proteína-cliente. A *J-domain protein* deixa o complexo e então um NEF se liga ao DLN, promovendo a liberação de ADP e entrada de ATP. A troca de nucleotídeos altera novamente a conformação de DLP para um estado de menor afinidade à proteína-cliente, possibilitando sua liberação. A depender de sua conformação, a proteína-cliente pode ser submetida à um novo ciclo (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

Figura 4: Esquema do ciclo realizado pela maquinaria das Hsp70s baseado em estudos do re-novelamento *in vitro* de proteínas desnaturadas. Na sequência 1, uma proteína-cliente desnovelada é sequestrada por uma *J-domain protein*. Em 2, ambas se ligam à Hsp70, estando a proteína-cliente ligada ao DLP e a *J-domain protein* tem seu domínio J interagindo com o DLN para promover, no passo 3, a clivagem do nucleotídeo ATP em ADP. Seguido a esse processo há uma alteração conformacional que provoca o aumento da afinidade da Hsp70 pela proteína-cliente e a *J-domain protein* deixa o complexo. No passo 4, um NEF se liga ao complexo promovendo a troca de nucleotídeos em DLN (5 e 6). A troca provoca uma nova alteração conformacional que permite a liberação da proteína-cliente e saída do NEF, no passo 7. As setas tracejadas indicam a possibilidade de recomeço do ciclo, caso a proteína ainda não se encontre em sua forma nativa.

Fonte: Adaptado de Kampinga e Craig (2010).

HSPA9

A HSPA9 é uma das proteínas da família das Hsp70s humanas (HSPAs) que é induzida como resposta ao estresse metabólico para permitir a sobrevivência celular em condições letais em organismos pluricelulares (LONDONO et al., 2012). Ela é altamente conservada e predominantemente encontrada na mitocôndria (BHATTACHARYYA et al., 1995), embora já tenha sido localizada em outros compartimentos subcelulares e membranas (RAN et al., 2000; WADHWA et al., 2003) e, assim como as demais Hsp70s, atua em conjunto com diversos parceiros em maquinarias moleculares.

A HSPA9 é também chamada de mortalina ou mtHsp70 (Hsp70 mitocondrial). A nomenclatura mortalina foi adotada devido ao seu papel no processo de senescência em células de mamíferos, onde foi inicialmente identificada (WADHWA et al., 1993).

Ela é sintetizada no citosol e, posteriormente, translocada para a mitocôndria, onde atua no sistema de importação mitocondrial de pré-proteínas para a matriz mitocondrial (PFANNER; TRUSCOTT, 2002); no enovelamento destas pré-proteínas, sendo auxiliadas por Hsp60s (DEOCARIS; KAUL; WADHWA, 2006); na biogênese mitocondrial; no metabolismo energético e no processo de geração de radicais livres (LONDONO et al., 2012). Outras funções importantes são desempenhadas pela HSPA9 na proteção celular contra o estresse oxidativo (JIN et al., 2006); no processo anti-apoptose (TAURIN et al., 2002) e na retenção da p53 no citoplasma (WADHWA et al., 2002), bloqueando seu efeito supressor sobre oncogenes. Estas e outras funções tornam a HSPA9 uma proteína de grande interesse como alvo molecular em estudos de patologias neurodegenerativas e câncer (JIN et al., 2006; WADHWA et al., 2006; PARK et al., 2014; YUN et al., 2017; FERRÉ, et al., 2020;).

A caracterização estrutural e funcional da HSPA9 recombinante foi realizada em estudos desenvolvidos pelo grupo do LBBP (DORES-SILVA et al., 2015a). Os autores verificaram que esta apresenta uma estrutura monomérica levemente alongada, cuja estrutura secundária é composta por hélices α e folhas β . O resíduo de W usado como sonda fluorescente encontra-se em um ambiente parcialmente protegido do solvente, próximo ao bolsão de ligação de nucleotídeo em DLN.

O monômero da HSPA9 apresentou alta afinidade de interação com nucleotídeos, porém esta interação se mostrou dependente da presença de íons Mg^{2+} . A avaliação da taxa de hidrólise de ATP mostrou que a atividade ATPásica da HSPA9 é basal, o que converge com a ideia de regulação de seus ciclos por parceiras como as *J domain proteins* e os GrpEs (DORES-SILVA et al., 2015a).

Os domínios da HSPA9 possuem diferentes estabilidades. Em condições de temperaturas próximas às fisiológicas ou de estados febris, foi observada uma tendência à agregação pelo DLN, que pode ser prevenida pela presença de nucleotídeos adenosina. O DLP, no entanto, apresenta estabilidade nestas condições (DORES-SILVA et al., 2015a). A instabilidade térmica do DLN leva à formação de complexos supramoleculares (SMAs) da HSPA9 quando esta é exposta a condições de estresse térmico. Estes complexos retêm parte dos elementos estruturais do monômero, o que os torna capazes de interagir com nucleotídeos adenosina e apresentar atividade ATPásica.

Os SMAs também apresentaram interação com lipossomos negativamente carregados (KIRALY et al., 2020).

Embora a HSPA9 seja uma proteína alvo de grande interesse de pesquisa, estudos de caracterização de sua estrutura *in vitro* têm como obstáculo sua obtenção recombinante na forma solúvel. Isto porque, assim como as demais mtHsp70s, a HSPA9 possui alta propensão à autoagregação, que ocorre tanto *in vivo*, como em sistemas recombinantes. Segundo, Blamowska et al. (2010), esta tendência pode estar associada à uma conformação adquirida pelas regiões do DLN e região *linker*, sugerindo também que a mtHsp70 pode não ser capaz de alcançar seu enovelamento correto sozinha.

A obtenção da HSPA9 recombinante na forma solúvel por Dores-Silva et al. (2015a) foi possibilitada pela utilização do mesmo recurso empregado pelos sistemas naturais: a coexpressão com a cochaperona Hsp70 *escort protein 1* humana (hHep1). Esta cochaperona apresenta um papel fundamental na manutenção da solubilidade da HSPA9 *in vivo* e, quando coexpressa com a HSPA9, evita a formação de corpos de inclusão em sistemas recombinantes.

Os mecanismos que envolvem a interação entre Hep1 e mtHsp70s ainda não foram completamente elucidados. Estudos desenvolvidos por Blamowska, Neupert e Hell (2012) utilizando uma mtHsp70 de levedura (Ssc1), levaram os autores a proporem um modelo hipotético de ação da Hep1 no enovelamento das mtHsp70s e na manutenção de sua solubilidade. O esquema deste modelo é apresentado na Figura 5.

Neste modelo é proposto que os domínios da mtHsp70 se enovelam de forma individual. O DLP enovela-se sem o auxílio de cochaperonas, mas o DLN adquire uma conformação intermediária junto ao *linker* que é reconhecida pela Hep1. A cochaperona promove uma alteração conformacional desta região que propicia a ligação de nucleotídeos ao DLN e, em seguida, se desliga da mtHsp70, que então adquire sua conformação nativa. Após a proteína ter sido enovelada, a ausência de nucleotídeos ligados leva a região composta pelo DLN e o *linker* a adquirir uma conformação que é propícia à autoagregação. A formação de agregados é evitada por uma nova interação da mtHsp70 com a Hep1 (BLAMOWSKA; NEUPERT; HELL, 2012).

Figura 5: Modelo de enovelamento e manutenção da solubilidade da mtHsp70 auxiliada pela Hep1. A mtHsp70 desenovelada inicia seu processo de enovelamento dos domínios individualmente. A Hep1 se liga ao DLN (em roxo) para auxiliar que este alcance a conformação capaz ligar nucleotídeos ATP/ADP. Após a entrada de nucleotídeos no DLN da mtHsp70, a Hep1(em verde) se desliga do domínio e a mtHsp70 alcança sua conformação nativa. Quando o DLN se encontra sem nucleotídeos ligados, o domínio e a região *linker* tendem a adotar uma nova conformação que torna a mtHsp70 propensa à autoagregação. A formação de agregados é evitada por uma nova interação da Hep1 com a mtHsp70 no DLN. O DLP é representado em vermelho.

Fonte: Adaptado de Blamowska, Neupert e Hell (2012).

No entanto, estudos recentemente publicados pelo grupo do LBBP (DORES-SILVA et al., 2021), mostraram que a interação entre hHep1 e mtHsp70 é independente da presença de nucleotídeos, não requerendo um estado conformacional específico, como esperado por Blamowska; Neupert e Hell (2012). Foi demonstrado que a hHep1 interage não somente com monômeros da mtHsp70, ela também é capaz de interagir com SMAs formados sob estresse térmico e remodelá-los em partículas menores (KIRALY et al., 2020).

A partir desses estudos do grupo LBBP, um novo modelo para o mecanismo de ação da hHep1 sobre a mtHsp70 foi sugerido pelos autores e é apresentado na Figura 6 (DORES-SILVA et al., 2021). Neste modelo a hHep1 é capaz de interagir com a HSPA9, tanto em sua forma monomérica quanto com os SMAs. Supõe-se que esta interação ocorra na região de interação entre o *linker* hidrofóbico da HSPA9 e seu DLN. A hHep1 se mostra capaz de evitar o processo de formação dos SMAs, ao interagir com os monômeros da Hsp70 (Figura 6 (1)) e de estimular a atividade ATPásica destes monômeros (Figura 6 (2)). No entanto, também é capaz de interagir com os SMAs, por mecanismos distintos daqueles em que usa sobre os monômeros, e causar tanto o

estímulo da atividade ATPásica (Figura 6 (2)) destes conjuntos supramoleculares como sua remodelação em partículas menores (Figura 6 (4 e 5)).

Figura 6: Esquema do modelo de ação da hHep1 sobre conjuntos supramoleculares de HSPAs. O quadro inserido na margem superior direita indica as representações da hHep1, monômeros de HSPAs e SMAs das HSPAs. O quadro inserido na margem inferior esquerda enumera características dos SMAs formados pelas HSPAs, previamente estudados por Kiraly et al. (2020). Os processos enumerados indicam a propensão à formação de SMAs das Hsp70s (1) que é prevenido pela ação da hHep1 (3); o estímulo à atividade ATPásica de monômeros e SMAs de HSPAs pela hHep1 (2) e a interação da hHep1 com estes SMAs (4) remodelando-os em partículas menores (5).

Fonte: Adaptado de Dores-Silva et al. (2021).

O quadro inserido na Figura 6 enumera as características dos SMAs, estudados por Kiraly et al. (2020). A propensão natural à formação destes SMAs pelas HSPAs, sua não toxicidade celular e a observação destes conjuntos supramoleculares *in vivo* (KIRALY et al., 2020), juntamente com evidências de que a hHep1 é capaz de interagir com conjuntos supramoleculares, sugere que os SMAs podem ser funcionais ou teriam função de armazenamento de Hsp70s (KIRALY et al., 2020).

Hsp70 escort proteins

As Hep são cochaperonas conservadas em diversos eucariotos que atuam prevenindo a autoagregação de Hsp70s. São identificadas ortólogas mitocondriais (Hep1) e plastídicas (Hep2), a diferenciação nestas subfamílias é determinada pela sequência de encaminhamento, para mitocôndrias ou cloroplastos, presentes em suas estruturas (KLUTH et al., 2012). A ausência de Heps em procariotos pode indicar que ela tenha evoluído após o processo de endossimbiose de bactérias, originando mitocôndrias (YAMAMOTO et al., 2005). Outra hipótese é que as Heps tenham

evoluído com as mtHsp70s e cloroplastos para proteger proteínas desenoveladas no citosol até que sejam importadas através das membranas (BLAMOWSKA; NEUPERT; HELL, 2012). Análises da região promotora do gene da Hep1 em leveduras mostraram que essa região possui sequências que se assemelham às sequências das *Heat shock proteins*, sendo também reguladas positivamente em resposta à situações de estresse térmico celular assim como outras chaperonas mitocondriais (SICHTING et al., 2005). A deleção de yHep1 em células de levedura provocou efeitos como a redução da taxa de importação de proteínas pelo complexo Tim23 (SICHTING et al., 2005); redução na produção de proteínas que possuem o cluster Fe/S (SZKLARZ, 2005); instabilidade do genoma nuclear, resultante do comprometimento de biossínteses no ribossomo (DÍAZ DE LA LOZA et al., 2011); problemas na morfologia celular (SZKLARZ 2005); acúmulo de precursores não clivados, como mtHsp60 e Mdj1 (YAMAMOTO et al., 2005); acúmulo de agregados de mtHsp70s (SICHTING et al., 2005) e eventual morte celular (GIAEVER et al., 2002). Estes efeitos são semelhantes aos observados na ausência de mtHsp70, sugerindo que o papel central da yHep1 é de atuar como uma chaperona especializada em mediar o enovelamento de outra chaperona (SICHTING et al., 2005).

Além da ação chaperona sobre as mtHsp70s, diferentes homólogas da Hep1 também foram capazes de promover a solubilização de cognatos das mtHsp70s. O estudo comparativo entre Hep1 de diferentes organismos mostrou que, além da baixa identidade sequencial, algumas homólogas apresentam diferentes funções. A hHep1 (humana) foi capaz de prevenir a agregação de proteínas não-cognatas às mtHsp70s, quimicamente desenoveladas (GOSWAMI; CHITTOOR; D'SILVA, 2010). A hHep1 também é capaz de atuar estimulando a hidrólise de ATP das mtHsp70s, assim como as *J-domain protein* (NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOFF, 2019). Segundo Dore-Silva et al. (2021), a hHep1 também é capaz de interagir, estimular a atividade ATPásica e prevenir a agregação da Hsp701A, uma Hsp70 humana induzível encontrada no citoplasma e nucleoplasma; o que mostra que a hHep1 tem potencial para atuar como uma cochaperona geral das HSPAs, não apenas especializada na HSPA9. Além disso, ela seria responsável pela modulação da função dos SMAs ou na recuperação de monômeros a partir destas estruturas (DORES-SILVA et al., 2021). A observação de que a hHep1 é capaz de interagir com lipossomos negativamente carregados, sugere que ela possa estar envolvida no processo de importação mitocondrial de proteínas

codificadas no núcleo e contribuir com as Hsp70s no processo de formação de canais iônicos (DORES-SILVA et al., 2021). Função semelhante foi observada para a yHep1 que coopera com a mtHsp70 na importação de proteínas para a matriz mitocondrial (YAMAMOTO et al., 2005). A capacidade de estímulo à atividade ATPásica da mtHsp70 também foi observada para a Hep1 de *Leishmania brasiliensis* (LbHep1), porém, com algumas diferenças de atividade (DORES-SILVA et al., 2015b).

As Hep1 são proteínas pequenas que possuem baixa identidade, a exceção é o motivo *Zinc finger*, altamente conservado. Este motivo estrutural é composto por dois pares de resíduos de cisteínas separados por uma região de 21 resíduos de aminoácidos, cuja estrutura tetracisteína coordena um íon metálico Zn^{2+} (NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019). O *Zinc finger* compõem o núcleo funcional essencial para interação com as mtHsp70s, guiando seu enovelamento correto (MOMOSE et al., 2007; VU et al., 2012; NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019; DORES-SILVA et al., 2015b; DORES-SILVA et al., 2013). Além disso, é essencial para estabilidade da estrutura da própria Hep1 (NYAKUNDI et al., 2016). A função das regiões N e C-terminal, de alta divergência estrutural entre isoformas, ainda não são claras. Para Momose et al. (2007), que estudou Hep1 de levedura (yHep1), o C-terminal pode possuir papel na solubilidade da proteína e interagir com o DLP da mtHsp70. Para a LbHep1, a região à montante ao motivo *zinc finger* apresentou papel na manutenção da solubilidade intrínseca da proteína (DORES-SILVA et al., 2015b). O alinhamento entre hHep1 e yHep1 apresenta uma identidade de ~25% entre as sequências de aminoácidos das proteínas (Figura 7). Apesar disto, ambas são capazes de prevenir a agregação das mtHsp70s tanto de humanos como de leveduras (ZHAI, P et al., 2008)

Figura 7: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das homólogas hHep1 e yHep1. Aminoácidos conservados são indicados com (*); os fortemente similares com (:) e os fracamente similares indicados por (.). O intervalo referente ao *core* da yHep1 é destacado pelo sombreado em azul. As caixas em laranja destacam o motivo tetracisteína.

hHep1	1	MLRTALRGAPRLLSRVQPRAPCLRRLLWGRGARPEVAGRRAWAWGWR--RSSSEQGPSPA
yHep1	1	----MIPRTRTLQSKIPTTRYFARCWAPRVYNVCRTLPAALHTNIIAHNEVKKDDKK
		: : ** . * : : * * . * : . * *
hHep1	59	AAL--GRVEAAHYQLVYTCKVCSTRSSKRISKLAYHQGVVIVTCPCGQNHIIADNLGWF
yHep1	57	VHLGSFKVDKPKMMIAFTCKKCNTRSSHTMSKQAYEKGTVLISCPHCKVRHLIADHLKIF
		. * : * : : : : * * * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * *
hHep1	117	SDLNGKRNIIEILTARGEQVHRVAGEGALELVLEAAGAPTSTAAPAG--EDEGPPSPGKT
yHep1	117	HDHH--VTVEKLMKANGEQVSQDVGDLFEFIDPSLKDVLGKYAKNNSENASQLPHPSQK
		* : . : * : : * . * * * : . * : * : : . . * : . : . * * . .

Fonte: Autoria própria.

A yHep1, também chamada como Tim15, foi a primeira a ser identificada na mitocôndria e é, atualmente, a ortóloga mais bem caracterizada. A estrutura de seu núcleo foi resolvida utilizando medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) (MOMOSE et al., 2007). O estudo foi realizado com uma mutante denominada pelos autores como Tim15c, que compreende o domínio *core* (resíduos de 64-159) da yHep1, em destaque na Figura 7, obtendo uma estrutura bem definida para as regiões dos resíduos 68-130 e 140-155.

Figura 8: Estrutura 3D da Tim15c (a) Representação da estrutura da Tim15c de menor energia, mostrando a distribuição das estruturas secundárias representadas em magenta (hélices- α), azul (folhas- β) e *random coils* (branco). Os resíduos de cisteína que compõem os dois motivos zinc finger têm suas cadeias laterais mostradas em vermelho e o íon Zn^{2+} é representado como uma esfera azul. (b) A sequência de aminoácidos da Tim15c é correlacionada às estruturas secundárias em cada região: barras magentas representam hélices α e setas azuis, folhas- β .

Fonte: Adaptado de Momose et al. (2007).

Os autores observaram dois subdomínios compactos: o N-terminal, composto de um par de folhas β antiparalelas que coordenam o íon Zn^{2+} ; e o C-terminal, composto de hélices α , folhas β e *random coils*. A estrutura possui um formato em “L” apresentando uma face côncava e uma convexa que contém um sulco forrado de resíduos ácidos, onde ocorre a interação com a mtHsp70. Os segmentos de resíduos 68-75, 79-87, 95-100 e 104-110 formam fitas de folhas β antiparalelas que envolvem o domínio *zinc finger*, formando a maior extensão da estrutura em L. A outra região é formada por duas hélices

α . As regiões correspondentes ao amino (resíduos 64-67) e carboxi terminal (resíduos 156-159) da mutante e a alça no intervalo de resíduos 131-139, não apresentam estrutura organizada. A estrutura resolvida da Tim15c é apresentada na Figura 8, e está disponível no PDB com o código de acesso 2E2Z.

hHep1

A hHep1 foi encontrada tanto na mitocôndria quanto no núcleo celular e citosol (ZHAI et al., 2008; DORES-SILVA et al., 2021). Ela é composta por 178 resíduos de aminoácidos, contendo os subdomínios: peptídeo sinal (1-48), N-terminal (49-63), *core* (Δ 64-160) e C-terminal (Δ 161-178) (VU et al., 2012), como apresentado na Figura 9. A região do peptídeo sinal é responsável por indicar o encaminhamento da hHep1, que é codificada no núcleo e sintetizada no citoplasma, para a mitocôndria. As regiões N e C-terminais, ainda não tiveram função atribuída. Todas as funções observadas para hHep1 até o momento têm sido relacionadas à região *core*.

Na região do *core* está localizado o motivo *zinc finger*, onde um íon Zn^{2+} é complexado por um arranjo formado pelo conjunto tetracisteína C75, C78, C100 e C103. Este motivo tem se mostrado essencial para a interação com a HSPA9 e para a manutenção da estabilidade da própria hHep1 (NYAKUNDI et al., 2016, DORES-SILVA et al., 2013). Mutações realizadas em resíduos deste motivo, R81, H107 e D111, provocam uma diminuição na afinidade de ligação entre a hHep1 e HSPA9 (ZHAI, P. et al., 2011). Além disso, o resíduo H107, amplamente conservado entre homólogas, parece ter um papel crítico no estímulo à atividade ATPásica, mostrando-se necessário para a efetiva ligação entre a hHep1 e o domínio DLN enovelado da HSPA9 (*in vitro*) (ZHAI, P. et al., 2011). A Figura 9 apresenta um alinhamento da sequência de aminoácidos da hHep1, diferenciando as regiões do peptídeo sinal, N-terminal, *core* e C-terminal e enfatizando os resíduos que têm apresentado importância na manutenção de sua funcionalidade.

Figura 9: Alinhamento da sequência de aminoácidos da hHep1. O sombreamento nas cores cinza, amarela, azul e vermelha referem-se às regiões correspondentes ao peptídeo sinal (hHep1₁₋₄₈), N-terminal (hHep1₄₉₋₆₃), *core* (hHep1₆₄₋₁₆₀) e C-terminal (hHep1₁₆₁₋₁₇₈), respectivamente. São enfatizados os resíduos de Cys, em branco, pertencentes ao motivo *zinc finger*, nas posições 75, 78, 100 e 103. Também são ressaltados os resíduos Arg81, His107 e Asp111, em verde, e duas His vicinais, 106 e 107, na área do contorno vermelho tracejado.

hHep1	1	11	21	31	41
	MLRTALRGAP	RLLSRVQPRA	PCLRRLLWGRG	ARPEVAGRRR	AWAWGWRRSS
hHep1	51	61	71	81	91
	SEQGPGPAAA	LGRVEAAHYQ	LVTYCKVCGT	RSSKRISKLA	YHQGVVIVTC
hHep1	101	111	121	131	141
	PGCQNHIIA	DNLGWFSDLN	GKRNIIEILT	ARGEQVHRVA	GEGALEIVLE
hHep1	151	161	171		
	AAGAPTSTAA	PEAGEDEGPP	SPGKTEPS		

Fonte: Autoria própria.

Uma ampla caracterização estrutural e funcional da hHep1 em solução foi realizada pelo grupo do LBBP, resultando nos trabalhos de Dore-Silva et al. (2013 e 2021), empregando uma construção da hHep1 com a região equivalente ao peptídeo sinal truncada. Neste trabalho, esta construção será referenciada como hHep1 Δ_{mts} e, a seguir, serão apresentadas as principais informações obtidas.

A Figura 10 apresenta o modelo computacional construído para a hHep1 Δ_{mts} , ilustrando as estruturas secundárias e o motivo *zinc finger* complexando ao íon Zn^{+2} . A estrutura obtida indica que o único resíduo de W115 encontra-se ligeiramente enterrado entre as duas hélices α da região C-terminal. Esta predição concorda com os resultados de análises de emissão de fluorescência intrínseca, onde observou-se um perfil de emissão que indica que o W115 se encontra parcialmente exposto ao solvente na hHep1 Δ_{mts} , com um $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 360 nm (DORES-SILVA et al., 2013).

Figura 10: Modelo da estrutura tridimensional da hHep1 Δ_{mts} , construído utilizando como *template* a estrutura da yHep1 (disponível no PDB como 2E2Z). Na estrutura são enfatizados o resíduo W115, em amarelo, e o motivo *zinc finger*, sendo o íon Zn^{2+} representado em roxo. As estruturas secundárias hélice α , folhas β e *random coils* são representadas em vermelho, azul e cinza, respectivamente.

Fonte: Dores-Silva et al. (2013)

As análises de espectropolarimetria de dicroísmo circular indicaram que a hHep1 Δ_{mts} possui uma estrutura majoritariamente formada por estruturas secundárias em folhas β pregueadas e estruturas randômicas (DORES-SILVA et al., 2013). Assim, parece haver similaridade na composição de estruturas secundárias entre hHep1 e yHep1, provavelmente na região do motivo *zinc finger*, onde há maior identidade (Figura 7) (NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOFF, 2019). O estudo das propriedades hidrodinâmicas mostrou que, em solução, a hHep1 Δ_{mts} ocorre predominantemente como um monômero levemente alongado em equilíbrio com oligômeros, possivelmente tetrâmeros, decâmero-dodecâmeros e um oligômero maior constituído de 16 a 20 cadeias. (DORES-SILVA et al., 2013)

A hHep1 Δ_{mts} apresentou uma tendência à oligomerização dependente da concentração, que é atenuado na presença de 2 mM de EDTA. Em altas concentrações de sal há um ligeiro aumento na dissociação destes oligômeros. Análises de emissão de fluorescência intrínseca sugeriram que o processo de oligomerização envolve a região do W115, uma vez que é observado um *blue shift* de 3 nm no λ máximo de emissão, indicando o enterramento da sonda em um ambiente mais hidrofóbico (DORES-SILVA et al., 2013).

Na presença de concentrações crescentes do agente caotrópico ureia a hHep1 Δ_{mts} sofre um desenovelamento não-cooperativo e incompleto. Este perfil indica que há regiões que se desenovelam em baixas concentrações de ureia e levam à formação de um intermediário de desenovelamento, constituído, provavelmente pelo núcleo contendo o motivo *zinc finger*. Este mesmo processo de desenovelamento, na presença de 2 mM de EDTA, apresenta uma transição melhor definida, havendo um efeito sinérgico entre o agente quelante e o caotrópico. Uma diminuição na estabilidade da hHep1 Δ_{mts} , na presença de EDTA, também é observada no desenovelamento por temperatura, onde a transição diminui em 5 °C. Assim, acredita-se que o íon Zn^{2+} , complexado ao motivo *zinc finger*, possui um papel importante na estabilização da estrutura da hHep1 (DORES-SILVA et al., 2013).

A atividade chaperona da hHep1 Δ_{mts} foi avaliada por meio de sua capacidade de prevenir a agregação tanto da HSPA9 como de proteínas-cliente modelos, durante um processo de estresse térmico. A hHep1 Δ_{mts} se mostrou capaz de prevenir a agregação da HSPA9 em até 90%, em uma razão molar de 1:6, atuando de forma dose-dependente. Também foi capaz de reduzir em até 85% a agregação das proteínas-cliente modelo, luciferase, malato desidrogenase, porém em razões molares muito maiores, 1:50 e 1:20, respectivamente. No entanto, não foi capaz de prevenir a agregação da citrato sintase. A atividade chaperona intrínseca da hHep1 Δ_{mts} parece ser seletiva para Hsp70s, sugerindo a possível existência de um motivo de ligação nos monômeros das Hsp70s que é reconhecido pela hHep1 para a complexo de alta estabilidade térmica. A hHep1 Δ_{mts} também foi capaz de estimular a atividade ATPásica da HSPA9, assim como as *J-domain proteins*. O estímulo máximo observado foi de 330% na presença de 20 μ M de hHep1 Δ_{mts} e a taxa de estímulo teve um EC_{50} de $1,0 \pm 0,1 \mu$ M (DORES-SILVA et al., 2021).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conforme apresentado na Revisão da literatura, embora a hHep1 seja uma cochaperona essencial para o funcionamento do organismo humano, seus mecanismos de ação e funções ainda não estão completamente elucidados. Este trabalho teve por objetivo compreender aspectos da relação entre a estrutura e a funcionalidade desta proteína. Um estudo prévio realizado por Vu et al. (2012) fez uma análise de diversos intervalos da hHep1 procurando identificar regiões funcionais. Uma construção denominada DNLZ₆₄₋₁₆₀, equivalente ao *core* da hHep1, mostrou que tal região é capaz de promover a solubilização da HSPA9 recombinante. Os autores também observaram que esta mutante foi capaz de interagir com a HSPA9 para a formação de um complexo e estimular a atividade ATPásica tanto da proteína completa como apenas do domínio DLN isolado. Diante de tal fato, foi selecionada a região do *core* da hHep1, onde estão presentes os resíduos que se mostram importantes para sua interação, para uma análise aprofundada.

Para este estudo, construiu-se uma proteína mutante que compreende apenas o domínio *core* da hHep1, denominada hHep1_*core*. Este trabalho dá continuidade aos estudos sobre a hHep1 que vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LBBP. A ampla caracterização da recombinante hHep1 Δ_{mts} (DORES-SILVA et al., 2013 e 2021), será empregada durante todo este trabalho para estabelecer comparações entre as construções proteicas hHep1 Δ_{mts} e hHep1_*core*. Este estudo comparativo fornece informações para uma melhor compreensão da importância dos subdomínios da estrutura da hHep1 para sua própria estabilidade e para suas funções sobre a HSPA9, usada como protótipo das HSAs. Busca-se, assim, avaliar quais funções podem ser atribuídas somente ao *core* e quais poderiam depender das regiões truncadas. O diagrama apresentado na Figura 11, esquematiza uma comparação entre hHep1 *wildtype*, hHep1 Δ_{mts} e hHep1_*core*.

Figura 11: Diagrama esquematizando as regiões da hHep1 mantidas nas construções hHep1 Δ_{mts} e hHep1_core. Os intervalos de resíduos de aminoácidos que compõem o peptídeo sinal (cinza); N-terminal (amarelo), core (azul) e C-terminal (vermelho) são indicados.

Fonte: Autoria própria.

Inicialmente foram desenvolvidos protocolos para obtenção e purificação da hHep1_core. Em seguida, realizou-se um estudo de caracterização estrutural a fim de avaliar se a mutante é capaz de se enovelar mantendo aspectos estruturais da hHep1 Δ_{mts} , mesmo na ausência das regiões truncadas no N- e C-terminais, possibilitando sua utilização como ferramenta de estudo da hHep1. Também foi realizada uma avaliação da estabilidade estrutural da hHep1_core em função do tempo, da presença de agentes caotrópicos, de sua afinidade pelo íon Zn^{2+} e de sua concentração; uma vez que estas informações são essenciais para avaliar o quanto as regiões truncadas podem proteger a hHep1 de processos de agregação, autólise ou desenovelamento. Estes dados também são importantes para o planejamento de experimentos que envolvam a hHep1_core, garantindo-se condições em que a proteína esteja íntegra, enovelada e funcional. Por fim, investigou-se a função da hHep1_core, avaliando sua atividade chaperona intrínseca, sua capacidade de interagir com a HSPA9, proteger sua agregação sob estresse térmico e estimular sua atividade ATPásica.

METODOLOGIA

Obtenção e purificação

O plasmídeo pET28a:hHep1_core foi obtido por meio de uma subclonagem a partir do vetor hHep1::pQE2, já disponível no LBBP.

(a) Transformação de células competentes contendo pET28a:hHep1_core

A produção de hHep1_core recombinante foi realizada em cepas bacterianas competentes *E. coli* BL21(DE3). Inicialmente estas células foram transformadas incubando-as com 5 µL do plasmídeo pET28a:hHep1_core no gelo por 30 min. Em seguida, foi realizado um choque térmico das células aquecendo-as a 42 °C durante 2 min e logo em seguida novamente incubadas em gelo durante 3 min. Após o choque térmico, acrescentou-se 1 mL de meio de cultura Lysogeny broth (LB) e a mistura permaneceu a 37 °C, sob agitação constante, por 50 min. Posteriormente, o *pellet* foi obtido por centrifugação a 5000 rpm por 5 min, ressuspendido em menor volume, e espalhado sobre uma placa de cultura contendo meio LB, ágar e o antibiótico canamicina a 50 µg.mL⁻¹. A cultura permaneceu a 37 °C por um período de 16 h.

(b) Indução à expressão

Após o processo de transformação, colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em meio LB, contendo canamicina, a 37 °C, sob agitação constante, até que a cultura bacteriana atingisse uma DO_{600nm} no intervalo entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância. Diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foram inicialmente testadas a fim de se avaliar quais as melhores condições para os processos de indução da hHep1_core. As condições testadas são descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições de Indução à expressão da hHep1_core

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (h)	[IPTG] (mM)
1	24	4	0,2
2	24	18	0,2
3	30	4	0,2
4	30	6	0,1

Fonte: Autoria própria

Após o período de indução, os *pellets* foram obtidos por centrifugação a 8000 rpm por 10 min a 4 °C.

(c) Processo de purificação

O *pellet* obtido no processo de indução foi ressuspendido em 30 mL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), contendo 100 mM de KCl. Foram adicionadas 7 U de DNase (Promega) e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de lisozima (Sigma) e a mistura, mantida em gelo, foi submetida a pulsos ultrassônicos intermitentes. Após a lise celular, a fração solúvel foi separada por centrifugação com rotação de 17000 rpm, por 40 min a 4 °C.

O processo de captura foi realizado aplicando-se o lisado em uma coluna de cromatografia de afinidade HiTrap Chelating (GE Healthcare LifeSciences) de 5 mL dopada com íons Ni^{2+} e pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), contendo 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol (tampão A). Após a aplicação da amostra na coluna, foi realizada uma eluição em série, variando-se a concentração de imidazol presente no tampão para 75 mM, 300 mM e 500 mM, em um fluxo constante de 3 mL.min^{-1} .

A fração de interesse foi eluída em 300 mM de imidazol e incubada *overnight* com trombina (Sigma-Aldrich), em uma proporção de 10 U.mg^{-1} de proteína, a 4 °C. Esse processo foi realizado em diálise contra tampão de 25 mM de Tris-HCl (pH 8,5), contendo 50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio e 5 mM de KCl.

Após a diálise, a amostra foi novamente aplicada em uma coluna de cromatografia de afinidade HiTrap Chelating (GE Healthcare LifeSciences) dopada com íons Ni^{2+} e pré-equilibrada com tampão A sem imidazol. Uma nova eluição em série foi realizada variando-se a concentração de imidazol de 0 mM para 75 mM e 500 mM. A fração de interesse foi obtida aplicando-se 75 mM de imidazol. Em seguida, foi realizada uma cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna HiLoad Superdex 75 16/60 pg (GE Healthcare Life Sciences) preparativa, pré-equilibrada com tampão 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0), contendo 50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, 5 mM de KCl 2 mM de β -mercaptoetanol (tampão TKP). A hHep1_core purificada foi então submetida à um processo de preparo da amostra para sua caracterização que consistiu em uma diálise para troca de tampão de TKP (pH 8,0) para TKP (pH 7,5).

(d) SDS-PAGE

Amostras coletadas nos testes de indução e durante o protocolo de purificação da hHep1_core tiveram sua constituição avaliada por análises de SDS-PAGE. Para isso foram preparadas por meio de uma diluição em tampão 100 mM de Tris/HCl, contendo 0,2% de azul de bromofenol, 4% de SDS e 20% de glicerol. Devido à baixa MM da hHep1_core foram empregados géis de poliacrilamida 12% e tampão de corrida Tris/Tricina 100mM (pH 8,2). Após a corrida os géis foram corados com uma solução de corante comassie blue 3 mM contendo 10% de ácido acético glacial e 45% de metanol. Os géis foram revelados utilizando uma solução descorante de 45% de metanol, contendo 10% de ácido acético glacial.

Análise estrutural

(a) Modelagem computacional

O modelo por homologia da estrutura 3D da hHep1_core foi construído empregando o software *Modeller* (ESWAR et al., 2007). Para a construção do modelo são levadas em consideração as restrições espaciais provenientes da correlação por homologia das distâncias e ângulos diedros da estrutura *template*; restrições estereoquímicas relacionadas aos comprimentos e ângulos de ligação e preferências estatísticas para ângulos diedros e distâncias interatômicas de pares não ligados. O processo de construção se inicia pela busca de similaridades entre a sequência de aminoácidos da hHep1_core e de proteínas cujas estruturas 3D já tenham sido previamente determinadas e depositadas no PDB (*template*). A estrutura da Tim15c (2E2Z) foi selecionada e alinhada à sequência da hHep1_core. A partir deste alinhamento foi construído o modelo da estrutura 3D da hHep1_core.

A acurácia desta predição foi avaliada por parâmetros energéticos (energia potencial) e estereoquímicos (gráfico de Ramachandram). A função de energia potencial empregada foi o DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*), disponível no software *Modeller*. Esta função, desenvolvida por Shen e Sali (2006), avalia o potencial estatístico dependente da distância atômica. O gráfico de Ramachandram avalia as posições possíveis dos resíduos em função dos ângulos diedros ψ e ϕ , foi construído utilizando o programa SAVES v6.0 (LASKOWSKI et al., 1993).

As imagens do modelo de estrutura 3D da hHep1_core, a partir do arquivo de coordenadas gerados pelo software *Modeller*, foram editadas utilizando o software Chimera (YANG et al., 2012).

(b) Espectropolarimetria de dicroísmo circular

As análises de espectropolarimetria de CD foram realizadas a fim de se avaliar a composição de estruturas secundárias da construção truncada. Foram utilizadas amostras de hHep1_core com concentrações entre 15 e 20 µM. As análises foram conduzidas em um espectropolarímetro Jasco J-815 com um sistema *peltier* PFD 425S acoplado, para controle de temperatura, e cubeta de 1 mm. Os espectros foram obtidos varrendo-se o intervalo de 260 a 195 nm em uma velocidade de 50 nm.min⁻¹. Dos dados obtidos foi subtraído o sinal emitido pelo tampão TKP (pH 7,5), nas mesmas condições de medida. Em seguida, estes foram transformados em elipticidade molar residual média ($[\theta]$), utilizando a Equação 1,

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MM}{C \cdot l \cdot n}, \quad (Eq. 1)$$

onde *MM* é massa molar da proteína em kDa; *C*, concentração molar de proteína; *l*, caminho ótico da cubeta em cm; e *n*, o número de resíduos da proteína. A estimativa de conteúdo de estrutura secundária foi realizada pelo *software* CDNN Deconvolution (BOHM; MUHR; JAENICKE et al., 1992).

(c) Espectroscopia de emissão de fluorescência

Análises de estrutura terciária local foram realizadas por meio da emissão de fluorescência intrínseca do W115 em um espectrofotômetro de fluorescência HITACHI F-4500. A hHep1_core foi analisada em TKP (pH 7,5) e na presença de 6 M de cloridrato de guanidina (GndHCl). Foram analisadas amostras na concentração de 5 µM de proteína com excitação em 295 nm, obtendo-se espectros no intervalo de 310 a 420 nm.

(d) Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC)

Propriedades hidrodinâmicas da hHep1_core foram avaliadas por aSEC (do inglês *analytical size exclusion chromatography*), a fim de verificar aspectos de sua estrutura terciária e avaliar a potencial presença de estrutura quaternária. As

cromatografias foram realizadas empregando uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare LifeSciences) analítica previamente equilibrada com tampão TKP (pH7,5).

O perfil das amostras de hHep1_core foi comparado aos perfis de proteínas padrões globulares com MM e raio de Stokes (R_S) conhecidos, apresentadas na **Tabela 3**. As correlações obtidas permitem determinar a MM aparente (MM_{app}), o raio de Stokes (R_S) e a razão friccional (f/f_0) da hHep1_core.

Tabela 3: Proteínas globulares padrões

Proteína padrão	MM (kDa)	R_S (Å)
Apoferitina	480	67
γ -globulina	160	48
BSA	67	36
Anidrase carbônica	30	24
Citocromo C	12,3	14

Fonte: Autoria própria

A MM_{app} é dada pela relação linearizada

$$K_{AV} = -a(\log MM) + b, \quad (Eq. 2)$$

onde a e b são obtidos por meio de uma curva de calibração construída com os padrões moleculares e o coeficiente de partição (K_{AV}) obtido pela razão:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}, \quad (Eq. 3)$$

Sendo que V_e é dado pelo volume de eluição, V_0 pelo volume da fase móvel e V_t pelo volume total da coluna. Os valores obtidos foram comparados aos valores teóricos de MM para a estrutura monomérica e dimérica da hHep1_core, calculadas pelo *software* SEDNTERP (PHILO, 1997).

O R_S foi obtido pelo ajuste linearizado entre os R_S das proteínas padrões e o $\log(K_{AV}^{1/2})$ dado por

$$R_S = a \left(-\log K_{AV}^{\frac{1}{2}} \right) + b \quad (Eq. 4)$$

A f/f_0 foi então calculada pela razão entre R_S determinado experimentalmente e o teórico, estimado pelo *software* SEDNTERP.

Estudos de estabilidade

(a) Estabilidade temporal

Para avaliar a integridade estrutural da hHep1_core em função do tempo, foram coletadas amostras, após o processo de purificação da hHep1_core, nos tempos 0, 12, 24, 30, 48 e 72 h. Estas amostras foram analisadas por SDS-PAGE e aSEC conforme as metodologias descritas anteriormente.

Também foram avaliadas amostras de hHep1_core purificadas na ausência de íons fosfato, sendo obtidas em tampão TK [25 mM de Tris-HCl, (pH 7,5), 50 mM de NaCl, 5 mM de KCl, e 2 mM β -mercaptoetanol]. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h após a purificação e analisadas por SDS-PAGE.

(b) Estabilidade em diferentes concentrações

A fim de avaliar a possível formação de estruturas oligoméricas em função da concentração da hHep1_core, a proteína purificada foi submetida a um processo de concentração até atingir um volume mínimo de trabalho. A contração final obtida foi de 46 μ M. A partir desta foram preparadas alíquotas nas concentrações 23 μ M e 11,5 μ M, realizando-se uma diluição em tampão TKP. Assim, 500 μ L de amostras nestas 3 concentrações foram analisadas por aSEC utilizando-se uma coluna Superdex 200 10/30 GL (GE Healthcare) analítica, previamente equilibrada em tampão TKP. Também foi avaliado o perfil de uma amostra correspondente ao pico C1, observado na Figura 14C correspondente ao primeiro pico de eluição no processo de cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, durante a purificação da hHep1_core.

(b) Estabilidade química

A estabilidade química da hHep1_core em todos os experimentos desta seção foi monitorada por espectroscopia de emissão de fluorescência intrínseca do W115, empregando um espectrofotômetro de fluorescência HITACHI F-4500. Foram utilizadas amostras de hHep1_core na concentração de 5 μ M. A partir dos espectros obtidos foram calculados o centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$) e os λ_{max} . O $\langle\lambda\rangle$ foi obtido por meio da Equação 5, enquanto o $\lambda_{\text{máx}}$ foi encontrado utilizando a ferramenta de detecção de máximos de funções do *software* Origin (STEVENSON, 2011).

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i F_i}{\sum_i F_i} \quad (Eq. 5)$$

(c1) Agentes desnaturantes

O perfil do processo de desnaturação da hHep1_core foi avaliado tanto na presença de ureia, como de GndHCl. Soluções estoque de ambos os agentes foram preparadas em tampão TKP (pH 7,5). As concentrações destas soluções foram aferidas pela variação na viscosidade da solução, verificadas por mudanças nos índices de refração entre o tampão e a solução (Δn). A correlação entre o Δn e as concentrações de ureia e GndHCl foram determinadas por Pace, Shirley e Thomson (1989), descritas por

$$[Ureia] = 117,66 (\Delta n) + 29,753(\Delta n)^2 + 185,56(\Delta n)^3 \quad (Eq. 6)$$

$$[GndHCl] = 57,147(\Delta n) + 38,68(\Delta n)^2 + 185,56 (\Delta n)^3 \quad (Eq. 7).$$

Amostras de hHep1_core foram tratadas com concentrações crescentes dos agentes caotrópico, com intervalos de 0,5 M. Para o experimento com ureia, foi utilizada uma faixa de concentração de 0 a 9 M, enquanto com GndHCl, empregou-se um intervalo de 0 a 6 M. Em ambas as análises buscou-se obter as concentrações médias de transição (C_m) a fim de verificar a estabilidade química desta proteína mutante.

(c2) Agente quelante

A afinidade do motivo *zinc finger* da hHep1_core pelo íon Zn^{2+} foi avaliada frente ao quelante metálico EDTA. Amostras de hHep1_core a 5 μ M foram expostas à concentrações do quelante que variaram de 0 a 5 mM. Desta forma foram empregadas quantidades de EDTA que correspondiam de 0 a 1000 vezes a quantidade de proteína em solução.

(c3) Efeito combinado de agente desnaturante e agente quelante

Amostras de hHep1_core foram tratadas com 2 mM de EDTA. Em seguida, foram adicionadas concentrações crescentes de GndHCl, de 0 a 6 M, em intervalos de 0,5 M, conforme realizado em (c1).

Estudos de interação

(a) Obtenção da HSPA9

A HSPA9 utilizada nas análises foi expressa e purificada conforme o protocolo desenvolvido por Dores-Silva et al. (2015a).

(b) Obtenção da luciferase

A luciferase foi expressa de forma recombinante em cepas competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3). Para isso foi realizado um processo transformação empregando o plasmídeo pET23a::His.Luciferase_MYC. Após o processo de transformação, colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas, a 37 °C sob agitação constante, em meio LB, contendo ampicilina a 50 µg.mL⁻¹. Após a solução com cultura bacteriana atingir uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância, a indução de luciferase foi induzida pela adição de 0,2 mM de IPTG. O processo de indução foi conduzido por 4 h à temperatura de 30 °C sob agitação constante. O processo de purificação foi conduzido nas mesmas condições experimentais da HSPA9.

(c) Análise de interação entre hHep1_core e HSPA9

A avaliação da formação de um complexo entre hHep1_core e HSPA9 foi realizada por meio de análises de aSEC. Para esta análise foram preparadas soluções contendo de HSPA9 e hHep1_core nas proporções 1:0,5; 1:1; 1:4 e 1:6. Amostras de ambas as proteínas, HSPA9 a 5 e 8 µM e hHep1_core a 4, 8, 20 e 30 µM, foram utilizadas como branco. Todas as amostras permaneceram incubadas em bancada por 1 h antes de serem aplicadas na coluna e um volume fixo de amostra (500 µL) foi utilizado.

Um experimento controle foi realizado utilizando amostras de BSA a 5 µM e hHep1_core a 30 µM, nas mesmas condições que para a HSPA9 na proporção 1:6. Os equipamentos e as equações empregadas no tratamento dos dados foram previamente descritos na seção de análise estrutural no item (d).

As curvas amostrais foram normalizadas pelos máximos de absorção da HSPA9 na mistura e estes mesmos valores foram utilizados para normalizar as curvas dos

brancos de hHep1_core correspondentes. Os dados de deslocamento do tempo de retenção da HSPA9 foram ajustados empregando a Equação 8 (SILVA, et al., 2013).

$$t = t_{HSPA9} - (t_{HSPA9} - t_{complexo}) \cdot \frac{[hHep1_{core}]}{K_D + [hHep1_{core}]} \quad Eq. 8$$

(d) Atividade chaperona intrínseca da hHep1_core

A atividade chaperona intrínseca da hHep1_core foi monitorada pela sua capacidade em prevenir a agregação da HSPA9 e da proteína-cliente modelo luciferase em condições de estresse térmico. Os experimentos foram realizados empregando um espectrofotômetro Shimadzu TCC240A acoplado à um *peltier* para controle da temperatura. A agregação das proteínas foi monitorada pelo espalhamento de luz verificado por meio da detecção de absorção em 340 nm.

Amostras da HSPA9 a 6 µM foram submetidas à 43 °C, na ausência e na presença de hHep1_core nas concentrações 6, 12 e 24 µM. Para a proteína-cliente modelo luciferase foi utilizada uma concentração de 1 µM na ausência e na presença de hHep1_core nas concentrações 1, 2 e 10 µM, submetendo-as à 40 °C. As condições de concentração e temperatura aqui utilizadas foram condições pré-estabelecidas conforme o trabalho de Dores-Silva et al. (2021).

(e) Ação sobre atividade ATPásica da HSPA9

A avaliação do efeito da hHep1_core sobre a atividade ATPásica da HSPA9 foi realizada pelo monitoramento da variação na taxa de [Pi].min⁻¹ liberados pela HSPA9 na ausência e na presença da hHep1_core. Uma vez que esta análise detecta os níveis de Pi, as seguintes modificações foram realizadas nos processos de purificação das proteínas:

- Substituição do tampão TKP pelo tampão TK;
- Substituição dos tampões fosfato A e B da HSPA9 por 25 mM Tris-HCl, (pH 7,5) contendo 100 mM de NaCl e 20 mM de imidazol (tampão A) ou 500 mM de imidazol (tampão B).

Para o experimento foi construída uma curva padrão de 1 µM de HSPA9 na presença de concentrações crescentes de ATP (0 a 2 mM) na presença de 2 mM de MgCl. A curva experimental foi construída avaliando a condição de 1 µM de HSPA9 na

presença de 1 mM de ATP e 2 mM de MgCl na presença de concentrações crescentes de hHep1_core (0 a 35 µM). Após a adição de ATP as amostras são incubadas, sob constante agitação, à 37°C por 30 min.

A identificação colorimétrica da quantidade de Pi liberada é realizada utilizando o kit PiColorLock™ (InnovaBiosciences). Este método se baseia na mudança de cor sofrida pelo verde de malaquita (VM) que adquire uma coloração verde ao se associar à complexos de fosfomolibdato em meio ácido, conforme as Equações 9 e 10.

Verde

Após a adição dos reagentes do kit PiColorLock™ (InnovaBiosciences) mede-se a absorbância das amostras em 590 nm. As absorbâncias são convertidas em concentração por meio dos coeficientes obtidos de uma curva padrão de Pi e estes dados são transformados em taxa ([Pi]/min) normalizando-se pelo tempo de reação. Os dados percentuais de estímulo foram calculados a partir da Equação 11, onde T_f é a taxa de liberação de Pi pela HSPA9 na presença de hHep1_core e T_0 a taxa de liberação de Pi na ausência de hHep1_core.

$$\% = \frac{T_f - T_0}{T_0} \times 100 \quad Eq. 11$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Obtenção e purificação

Expressão da hHep1_core

A Figura 12 apresenta a avaliação por SDS-PAGE das quatro condições de indução à expressão da hHep1_core que foram testadas e as respectivas frações de proteína obtidas de forma solúvel após a lise celular. Para todas as condições observou-se a obtenção de uma grande quantidade da proteína na forma solúvel. Os maiores rendimentos foram obtidos nas condições de 4 h a 30 °C e 18 h a 24°C, como pode ser observado por meio da intensidade das bandas nos perfis destas amostras na Figura 12. A fim de se ter um melhor controle sobre o processo de indução, escolheu-se a primeira condição, de 4 h à 30°C, e 0,2 mM de IPTG, para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 12: Análise das condições de indução à expressão da hHep1_core por SDS-PAGE. São indicados pelas legendas os referenciais de MM (M), amostras de células não induzidas (NI), induzidas em cada condição (I) e suas frações solúveis após a lise (L).

Fonte: Autoria própria.

Purificação da hHep1_core

Cálculos dos valores teóricos dos pIs da His.hHep1_core e hHep1_core, obtidos empregando-se o *software* SEDNTERP, mostraram uma variação de 8,0 a 7,2 após a clivagem da *His-tag*. Estes valores indicam que a ausência das regiões N e C-terminal tornaram a hHep1_core uma proteína de caráter básico quando comparada à His.hHep1_{Δmts} (pI 6,5). Uma vez que durante o processo de purificação houve a

clivagem da *His-tag* e objetivava-se obter a hHep1_{core} em meio TKP (pH 7,5), em que a hHep1_{Δmts} foi caracterizada por Dores-Silva et al. (2013); foi necessário, neste protocolo, realizar uma dinâmica de troca de pH do meio tamponante, respeitando os pIs, para evitar possíveis processos de precipitação da proteína em alguma das etapas da purificação. A Figura 13 esquematiza as etapas do processo de purificação em função das variações de pH do meio e apresenta, em uma tabela inserida, os pIs das construções relacionadas. Na Figura 14 são apresentados os detalhes das cromatografias realizadas durante o processo de purificação e uma análise de SDS-PAGE de amostras coletadas em cada etapa de todo o processo.

Figura 13: Esquematização das etapas do processo de purificação em função das trocas de pH do meio. Etapas na caixa azul foram realizadas em meio com pH 8,5; na caixa laranja pH 8,0 e caixa verde pH 7,5. Em destaque a etapa de clivagem da *His-tag*, onde há alteração da His.hHep1_{core} para hHep1_{core} que ocorre em pH 8,5. De forma inserida, é apresentada uma tabela que correlaciona os pIs das construções His.hHep1_{core}, hHep1_{core} e hHep1_{Δmts}.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 14A observa-se que durante a 1ª cromatografia de afinidade ao níquel parte dos contaminantes, retidos à coluna por interações eletrostáticas inespecíficas, são eluídos empregando-se uma baixa concentração de imidazol (A1), enquanto a fração de interesse é obtida utilizando-se uma concentração de 300 mM (A2). Em concentrações superiores (A3) não é observado sinal de absorbância referente à eluição proteica, indicando que 300 mM de imidazol é suficiente para eluir toda a proteína com afinidade pelos íons Ni²⁺. O incremento de absorbância observado em A3 é referente à maior concentração de imidazol.

Figura 14: Etapas do processo de purificação da hHep1_core. (A) e (B) Cromatogramas de afinidade ao níquel com eluição em série de concentrações de imidazol antes e após a clivagem da *His-tag*, respectivamente. (C) Perfil obtido da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, com o perfil de SDS-PAGE das amostras eluídas apresentados na figura inserida. (D) SDS-PAGE das amostras de (NI) células não induzidas; (I) células induzidas; (L) lisado celular solúvel; (A2) fração eluída em 300 mM de imidazol na 1ª cromatografia de afinidade ao níquel; (T) fração após diálise na presença de trombina; (B2) fração eluída em 75 mM de imidazol na 2ª cromatografia de afinidade ao níquel; (C2) fração eluída da cromatografia de exclusão por tamanho no intervalo entre 80-90 mL e (P) fração após diálise *overnight* para troca de tampão.

Fonte: Autoria própria.

Após o período de incubação da amostra com a enzima trombina, foi realizada uma nova cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} , com o objetivo de selecionar as hHep1_core cujas *His-tags* tenham sido clivadas. Os resultados obtidos neste passo são apresentados na Figura 14B, destacando-se que outra eluição em série de concentrações de imidazol foi realizada. Nesta etapa foi observado que uma maior fração de proteína foi eluída em 75 mM de imidazol (B2), quando comparada à fração eluída em tampão sem imidazol (B1); em concentrações superiores (B3) não se observou eluição de proteínas.

O processo de clivagem das *His-tags* mostrou-se efetivo, uma vez que uma menor concentração de imidazol foi necessária para provocar a eluição da maior fração de proteína, quando comparada a 1ª cromatografia de afinidade. Porém, a fração de hHep1_core obtida ainda possui baixa afinidade residual aos íons Ni^{2+} . Esta afinidade

pode ser atribuída ao par de His vicinais (106 e 107), destacadas na Figura 9. Estes resíduos provavelmente têm suas cadeias laterais voltadas para fora da estrutura, expostas ao solvente, e assim, disponíveis para interagir com os íons Ni^{2+} que dopam a resina da coluna. Esta observação é pertinente com o que foi observado por Zhai et al. (2011), com relação ao resíduo H107 que participa da interação com a HSPA9.

A fração de proteína coletada na eluição em B2, contendo 75 mM de imidazol, foi então aplicada em uma cromatografia de exclusão por tamanho, apresentada na Figura 14C. O cromatograma indica a presença de frações eluídas com picos centrados em 58 mL (C1) e 82 mL (C2). A ausência de eluentes no V_0 da coluna, em 40 mL, indica a ausência de agregados da hHep1_core durante as etapas anteriores do processo de purificação.

Os dois picos observados, C1 e C2, tiveram sua composição avaliada por SDS-PAGE, cujos perfis eletroforéticos são apresentados na figura inserida (Figura 14C). Ambos apresentam bandas de MM correspondentes à hHep1_core, tendo o pico C2 uma banda de maior intensidade. Os dois picos de eluição observados indicam que as etapas anteriores do processo de purificação extraem a hHep1_core não só como uma estrutura monomérica, mas também como um oligômero em solução. A fim de se obter uma amostra homogênea para as etapas seguintes de caracterização, apenas a fração eluída no pico C2 foi utilizada. Uma vez que o monômero é obtido em uma maior quantidade do que as demais, sua formação se mostra termodinamicamente mais favorável e, portanto, sugerindo ser a estrutura de maior estabilidade.

A Figura 14D sumariza os processos de indução, purificação e preparo da hHep1_core por meio da análise por SDS-PAGE de amostras de cada uma das etapas. Amostras coletadas durante a indução são indicadas nas canaletas nomeadas como não induzidas (NI) e induzidas (I). A comparação dos perfis de células (NI) e após o processo de indução (I) evidencia o aparecimento de uma intensa banda próxima à 15 kDa. Esta banda indica a produção da His.hHep1_core, que possui uma MM de 12,6 kDa. O perfil da canaleta (L) é de uma amostra da fração solúvel obtida após a lise das células, onde observou-se que a maior parte da His.hHep1_core é extraída na forma solúvel.

A fração coletada da eluição do pico A2 também é apresentada na Figura 14D. Neste perfil a permanência da intensa banda de 15 kDa indica que, de fato, a eluição da

hHep1_core ocorre após a utilização de 300 mM de imidazol. O aumento no grau de pureza da amostra, em comparação ao perfil anterior, juntamente com o pico de eluição A1, observado na Figura 14A, demonstram que a eluição em série promoveu uma purificação intermediária da amostra. O perfil T corresponde à amostra coletada após o período de incubação da His.hHep1_core com a enzima trombina. Neste é possível observar uma diminuição de massa da banda de interesse, correspondente à perda da His-tag, equivalente à ~2 kDa. Na canaleta seguinte, é apresentada uma amostra do eluído no pico B2, onde a banda de interesse, de 10 kDa, é bastante intensa, indicando que a maior fração de hHep1_core é eluída empregando 75 mM de imidazol.

A amostra do pico C2 da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, apresenta apenas uma intensa banda de 10 kDa. Este valor corresponde à MM da hHep1_core calculada utilizando o software SEDNTERP, de 10,7 kDa. A presença de uma banda única e intensa na canaleta desta amostra demonstra a função de polimento deste último passo do processo de purificação e um alto grau de pureza da proteína obtida. Por fim, na canaleta P da Figura 14D, avaliou-se o perfil da amostra de hHep1_core após o processo de diálise para troca de tampão. Verificou-se que se manteve o perfil de uma banda única e intensa, indicando que durante este processo de preparo a amostra permanece estável, não sofrendo processos de degradação significativos.

Análise estrutural

Modelagem computacional

A construção do modelo computacional da estrutura tridimensional da hHep1_core utilizou como modelo a estrutura da mutante Tim15c resolvida por RMN. A Figura 15 apresenta os elementos do estudo computacional da modelagem por homologia.

A estrutura tridimensional obtida é apresentada na Figura 15(a), evidenciando as estruturas secundárias; o resíduo W115, utilizado no estudo da estrutura terciária por fluorescência intrínseca, e os resíduos C75 e C78, C100 e C103, que compõe o motivo *zinc finger*. O modelo sugere a manutenção de uma estrutura em L cujo núcleo é altamente organizado, formado por uma estrutura supersecundária em sanduíche β composta por folhas β antiparalelas intercalado por uma pequena região em hélice α .

Fonte: Autoria própria.

A viabilidade estereoquímica do modelo da estrutura tridimensional foi avaliada por meio de um gráfico de Ramachandram, apresentado na Figura 15(b). O gráfico indica as regiões permitidas por sombreamento, quanto mais intensa a cor maior a permissividade da região. Observou-se que 88,5% dos resíduos do modelo encontram-se em regiões favoráveis e 11,5% em regiões adicionalmente permitidas. Alguns pontos observados em áreas não permitidas destas regiões constituem resíduos de G. Estes resíduos possuem uma permissividade adicional uma vez que sua cadeia lateral é constituída por apenas um átomo de H. Desta forma, por meio da avaliação estereoquímica, nenhum resíduo do modelo encontra-se em uma configuração restrita.

A avaliação da viabilidade energética da estrutura foi feita pela função de energia potencial estatística DOPE normalizada por resíduo. No gráfico apresentado na Figura 15(c), os perfis de energia do modelo e do *template* são comparados. A comparação dos perfis distingue regiões de maior energia derivadas do *template* de erros de predição estrutural. Desvios de energia do modelo são observados nas regiões entre os resíduos 20 a 25, 45 a 70 e 96 a 100. A primeira região corresponde a um intervalo que compõem a segunda folha β da estrutura em β sanduíche, próximo ao motivo *zinc finger*. A segunda região corresponde ao intervalo que compõe a região entre a última folha- β da estrutura β sanduíche até a hélice- α subsequente. A terceira é a região próxima ao C-terminal, correspondendo ao final da hélice α e a região em *random coil*. Esta análise indica que estas regiões da estrutura se encontram distorcidas a fim de adaptar-se à configuração do *template*.

A Figura 15D apresenta o alinhamento entre a hHep1_*core* e a Tim15c. A numeração apresentada no gráfico da Figura 15D, corresponde às posições indicadas neste alinhamento. Embora hHep1 e yHep1 possuam apenas 25% de identidade, para as mutantes hHep1_*core* e Tim15c este índice é de 37%. Assim, mesmo que os núcleos das homólogas sejam as regiões de maior conservação de identidade há diferenças significativas que dificultam a comparação entre ambas as estruturas.

Por fim, o modelo por homologia construído neste estudo possui uma baixa confiabilidade como referência para a real estrutura tridimensional da hHep1_*core*. As características estruturais previstas por esta análise computacional foram confrontadas por análises estruturais da hHep1_*core* em solução.

Análise estrutural em solução

A avaliação da composição de estruturas secundárias da hHep1_core foi realizada utilizando-se espectropolarimetria de CD, o perfil da variação da elipticidade molar em função do comprimento de onda é apresentado na Figura 16(a). O espectro possui um sinal mínimo em 218 nm, o que indica a presença de estruturas em folha- β . Também é possível notar um ombro em 210 nm e uma banda negativa de menor intensidade em 200 nm, que apontam a presença de estruturas hélices α e *random coils*, respectivamente.

Figura 16: Caracterização estrutural da hHep1_core em solução. (a) Espectropolarimetria de CD da hHep1_core na janela de 260 a 195 nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência intrínseca por excitação do resíduo W115 em 295 nm para a hHep1_core na presença (pontilhado) e ausência de 6 M de GndHCl. (c) Cromatograma de aSEC, com ênfase no intervalo de eluição da hHep1_core. Na parte superior são indicados os volumes de eluição dos padrões de MM: apoferritina (480 kDa, 67 Å), γ -globulina (160 kDa, 48 Å), BSA (67 kDa, 36 Å), anidrase carbônica (30 kDa, 24 Å) e citocromo c (12,3 kDa, 14 Å). A figura inserida apresenta a curva analítica construída para a obtenção do R_s da hHep1_core, o valor obtido é indicado com o quadrado azul.

Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos nas medidas de espectropolarimetria de CD foram utilizados para realizar um cálculo de deconvolução, empregando o *software CDNN Deconvolution*, que é apresentado na **Tabela 4**. Nesta mesma tabela, são elencados os dados de deconvolução da hHep1 Δ_{mts} calculados por Dores-Silva et al. (2013).

Tabela 4: Comparativo entre a deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD para hHep1_core e hHep1 Δ_{mts}

Deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD		
	hHep1_core (%)	hHep1 Δ_{mts} (%)
Hélices α	7	10
Folhas β	45	34
Voltas	17	21
Random coils	30	35

Fonte: Autoria própria.

*Dados retirados de Dores-Silva et al. (2013).

A comparação dos dados apresentados na **Tabela 4** indica um aumento na fração de estruturas em folhas- β da hHep1_core em relação à hHep1 Δ_{mts} , corroborando a previsão do modelo computacional desenvolvido que indica a presença de uma pequena região em folha- β próxima à C-terminal na hHep1_core que não é observada em hHep1 Δ_{mts} (DORES-SILVA et al., 2013). Além disso, a diminuição de estruturas em *random coils* das regiões truncadas em hHep1_core, também colaboram para o aumento no percentual de estruturas em folhas β . A Figura 16(b) apresenta os espectros de emissão de fluorescência intrínseca do W115 que foram empregados para avaliar aspectos da estrutura terciária local da hHep1_core. O espectro representado em linha contínua é referente à proteína em sua forma enovelada, enquanto o representado em linha tracejada foi obtido com a proteína na presença de 6 M de GndHCl, condição em que a hHep1_core encontra-se desnaturada. O λ_{max} da proteína em sua forma enovelada ocorre em 338 nm, indicando que o W115 se encontra parcialmente exposto ao solvente nesta condição. Na presença de 6 M de GndHCl, o λ_{max} se desloca para 350 nm, sugerindo que o W115 se encontra completamente exposto ao solvente polar. O perfil mais enterrado do W115 concorda com a previsão do modelo por homologia que posiciona a cadeia lateral deste resíduo voltada para dentro da estrutura na direção de estruturas hélice- α .

Os espectros de emissão de fluorescência intrínseca do W115 obtidos por Dores-Silva et al. (2013) para a hHep1 Δ_{mts} apresentaram λ_{max} em 335 nm para a proteína em sua forma enovelada e 350 nm para a proteína na presença de 6 M de GndHCl. O deslocamento de 3 nm para o vermelho que ocorre entre as formas enoveladas indica que na hHep1_core o W115 encontra-se em um ambiente um pouco menos hidrofóbico do que na hHep1 Δ_{mts} . Os dados indicam que a exposição deste resíduo ao solvente é

ligeiramente maior na ausência das regiões N e C-terminais que foram truncadas. No entanto, esta pequena variação sugere que a ausência destas regiões não provoca alterações estruturais capazes de causar uma mudança substancial no ambiente da sonda fluorescente intrínseca na hHep1_core.

As propriedades hidrodinâmicas da hHep1_core foram avaliadas por aSEC e o cromatograma obtido é apresentado na Figura 16(c). O perfil observado apresenta um único pico em 17 mL, indicando um sistema monodisperso. Por meio da curva analítica construída com padrões de MM foi determinada a MM_{app} de 17 ± 1 kDa para esta estrutura. O gráfico inserido no cromatograma da Figura 16(c) apresenta a relação entre os R_S dos padrões moleculares em função de seus $-\log(K_{AV}^{1/2})$, pela qual se estimou um R_S de 18,5 Å para a hHep1_core. Estes dados experimentais são elencados na **Tabela 5**, juntamente com dados teóricos calculados pelo *software* SEDNTERP e dados obtidos por Dores-Silva et al. (2013) para a hHep1 Δ_{mts} .

Tabela 5: Comparativo de dados hidrodinâmicos entre hHep1 Δ_{mts} e hHep1_core

Propriedades Hidrodinâmicas				
	MM (kDa)		R_S (Å)	
	hHep1_core	hHep1 Δ_{mts}	hHep1_core	hHep1 Δ_{mts}
Monômero*	10,7	14,8	14,6	16
Dímero*	21,5	29,6	18,4	20
Experimental	17 ± 1	$30 \pm 2^{**}$	$18,5 \pm 0,2$	$22 \pm 1^{**}$
f/f_0	-	-	1,3	1,4

Fonte: Autoria própria.

*Dados teóricos calculados pelo *software* SEDNTERP.

**Dados obtidos de Dores-Silva et al. (2013).

A comparação entre os dados teóricos (SEDNTERP) e experimentais (aSEC) para a hHep1_core mostra que a MM_{app} determinada experimentalmente é superior àquela calculada para um monômero globular teórico e inferior à de um dímero, enquanto o valor de R_S é superior ao de um monômero e próximo ao de um dímero globular. Estas propriedades hidrodinâmicas sugerem que a hHep1_core se encontra na forma monomérica, uma vez que a MM_{app} determinada não é suficiente para existência de um dímero. O maior valor de R_S é explicado pelo cálculo da f/f_0 que indica que a hHep1_core é predominantemente monomérica e levemente alongada, sugerindo que a estrutura pode ter conservado a forma em L da Tim15c, conforme previsto pelo modelo por homologia.

Conforme se observa na **Tabela 5**, a MM_{app} obtida para a hHep1_core é 13 kDa menor que aquela obtida por Dores-Silva et al. (2013) para a hHep1 Δ_{mts} . Também foi observada uma variação no R_s determinado experimentalmente de 3,5 Å entre as construções. As análises hidrodinâmicas realizadas por Dores-Silva et al. (2013) sugerem que a hHep1 Δ_{mts} ocorre predominantemente como um monômero alongado em solução, cuja f/f_0 é de 1,4. A comparação destes dados mostra que a hHep1_core possui uma estrutura 3D ligeiramente mais globular do que a hHep1 Δ_{mts} , o que está em conformidade com a falta das regiões N e C-terminais que foram truncadas.

Análises de estabilidade

Estabilidade temporal

Os perfis das avaliações de integridade estrutural da hHep1_core em função do tempo são apresentados na Figura 17. A Figura 17A corresponde a um cromatograma contendo os perfis de eluição das amostras coletadas em 0, 12, 24, 30, 48 e 72 h. Por meio destes perfis, observa-se uma tendência de diminuição da intensidade do pico em 17 mL que ocorre concomitantemente com o aparecimento de um pico em 20 mL quanto maior o tempo de descanso da amostra. Isto indica uma diminuição na concentração do monômero e surgimento de estruturas menores.

Figura 17: Avaliação da integridade estrutural de amostras de hHep1_core em função do tempo. (A) Perfis cromatográficos das amostras coletadas em 0, 12, 24, 30, 48 e 72 h. (B) SDS-PAGE das amostras em comparação aos padrões de MM (M), de células não induzidas (NI) e induzidas (I).

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 17B, os perfis de corrida em análise de SDS-PAGE destas mesmas amostras são apresentados. A menor MM_{app} encontrada para as bandas das amostras com relação à banda das células induzidas é devida à ausência da *His-tag* que foi

clivada durante o processo de purificação, conforme apresentado na seção “Obtenção e purificação”. A comparação entre as amostras no SDS-PAGE, evidencia o surgimento de bandas de menor intensidade em regiões correspondentes às estruturas com menor tamanho, a partir de 30 h. Estas bandas intensificam-se nos perfis de 48 e 72 h, indicando um aumento na concentração destas estruturas.

Os resultados apresentados na Figura 17 sugerem que, nestas condições de tampão (TKP pH 7,5) e temperatura (4 °C), a hHep1_core sofre um processo de degradação que é pouco substancial até 24 h de repouso, mas intensifica-se e torna-se mais significativo a partir de 30 h, delimitando o tempo de trabalho com a proteína à 24 h. Essa característica se contrapõe à hHep1 Δ_{mts} que apresenta uma maior estabilidade temporal.

A estabilidade temporal da hHep1_core também foi avaliada na ausência de íons fosfato no meio. A análise por SDS-PAGE é apresentada na Figura 18, com indicação dos tempos de coleta (0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h) em comparação aos padrões de MM, presentes na canaleta indicada como M. Foi observado que, na ausência de íons fosfato, a hHep1_core não sofre processos de degradação significativos, possuindo uma estabilidade de até 72 h.

Figura 18: SDS-PAGE de amostras de hHep1_core purificadas na ausência de íons fosfato.

Fonte: Autoria própria.

A instabilidade temporal na presença de íons fosfato se mostrou característica da hHep1_core, pois a hHep1 Δ_{mts} apresenta alta estabilidade nestas condições. Segundo Hunter (2012), os íons fosfato, devido à sua alta densidade negativa e ampla camada de solvatação, são capazes de interagir com 9 resíduos de aminoácidos (serina, treonina, tirosina, arginina, lisina, histidina, cisteína, aspartato e glutamina). A interação destes

resíduos com íons fosfato favorece a formação de ligações de hidrogênio e pontes salinas intra e intermoleculares. Assim, a instabilidade da hHep1_core pode ser devida à disponibilidade de resíduos de aminoácidos que, na ausência das regiões truncadas, não realizam suas interações nativas e podem interagir com íons fosfato, causando instabilidades em sua estrutura e favorecendo o processo de degradação.

Estabilidade em diferentes concentrações

Uma vez observado um processo de oligomerização dependente da concentração para a hHep1 Δ_{mts} (DORES-SILVA et al., 2013), esta mesma característica foi avaliada para a hHep1_core. No entanto, a análise por fluorescência intrínseca do W115, como realizada para a hHep1 Δ_{mts} , não apresentou sensibilidade para a hHep1_core. Assim foi realizada uma análise por aSEC buscando a tendência à agregação pela identificação de estruturas de maior MM. Os perfis de eluição de amostras de hHep1_core em diferentes concentrações e do primeiro pico de eluição da etapa da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, C1, são apresentados no cromatograma da Figura 19.

Figura 19: Estabilidade da hHep1_core em função da concentração. Perfil de eluição em cromatografia de exclusão por tamanho analítica de amostras de hHep1_core nas concentrações 46 μ M (Preto), 23 μ M (vermelho) e 11,5 μ M (azul) e de C1 (rosa).

Fonte: Autoria própria

A comparação entre os máximos dos picos de eluição das amostras de 46 μ M, 23 μ M e 11,5 μ M indicam um discreto deslocamento para volumes menores de eluição em função da concentração. Este efeito está, provavelmente, relacionado à quantidade

de proteínas presentes em cada amostra, que são suficientes para causar alterações na viscosidade da solução e provocar um comportamento hidrodinâmico diferente durante a corrida cromatográfica.

O perfil da amostra de 46 μM apresenta uma distribuição de picos de eluição, tanto em regiões em menores volumes de eluição (10 mL, 12,5 mL e 13,5 mL) como um ombro à esquerda do pico principal, em 16 mL. Estes picos correspondem às estruturas maiores do que o monômero, que eluí em 17 mL. Isto indica que, a partir de concentrações próximas à 46 μM , inicia-se um processo de deslocamento do equilíbrio para a formação de oligômeros. A **Tabela 6** elenca os dados de volume de eluição dos picos observados para cada uma das amostras e os correlaciona aos valores de MM_{app} calculados a partir destes dados.

Tabela 6: MM_{app} e R_s em função da concentração de hHep1_core

Amostra	Volume eluição (mL)	MM_{app} (kDa)	R_s (Å)
46 μM	17,3 (central)	20 (central)	20 (pico 1)
	16,3 (ombro)	30 (ombro)	24 (pico 2)
23 μM	17,4	19	20
11,5 μM	17,4	19	19
C1	12,0 (pico 1)	172 (pico 1)	47 (pico 1)
	17,5 (pico 2)	19 (pico 2)	19 (pico 2)

Fonte: Autoria própria

A pequena diferença entre os valores de MM_{app} observados para as amostras que eluem em volumes próximos à 17 mL, observado em todas as amostras, concordam que o deslocamento observado entre os perfis, possa ser devido à um efeito puramente hidrodinâmico em função do aumento da concentração. Os picos secundários das amostras de 46 μM e C1, também foram analisados. As amostras eluídas em 16,3 mL (46 μM) e 12,0 mL (C1), apresentaram MM_{app} de 30 kDa e 172 kDa, respectivamente. A última coluna da **Tabela 6** apresenta os valores de R_s para cada uma destas amostras.

Estes dados foram comparados aos valores teóricos para monômeros e dímeros da hHep1_core, apresentados na **Tabela 5**. Foi observado que a amostra eluída no ombro do perfil de 46 μM possui MM_{app} suficiente para consistir um dímero (21,5 kDa teórico) levemente alongado com f/f_0 de 1,3, perfil de estrutura semelhante ao que foi observado para o monômero. A MM_{app} calculada para o oligômero da amostra C1,

indica que potencialmente esta estrutura é composta por 14 à 16 cadeias. No entanto, a partir desta técnica não é possível determinar com precisão a composição oligomérica destas amostras. Uma melhor definição das estruturas formadas em função do aumento da concentração poderia ser realizada por meio do acoplamento da aSEC à um DLS (SEC-MALS) ou empregando medidas de ultracentrifugação analítica.

Os perfis obtidos indicam que hHep1_*core*, assim como a hHep1 Δ_{mts} , sofre um processo de oligomerização dependente da concentração. Embora o monômero ainda seja predominante na amostra de 46 μ M, os experimentos realizados neste trabalho foram realizados utilizando a hHep1_*core* em concentrações inferiores à esta concentração.

Estabilidade Química

(a) Agentes caotrópicos

Para avaliar a estabilidade química da hHep1_*core* foram realizados experimentos na presença de concentrações crescentes de agentes caotrópicos, ureia e GndHCl, sobre a proteína. As alterações estruturais causadas por cada concentração destes agentes foram monitoradas pela variação no ambiente da sonda intrínseca W115 por meio de análises de emissão de fluorescência. Estes dados foram organizados para se analisar três aspectos: os espectros obtidos, o $\langle\lambda\rangle$ destes espectros e de seus λ_{max} de emissão. Os perfis obtidos são apresentados na Figura 20, onde as curvas representadas à esquerda são referentes às análises com ureia (Figura 20A, C e D) e à direita àquelas obtidas utilizando GndHCl (Figura 20B, D e F).

Nas Figura 20A e B são comparados os espectros obtidos em três condições da hHep1_*core* enovelada, na ausência de agente caotrópico; na C_m destes agentes, estimada empregando os dados de $\langle\lambda\rangle$; e na concentração máxima de agentes caotrópicos utilizadas. Estas são representadas nas cores preta, azul e vermelha, respectivamente. O comparativo também é realizado entre as condições de excitação da sonda para λ de 280 nm, cujos espectros são representados em linhas contínuas, e 295 nm, representados em linhas tracejadas.

Figura 20: Avaliação da estabilidade química da hHep1_core frente aos agentes desnaturantes ureia e GndHCl. Em A (ureia) e B (GndHCl) são apresentados os espectros de emissão de fluorescência intrínseca do W obtidos para a proteína enovelada (preto), na Cm dos agentes desnaturantes (azul) e em concentrações saturantes dos mesmos (vermelho). Para amostras cuja excitação foi feita em 280 nm, os espectros foram graficados em linha contínua, enquanto aqueles obtidos por excitação em 295 nm, em linha tracejada. Em C e D são mostradas as variações nos $\langle\lambda\rangle$ em função das concentrações de ureia e GndHCl, respectivamente. Os dados obtidos por excitação em 280 nm são graficados em preto e os obtidos em 295 nm em vermelho. As variações nos $\lambda_{\max}$ de emissão em função das concentrações de ureia e GndHCl são apresentadas em E e F, respectivamente. O padrão de cores para os dados obtidos pela excitação em 280 nm e 295 nm, em C e D, é mantido.

Fonte: Autoria própria.

Os perfis dos espectros em diferentes concentrações mostram um deslocamento para maiores λ conforme há o aumento nas concentrações de ambos os agentes caotrópicos. Este efeito ocorre de forma combinada a uma diminuição na intensidade de

fluorescência, que é mais significativa para o GndHCl, apresentado na Figura 20B. As alterações observadas indicam uma mudança no ambiente da sonda intrínseca, que inicialmente encontra-se parcialmente exposta ao solvente, em sua forma enovelada, e passa a estar cada vez mais exposta ao solvente polar, refletindo o processo de desnaturação da estrutura da hHep1_core. A comparação entre os espectros obtidos por excitação em λ diferentes mostra que a influência da emissão de resíduos de Y, em 280 nm, é pouco significativa. Esta influência é mais evidente no espectro na presença de 6 M de GndHCl na Figura 20B, onde o processo de desnaturação expõe tanto o W115 que a intensidade de sua emissão diminui significativamente, tornando possível melhor observar efeitos de emissão proveniente dos resíduos Y.

Nas Figura 20C e D são apresentados os perfis da variação do $\langle\lambda\rangle$ em função das concentrações dos agentes caotrópicos, comparando-se os dados obtidos ao excitar a sonda intrínseca em 280 e 295 nm. As curvas apresentadas para o desenovelamento da hHep1_core promovidos pela ureia, na Figura 20C, possuem um perfil com uma transição gradual e sem alcançar uma estabilização completa. Para o desenovelamento com GndHCl, apresentado na Figura 20D, observa-se que desde as primeiras concentrações adicionadas há um deslocamento do $\langle\lambda\rangle$ até iniciar uma estabilização a partir de 3 M. Por meio destas curvas foram estimadas as C_m de 3,5 M para a ureia e 1,5 M para o GndHCl.

A comparação entre os processos de desnaturação provocados pelos dois agentes desnaturantes mostra uma eficiência aproximadamente duas vezes maior do GndHCl sobre a ureia. Além disso, a estabilização no deslocamento dos $\langle\lambda\rangle$, que ocorre nas curvas da Figura 20D, indicam que o GndHCl foi capaz de provocar um desenovelamento completo da hHep1_core, o que não foi observado com as concentrações de ureia utilizadas. A maior eficiência de desnaturação pelo GndHCl ocorre, provavelmente, devido ao seu caráter iônico que provoca um somatório de efeitos: o caotrópico e o de estabelecimento de interações eletrostáticas com cadeias laterais carregadas da hHep1_core (MONERA; KAY; HODGES, 1994).

Embora os agentes caotrópicos utilizados promovam o desenovelamento químico da hHep1_core por mecanismos diferentes, ambos são processos graduais. Estes perfis indicam processos não cooperativos e sugerem que a proteína é predominantemente estabilizada por uma rede de interações eletrostáticas. O

desenovelamento não cooperativo também foi observado para a hHep1 Δ_{mts} , sendo levantada a hipótese, por Dores-Silva et al. (2013), de que a mesma é composta por subdomínios de diferentes estabilidades. Segundo a análise realizada nestes trabalho, estas regiões de diferentes estabilidades não corresponderiam somente às regiões N e C-terminais, mas à regiões internas ao subdomínio *core*.

Nas Figura 20C e D também são comparados os perfis obtidos a partir da excitação da sonda intrínseca em diferentes λ para cada agente caotrópico. Pode ser observado que em ambos os processos as curvas inicialmente coincidem e depois divergem, sendo maiores os deslocamentos dos dados obtidos por excitação em 295 nm. A mesma comparação é realizada utilizando os dados de variação nos λ_{max} de emissão, que são apresentados nas Figura 20E e F, onde os perfis de ambas as curvas convergem durante todo o processo. Estes resultados indicam que o efeito observado nas curvas apresentadas nas Figura 20C e D são causados pela interferência da emissão de resíduos de Y em 280 nm, que deslocam o $\langle\lambda\rangle$ para valores menores. Tal efeito só se torna significativo em concentrações de agentes caotrópicos que sejam suficientes para provocar uma exposição do resíduo de W115 ao solvente diminuindo expressivamente sua intensidade de emissão. Assim, este efeito é mais pronunciado nas curvas obtidas utilizando GndHCl, apresentadas na Figura 20D. A influência da emissão dos resíduos de Y não é observada quando apenas os máximos de emissão são considerados. Isto ocorre porque mesmo em condições desnaturantes, a intensidade de emissão do W continua sendo superior à dos resíduos Y.

(b) Estabilidade à agente quelante

Como mencionado anteriormente, os resíduos que compõem o motivo tetracisteína, que coordena o íon Zn^{2+} , foi mantido na estrutura da hHep1_*core*, conforme apresentado na Figura 9. Assim, nesta etapa, foi avaliada a estabilidade da estrutura 3D da hHep1_*core* frente às concentrações crescentes do quelante metálico EDTA. O efeito destas concentrações sobre a estrutura foi monitorado pelas variações de ambiente sofridas pela sonda intrínseca W115 por meio de medidas de emissão de fluorescência. Os dados obtidos foram organizados para se analisar os perfis dos espectros obtidos e as variações dos $\langle\lambda\rangle$ destes espectros que são apresentados na Figura 21A e B, respectivamente.

Figura 21: Estabilidade da hHep1_core na presença do agente quelante EDTA. (a) Espectros de emissão da hHep1_core na presença de concentrações crescentes de EDTA, indicadas na legenda do gráfico. (B) Perfil de $\langle\lambda\rangle$ em função das concentrações de EDTA, com excitação em 295 nm.

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de emissão do W115 (Figura 21A) não apresentaram deslocamento em λ , permanecendo com λ_{max} de emissão em 338 nm para todas as concentrações de EDTA utilizadas. No entanto, o aumento destas concentrações provocou um efeito de supressão da emissão de W115, que é observado pela diminuição da intensidade dos espectros. Quando são avaliados os valores de $\langle\lambda\rangle$, indicados na Figura 21B, observa-se que, assim como foi visto na análise dos espectros completos, não há variação significativa. Estes resultados mostram que o agente quelante não é capaz de provocar alterações no ambiente da sonda intrínseca mesmo em uma concentração de EDTA 1000 vezes maior do que a de proteína. Desta forma, conclui-se que esta concentração não foi suficiente para causar uma mudança conformacional na proteína, algo que seria esperado caso houvesse a retirada do íon Zn^{2+} complexado ao motivo *zinc finger*. Isto sugere que a hHep1_core possui uma alta afinidade ao íon Zn^{2+} superior à do EDTA que possui um K_D de $2,3 \times 10^{-14}$ em pH 7,4 (KLUSKA; ADAMCZYK; KREZEL, 2018).

(c) Efeito combinado de agente desnaturante e agente quelante

Outro teste de estabilidade química realizado para a hHep1_core foi feito para avaliar a sinergia dos efeitos causados pela presença de EDTA e concentrações crescentes do agente desnaturante GndHCl sobre a proteína. Estes efeitos também foram monitorados pela emissão da sonda fluorescente intrínseca W115 e os dados obtidos são apresentados na Figura 22. As curvas são correspondentes às variações dos $\langle\lambda\rangle$ em função de concentrações crescentes de GndHCl, comparando-se os efeitos causados na

ausência de EDTA e na presença de 2 mM deste quelante. As curvas inicialmente coincidem, mas divergem em concentrações superiores à 2 M de GndHCl, havendo um maior deslocamento dos $\langle \lambda \rangle$ para a amostra na presença de EDTA.

Figura 22: Efeito combinado de agente quelante e caotrópico. Gráfico da variação do $\langle \lambda \rangle$ em função de concentrações crescentes do agente desnaturante GndHCl. A curva em preto refere-se aos dados obtidos para a hHep1_core na ausência de EDTA e os dados em vermelho na presença de uma concentração fixa de 2 mM de EDTA. Ambos obtidos por excitação em 295 nm.

Fonte: Autoria própria.

O deslocamento observado indica que o EDTA é capaz de causar alterações estruturais quando a hHep1_core se encontra parcialmente desnaturada pela ação do GndHCl. Este efeito sugere que o EDTA aumenta a eficiência do processo de desnaturação ao quelar metais que estabelecem interações eletrostáticas com cadeias laterais e uma possível retirada do íon Zn^{2+} . Um resultado semelhante foi observado para a hHep1 Δ_{mts} em um experimento desenvolvido por Dores-Silva et al. (2013). Os autores utilizaram como agente desnaturante a ureia e observaram um deslocamento maior nos $\langle \lambda \rangle$ da curva em que havia a presença de EDTA do que o observado neste trabalho. Este efeito é provavelmente mais explícito em função da menor eficiência da ureia na desnaturação destas estruturas, permitindo uma maior contribuição do efeito do EDTA.

Estudos de interação

Análise da interação entre hHep1_core e HSPA9

A aSEC foi empregada para avaliar a formação de complexos entre a hHep1_core e a HSPA9. A Figura 23(a) apresenta um conjunto de cromatogramas obtidos para diferentes proporções entre HSPA9 e hHep1_core, da HSPA9 pura e hHep1_core pura em diferentes concentrações.

A partir da comparação entre os cromatogramas das misturas e das amostras puras de hHep1_core, observa-se uma diminuição nas intensidades de absorção, indicando uma diminuição na concentração de hHep1_core retida por 35 min nas misturas. Por meio da comparação entre os cromatogramas das misturas e da HSPA9 pura observa-se uma tendência de deslocamento para tempos menores de retenção conforme há um aumento na proporção de hHep1_core. Este efeito é evidenciado no gráfico inserido. Este alargamento do pico pode indicar a formação de estruturas maiores na mistura, que eluem antes que a HSPA9 pura.

O efeito combinado do deslocamento do pico da HSPA9 e das diminuições de absorção nos picos de hHep1_core, observados na mistura, indicam a possibilidade de estar havendo a formação de um complexo entre estas proteínas.

A variação nos tempos de retenção do pico da HSPA9 em função da concentração de hHep1_core é apresentada na Figura 23(b). Os dados foram ajustados empregando a Equação 8, descrita no quadro inserido, e por meio deste ajuste obteve-se uma K_D de $(11 \pm 1) \cdot 10^{-6}$ M, indicando que o possível complexo teria uma alta afinidade de formação.

Figura 23: Interação entre hHep1_core e HSPA9. (a) Comparação entre os perfis cromatográficos de misturas de HSPA9 e hHep1_core em diferentes proporções e de ambas as proteínas puras. Os perfis das misturas são representados em linhas contínuas em escala de cinza: 1:0,5 (•); 1:1 (•); 1:4 (•) e 1:6 (•). Os perfis de hHep1_core pura são representados em linhas tracejadas em escala de cinza para as concentrações correspondentes à da mistura e a HSPA9 pura representada em linha contínua vermelha. O gráfico inserido enfatiza a região de eluição da HSPA9 no intervalo de 22 a 30 min. (b) Variação do tempo de retenção da HSPA9 em função da concentração de hHep1_core. No quadro inserido estão as informações referentes ao ajuste.

Fonte: Autoria própria

Os valores de tempo de retenção de cada uma das amostras são apresentados na **Tabela 7**. As análises referentes às proporções 1:0,5 e 1:1 foram realizadas em lotes de purificação de proteínas diferentes das amostras de proporções 1:4 e 1:6². Por isso, foi observada uma variação no tempo de retenção da hHep1_core entre estes conjuntos de amostras, que pode ser notada no cromatograma da Figura 23(a). No entanto, o tempo de retenção do branco da HSPA9 sofreu uma alteração pequena, justificando a não apresentação de uma das curvas da proteína pura no cromatograma, a fim melhorar a percepção do efeito de deslocamento sofrido pelas amostras das misturas.

Tabela 7: Tempos de eluição das amostras de misturas de HSPA9 e hHep1_core em diferentes proporções e das proteínas puras.

Amostra	Proporção				Eluição Média
	1 : 0,5	1 : 1	1 : 4	1 : 6	
HSPA9	26,18 min		26,28 min		26,23 ± 0,06 min
hHep1_core	35,20 min	35,16 min	34,64 min	34,54 min	34,9 ± 0,2 min
HSPA9 na mistura	26,00 min	25,88 min	25,68 min	25,60 min	25,8 ± 0,2 min
hHep1_core na mistura	34,90 min	35,04 min	34,56 min	34,56 min	34,8 ± 0,2 min

Fonte: Autoria própria.

A fim de avaliar se o deslocamento do pico da HSPA9 tratava-se de um efeito meramente hidrodinâmico, em função do aumento da concentração de proteínas no meio, foram avaliadas variações sofridas nos perfis de retenção da BSA (~67 kDa), de MM próxima à da HSPA9, e da hHep1_core na proporção 1:6. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 24.

O perfil da BSA pura apresenta dois picos de eluição correspondentes às suas estruturas monomérica e dimérica. Diferente do que foi observado para a HSPA9, a presença da hHep1_core não causou um deslocamento significativo no tempo de retenção da BSA e o pico de hHep1_core sofre uma ligeira diminuição de intensidade, porém numa extensão muito menor que aquela observada na presença de HSPA9. Eliminando a hipótese de que o efeito observado para a HSPA9 seja puramente hidrodinâmico.

² A utilização de diferentes lotes foi necessária diante da instabilidade de ambas as proteínas que dificulta a realização das análises em períodos maiores que 24 h.

Figura 24: Comparação entre cromatogramas da mistura de BSA e hHep1_core (1:6) e das proteínas puras. O perfil da mistura é apresentado em linha contínua na cor cinza, enquanto o perfil de hHep1_core e BSA puras são representados em linhas tracejadas nas cores preta e azul, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Assim, os dados de aSEC sugerem que a hHep1_core mantém a capacidade da hHep1 Δ_{mts} de interagir com a HSPA9, em concordância com estudos prévios que indicam que o núcleo é a região da hHep1 responsável por esta interação (VU et al., 2012). Estudos por calorimetria de titulação isotérmica poderiam corroborar esta hipótese e determinar com maior acurácia a afinidade da interação, bem como os parâmetros termodinâmicos que a governam. No entanto, a hHep1_core possui uma baixa estabilidade em altas concentrações, em relação à hHep1 Δ_{mts} , não sendo possível obtê-la em concentrações suficientes para a realização de estudos por calorimetria nas atuais condições de purificação. Desta forma, estudos que busquem estabelecer condições para uma maior estabilidade da hHep1_core são necessários para o aprimoramento destes parâmetros. Conforme discutido na subseção “Estabilidade química”, a presença de íons fosfato interferem na estabilidade da hHep1_core provocando sua degradação. Estudos futuros podem avaliar se a instabilidade em altas concentrações também é intensificada pela presença destes íons e a possibilidade de conduzir os estudos de calorimetria em tampão TK.

Atividade chaperona intrínseca da hHep1_core

A atividade chaperona intrínseca da hHep1_core foi avaliada mediante sua capacidade em impedir a agregação de proteínas em condições de estresse térmico. A Figura 25 elenca os dados de espalhamento de luz da proteína-cliente padrão luciferase

(a) e da chaperona HSPA9 (c) na presença de concentrações crescentes de hHep1_core. Os percentuais de agregação em função da proporção de hHep1_core são apresentados nos itens (b) e (d) para a luciferase e HSPA9, respectivamente.

Figura 25: Atividade chaperona intrínseca da hHep1_core. (a) Perfil de espalhamento de luz de amostras de luciferase a 1 μM pura (verde) e na presença de concentrações crescentes de hHep1_core (azul) (b) Percentual de agregação luciferase em função proporções de hHep1_core presente em solução. (c) Perfil de espalhamento de luz de amostras de HSPA9 6 μM pura (laranja) e na presença de concentrações crescentes de hHep1_core (azul) (d) Percentual de agregação HSPA9 em função de proporções de hHep1_core presente em solução.

Fonte: Autoria própria.

As Figura 25(a) e (b) indicam que a presença de hHep1_core na proporção 1:1 é capaz de causar uma diminuição no percentual de agregação da luciferase inferior a 10%. Nesta mesma proporção o efeito de prevenção causado pela hHep1 Δ_{mts} é semelhante, só sendo possível observar uma prevenção significativa de agregação em concentrações superiores de 1:10 (~50%) e 1:50 (~85%) (DORES-SILVA et al., 2021). No entanto, o aumento na concentração de hHep1_core não apresentou este mesmo efeito de prevenção dose-dependente. A proporção 1:2 parece não interferir no processo de agregação e em 1:10 há uma elevação de cerca de 40% na formação de agregados.

De forma que, a hHep1_core parece contribuir para o processo de agregação conforme se aumenta sua proporção em relação à luciferase.

A análise dos dados apresentados na Figura 25(c) e (d) indicam uma prevenção da agregação da HSPA9 de cerca de 30% na presença de uma concentração de hHep1_core na proporção 1:1. Esta proporção causou um efeito de prevenção da agregação da HSPA9 semelhante à hHep1 Δ_{mts} , assim como observado para a luciferase, mantendo também uma maior eficiência sobre a chaperona do que sobre a proteína-cliente. Entretanto, em proporções superiores, a hHep1_core perde sua eficácia em prevenir a agregação e coopera para um aumento do percentual de agregados. Este percentual alcança um índice de 200% em 1:4, enquanto nesta mesma proporção a hHep1 Δ_{mts} é capaz de diminuir a agregação para níveis inferiores à 50% (DORES-SILVA et al., 2021).

Os dados da Figura 25 mostram que a hHep1_core atua de forma semelhante à hHep1 Δ_{mts} em proporção 1:1, mas provoca o efeito contrário em proporções superiores, coagregando com as proteínas ao invés de prevenir sua agregação. Isto indica que a prevenção da agregação pela hHep1 ocorre por mecanismos diferentes nas proporções 1:1 e em proporções superiores. É possível que na proporção 1:1 o que se observa é resultado da formação de um complexo entre as construções, hHep1_core e hHep1 Δ_{mts} , e HSPA9 e as construções e luciferase. Os complexos formados possuem uma estabilidade térmica superior à das proteínas puras. A maior afinidade de interação entre as construções e HSPA9 pode explicar sua maior eficiência sobre a prevenção da agregação da chaperona em relação às proteínas modelo, pois, uma vez que esta interação é favorecida, uma maior concentração de complexos estáveis é formada.

No entanto, em proporções superiores à 1:1, a atividade chaperona observada para a hHep1 Δ_{mts} se deve à uma função que a hHep1_core não é capaz de exercer. Isso sugere que este efeito não é proveniente de uma interação específica entre as proteínas, mas pode ser função da capacidade da hHep1 Δ_{mts} em manter os complexos afastados evitando a agregação. Assim, quanto maior a quantidade de hHep1 Δ_{mts} no meio, menor a probabilidade de agregação. A mesma função não é exercida pela hHep1_core, que não é capaz de prevenir a agregação, mas coagrega com as demais proteínas. De forma que, quanto maior a quantidade de hHep1_core no meio, maior a probabilidade de formação de interações inespecíficas que intensificam o processo de agregação. Isto

HSPA9. Os resíduos de aminoácidos R81, H107 e D111 (ZHAI, P. et al., 2011) e motivo *zinc finger* (NYAKUNDI et al., 2016, DORES-SILVA et al., 2013) que se mostraram importantes para esta função foram mantidos na construção da mutante hHep1_core. Assim, aqui avaliamos sua capacidade em interagir e estimular a atividade ATPásica da HSPA9.

A Figura 27(a) apresenta os valores da taxa de liberação de Pi pela HSPA9 em função da concentração de hHep1_core presente no meio. Os dados mostram uma elevação nesta taxa em função de concentrações crescentes de hHep1_core, indicando que a mutante interage com HSPA9 e estimula sua capacidade de clivagem de ATP. Estes dados concordam com as observações de Vu et al. (2012) de que o intervalo core da hHep1 seria o subdomínio responsável pela interação e estímulo da HSPA9.

Figura 27: Efeito da hHep1_core sobre a atividade ATPásica da HSPA9. (a) Curva da liberação de $[Pi].min^{-1}$ em função da concentração de hHep1_core. (b) Comparação entre os percentuais de estímulo da HSPA9 pela hHep1_core e hHep1 Δ_{mts} na concentração 20 μM .

Fonte: Autoria própria.

O percentual de estímulo de cada concentração de hHep1_core foi calculado com base na atividade basal da HSPA9, estes dados são apresentados no gráfico inserido na Figura 27(a). O ajuste sobre a curva indica um estímulo máximo de 315% e um EC_{50} de $14 \pm 3 \mu M$. Se compararmos estes valores àqueles obtidos para a hHep1 Δ_{mts} , onde foram obtidos um estímulo máximo de 330% e EC_{50} de $1 \pm 0,1 \mu M$ (DORES-SILVA et al., 2021), encontramos que o erro percentual nos valores de estímulo máximo é inferior a 5%. No entanto, os valores de EC_{50} diferem consideravelmente, o que pode ser explicado pela concentração saturante no experimento com a hHep1_core não ter sido alcançada, uma vez que pequenas variações no máximo da curva causam grandes deslocamentos na região de meia curva

onde é definido o EC_{50} . Embora não seja possível comparar com acurácia significativa a capacidade de estímulo máximo entre as construções sobre a HSPA9, uma vez que não foi alcançada a concentração saturante de hHep1_*core*, os dados em 20 μ M (Figura 27(b)) são comparáveis e indicam que a mutante hHep1_*core*, embora mantenha a capacidade de estimular a HSPA9, parece ter uma menor eficiência em comparação a hHep1 Δ_{mts} .

Os resultados apresentados nessa seção são análises preliminares. Um aprimoramento das condições experimentais, explorando concentrações de hHep1_*core* superiores à 20 μ M para aumentar a acurácia dos valores de EC_{50} e percentual máximo de estímulo, são necessários em estudos futuros. A partir de novas medidas será possível avaliar se a hHep1_*core*, embora seja capaz de estimular a atividade ATPásica da HSPA9, possui, de fato, uma menor eficiência em relação à Hep1 Δ_{mts} e, em caso positivo, como a ausência das regiões N e C-terminais afetam sua funcionalidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As chaperonas moleculares possuem um importante papel na manutenção da proteostase celular, dentre elas a família das Hsp70s tem sido amplamente estudada mediante seu importante papel na coordenação de funções celulares (ROSENZWEIG et al, 2019). A HSPA9 age no enovelamento, importação e biogênese de proteínas, mas, necessita de parceiras que modulem suas funções e estabilizem sua estrutura, evitando o processo de autoagregação. Esta última função é atribuída à cochaperona hHep1. Detalhes do mecanismo de interação entre mortalina e hHep1 ainda não foram completamente elucidados, embora existam vários indícios de que esta interação ocorra na região do DLN da HSPA9 (BLAMOWSKA; NEUPERT; HELL, 2012; DORES-SILVA et al., 2015a, 2021; NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019).

Este trabalho é parte de um estudo desenvolvido pelo grupo do LBBP que busca compreender os detalhes da interação entre HSPA9 e hHep1, tendo como enfoque a compreensão da correlação entre aspectos estruturais da hHep1 e sua função. Para isso foi desenvolvido um estudo comparativo entre a hHep1 Δ_{mts} , previamente caracterizada estrutural e funcionalmente pelo grupo (DORES-SILVA et al., 2021 e 2013) e a mutante truncada hHep1_*core* que, corresponde somente à região *core* (64-160) da hHep1. A escolha deste subdomínio para o estudo se justifica na importância que os resíduos que o compõe, incluindo o motivo *zinc finger*, têm mostrado para a função da hHep1 e evidências de que esta é a região responsável por sua interação com a HSPA9.

Neste trabalho foram desenvolvidos protocolos de indução e purificação da hHep1_*core* que possibilitaram a obtenção da proteína solúvel nas mesmas condições em que a hHep1 Δ_{mts} e a HSPA9. No entanto, foi obtido um rendimento inferior ao observado para a hHep1 Δ_{mts} , devido à maior instabilidade da mutante e ao maior número de etapas do protocolo de purificação.

Análises da hHep1_*core* em solução mostraram que ela é capaz de se estruturar, mesmo na ausência das regiões truncadas. Sua composição apresentou um menor percentual de estruturas randômicas com relação à hHep1 Δ_{mts} , coerente com o fato da região do *core* da hHep1 ser mais estruturado do que seus terminais. A sonda fluorescente intrínseca W115 mostrou uma exposição ao solvente ligeiramente maior que na hHep1 Δ_{mts} , mas não suficiente para se concluir que houveram mudanças

significativas na estrutura 3D. A estrutura predominante em solução permanece sendo um monômero levemente alongado, como também fora observado para a hHep1 Δ_{mts} .

Os resultados experimentais corroboram as predições do modelo molecular por homologia da estrutura 3D da hHep1_*core* à medida que este prevê uma estrutura organizada; com a manutenção de uma estrutura em sanduíche β protegendo o motivo *zinc finger*; com a cadeia lateral do W115 voltada para o núcleo da estrutura e um formato ligeiramente alongado, que pode indicar a conservação da estrutura em L observada para a Tim15c. Os resultados da caracterização estrutural deste trabalho demonstram que a hHep1_*core* mantém uma estrutura 3D muito semelhante à observada para a hHep1 Δ_{mts} , de forma que a estrutura do *core* parece se estabilizar de forma independente das regiões N e C-terminais. Isto possibilita que a mutante seja empregada como um objeto de estudo capaz de simular a ação do subdomínio *core* da hHep1.

A hHep1_*core* apresentou uma baixa estabilidade temporal na presença de íons fosfato, sofrendo processos de degradação após 24 h, na ausência destes íons não foram observados processos significativos de degradação por até 72 h. Assim como a hHep1 Δ_{mts} , a mutante é propensa à oligomerização concentração dependente, indicando que a região do *core* coopera para este processo. Na presença de agentes desnaturantes, a hHep1_*core* sofre um desenovelamento não-cooperativo, característico de estruturas que se estabilizam por uma rede interações eletrostáticas e não por um núcleo denso hidrofóbico. Esta característica é conservada da hHep1 Δ_{mts} pela qual foi levantada a hipótese de que a hHep1 seja composta por estruturas menos estáveis, que desenovelam na presença de baixas concentrações de agentes caotrópicos, e estruturas mais estáveis que necessitam de maiores concentrações (DORES-SILVA et al., 2013). A partir dos resultados deste trabalho, a existência de estruturas de diferentes estabilidades parece se manter em estruturas internas à região correspondente ao domínio *Zinc-finger*.

A hHep1_*core* apresentou uma alta afinidade pelo íon Zn^{2+} , que é atribuída ao motivo *zinc finger*, amplamente conservado entre as homólogas (NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019). A conservação do efeito sinérgico observado para a hHep1 Δ_{mts} , causado por agentes quelante e caotrópicos, indica que o íon Zn^{2+} pode ser fundamental para a manutenção do *core* da hHep1. Assim, nos estudos de avaliação da estabilidade foi identificado que as regiões N e C-terminais são importantes para a

estabilização da hHep1, protegendo regiões propensas à degradação. Também foi observado que as regiões truncadas parecem não contribuir para o processo de oligomerização dependente da concentração da hHep1, uma vez que o mesmo processo foi observado no estudo do *core*. As análises de estabilidade química mostraram que o *core* se estabiliza por meio de interações eletrostáticas, mas é composto por regiões de diferentes estabilidades, e a manutenção de sua estrutura pode depender da presença do íon Zn^{2+} complexado ao *zinc finger*.

Por meio das análises de interação foi avaliado que a hHep1_*core* é capaz de interagir com a HSPA9 e estimular sua atividade ATPásica, indicando que as regiões N e C-terminais não compõem o sítio de interação da hHep1. Entretanto, a capacidade da mutante em estimular a atividade ATPásica da HSPA9 parece ser menor do que a da hHep1 Δ_{mts} , sugerindo que, embora as regiões truncadas não sejam determinantes para a interação, elas podem auxiliar na eficiência deste processo.

Foi observado que a hHep1_*core* não possui atividade chaperona intrínseca quando em excesso no meio, mas tem o mesmo percentual de prevenção à agregação que a hHep1 Δ_{mts} na proporção 1:1 com a cliente. Diante disto, propõem-se a hipótese de que o processo de prevenção à agregação da hHep1 ocorra por dois mecanismos: formação de um complexo mais estável termicamente com a proteína-cliente e por efeito estereoquímico, impedindo a aproximação destes complexos. A formação do complexo pode ser realizada tanto pela hHep1_*core* quanto pela hHep1 Δ_{mts} , enquanto o efeito estereoquímico só é observado na presença da hHep1 Δ_{mts} . Assim, o *core* da hHep1 seria responsável pelas interações com outras proteínas, enquanto as regiões N e/ou C-terminais cooperam para a atividade chaperona à medida que impedem que o *core* realize interações inespecíficas, coagregando com os complexos, e atuam estereoquimicamente afastando os complexos e impedindo a agregação dos mesmos.

Sugestões para trabalhos futuros

As análises realizadas neste trabalho possibilitaram a obtenção da hHep1_*core* e mostraram que a mutante conserva a maioria das características estruturais e funcionais observadas para a hHep1 Δ_{mts} . As principais divergências se relacionam à estabilidade da hHep1_*core* (degradação e coagregação sob estresse térmico). Foi corroborado que o *core* é a região responsável pela interação entre hHep1 e HSPA9 e obteve-se indícios de

que as regiões terminais truncadas têm um papel fundamental para estabilidade da hHep1 e para sua atividade chaperona intrínseca.

Assim, este trabalho abre questões para investigação:

- Como os íons Pi afetam a estabilidade do domínio Zinc finger da hHep1?
- Como as regiões N e C-terminais atuam para estabilidade intrínseca da hHep1 e prevenção da agregação de proteínas-cliente?
- Esta é uma função conjunta ou que pode ser atribuída à apenas uma das regiões truncadas?
- A presença de apenas uma destas regiões poderia prejudicar a atuação do *core* em sua interação e estímulo à atividade ATPásica da HSPA9?
- A hHep1_*core* também seria capaz de atuar sobre os SMAs e provocar sua diluição em partículas menores, conforme reportado por Dores-Silva et al. (2021) para a hHep1 Δ_{mts} ou esta função também depende das regiões terminais?

Portanto, sugere-se a continuação do estudo da hHep1 empregando construções mutantes que contenham as regiões N-terminal + *core* (49-160) e *core* + C-terminal (64-178) de forma comparativa com os resultados obtidos pelo grupo para a hHep1 Δ_{mts} e hHep1_*core*. Assim, acredita-se que será possível elucidar o papel das regiões N- e C-terminais na hHep1, para as quais ainda não se têm função atribuída até o momento.

BIBLIOGRAFIA

BHATTACHARYYA, T. et al. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 4, p. 1705-1710, 1995.

BLAMOWSKA, M. et al. ATPase domain and interdomain linker play a key role in aggregation of mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4423-4431, 2010.

BLAMOWSKA, M.; NEUPERT, W.; HELL, K. Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 1, p. 125-135, 2012.

BLATCH, G.; EDKINS, A. The Networking of Chaperones by Co-chaperones: Control of Cellular Protein Homeostasis. **Editora Blatch ISBN: 978-3-319-11730-0**. doi:10.1007/978-3-319-11731-7 (jan. de 2015)

BÖHM, Gerald; MUHR, Rudolf; JAENICKE, Rainer. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 3, p. 257-261, 2005.

BRACHER, A.; VERGHESE, J. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 2, p. 10, 2015.

CAMBERG, J.L. et al. Molecular Chaperones. In: MALOY, S. AND HUGHES, K. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2 ed. Academic Press, 2013. p. 456-460.

CURIE, E. Madame Curie. Paris: **Gallimard**, 1938.

DA SILVA, K.; C BORGES, J. C.. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2011.

DAHIYA, V.; BUCHNER, J. Functional principles and regulation of molecular chaperones. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 114, p. 1-60, 2019.

DEIANA, A. et al. Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0217889, 2019.

DEOCARIS, C. C.; KAUL, S. C.; WADHWA, R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. **Cell stress & chaperones**, v. 11, n. 2, p. 116. 2006.

DÍAZ DE LA LOZA, M. C. et al. Zim17/Tim15 links mitochondrial iron–sulfur cluster biosynthesis to nuclear genome stability. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 14, p. 6002-6015, 2011.

DORES-SILVA, P. R. et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0117170, 2015a.

DORES-SILVA, P. R. et al. New insights on human Hsp70-escort protein 1: Chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 772-784, 2021.

DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein–Hep1–of *Leishmania braziliensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 903-912, 2015b.

DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: an essential mortalin co-chaperone. **International journal of biological macromolecules**, v. 56, p. 140-148, 2013.

DYSON, H. J; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 3, p. 197-208, 2005.

ESWAR, Narayanan et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current protocols in protein science**, v. 50, n. 1, p. 2.9. 1-2.9. 31, 2007.

FERRÉ, C. et al. HSPA9/Mortalin Mediates Axo-Protection by Modulating Mitochondrial Dynamics in Neurons. 2020. [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-119629/v1>]

FLAHERTY, K. M.; DELUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. **Nature**, v. 346, n. 6285, p. 623-628, 1990.

FRANCK, E. et al. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. **Journal of molecular evolution**, v. 59, n. 6, p. 792-805, 2004.

GIAEVER, G. et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 387-391, 2002.

GOSWAMI, A. V.; CHITTOOR, Balasubramanyam; D'SILVA, Patrick. Understanding the functional interplay between mammalian mitochondrial Hsp70 chaperone machine components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19472-19482, 2010.

HAYER-HARTL, M; HARTL, F. U.; BRACHER, A.. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

HASLBECK, M.; BUCHNER, J. Chaperone function of sHsps. **Small stress proteins**, p. 37-59, 2002.

HUNTER, T. Why nature chose phosphate to modify proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1602, p. 2513-2516, 2012.

JIN, J. et al. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1193-1204, 2006.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010.

KERNER, M. J. et al. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 209-220, 2005.

KIRALY, V. T. et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 320-331, 2020.

KLUSKA, K.; ADAMCZYK, J.; KRĘŻEL, A. Metal binding properties of zinc fingers with a naturally altered metal binding site. **Metallomics**, v. 10, n. 2, p. 248-263, 2018.

KLUTH, J. et al. Arabidopsis Zinc Ribbon 3 is the ortholog of yeast mitochondrial HSP70 escort protein HEP1 and belongs to an ancient protein family in mitochondria and plastids. **FEBS letters**, v. 586, n. 19, p. 3071-3076, 2012.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A.. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LONDONO, C. et al. Mortalin, apoptosis, and neurodegeneration. **Biomolecules**, v. 2, n. 1, p. 143-164, 2012.

MOMOSE, T. et al. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. **EMBO reports**, v. 8, n. 7, p. 664-670, 2007.

MONERA, O. D.; KAY, C. M.; HODGES, R. S. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. **Protein Science**, v. 3, n. 11, p. 1984-1991, 1994.

MONROY, C. A.; MACKIE, D. I.; ROMAN, D. L. A high throughput screen for RGS proteins using steady state monitoring of free phosphate formation. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62247, 2013.

NYAKUNDI, D. O. et al. Plasmodium falciparum Hep1 is required to prevent the self aggregation of PfHsp70-3. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0156446, 2016.

NYAKUNDI, D. O.; BENTLEY, S. J.; BOSHOF, A. Hsp70 escort protein: More than a regulator of mitochondrial Hsp70. **Current Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 64-73, 2019.

PACE C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. **Protein structure: A practical approach**. 2th ed. New York: Oxford University press, 1997.

PARK, S. J. et al. Down-regulation of mortalin exacerbates A β -mediated mitochondrial fragmentation and dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 4, p. 2195-2204, 2014.

PFANNER, N.; TRUSCOTT, K. N. Powering mitochondrial protein import. **Nature structural biology**, v. 9, n. 4, p. 234-236, 2002.

PHILO, J. S. An improved function for fitting sedimentation velocity data for low-molecular-weight solutes. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 1, p. 435-444, 1997.

POWERS, E. T. et al. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 959-991, 2009.

RAN, Q. et al. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 1, p. 174-179. 2000.

ROSENZWEIG, R. et al. The Hsp70 chaperone network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.

RÜDIGER, S.; BUCHBERGER, A.; BUKAU, B. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. **Nature structural biology**, v. 4, n. 5, p. 342-349, 1997.

SAIBIL, H.. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 10, p. 630-642, 2013.

SHEN, M.; SALI, A.. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein science**, v. 15, n. 11, p. 2507-2524, 2006.

SICHTING, M. et al. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. **The EMBO journal**, v. 24, n. 5, p. 1046-1056, 2005.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 351-361, 2013.

STEVENSON, Keith J. Review of origin pro 8.5. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 14, p. 5621, 2011.

STRAUCH, A.; HASLBECK, M.. The function of small heat-shock proteins and their implication in proteostasis. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 163-172, 2016.

SZKLARZ, L. K. S. et al. Inactivation of the mitochondrial heat shock protein zim17 leads to aggregation of matrix hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis. **Journal of molecular biology**, v. 351, n. 1, p. 206-218, 2005.

TAURIN, S. et al. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]/[K^+]$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, v. 91, n. 10, p. 915-922. 2002.

TISSIÉRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, Ursula M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **Journal of molecular biology**, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.

VU, M. T. et al. The DNLZ/HEP zinc-binding subdomain is critical for regulation of the mitochondrial chaperone HSPA9. **Protein Science**, v. 21, n. 2, p. 258-267, 2012.

WADHWA, R. et al. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. **Experimental cell research**, v. 274, n. 2, p. 246-253. 2002.

WADHWA, R. et al. Targeting mortalin using conventional and RNA-helicase-coupled hammerhead ribozymes. **EMBO reports**, v. 4, n. 6, p. 595-601. 2003.

WADHWA, R. et al. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. **International journal of cancer**, v. 118, n. 12, p. 2973-2980. 2006.

YAMAMOTO, H. et al. Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. **FEBS letters**, v. 579, n. 2, p. 507-511, 2005.

YANG, Z. et al. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. **Journal of structural biology**, v. 179, n. 3, p. 269-278, 2012.

YUN, C. et al. Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

ZHAI, P. et al. The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 26098-26106, 2008.

ZHAI, P. P. et al. A conserved histidine in human DNLZ/HEP is required for stimulation of HSPA9 ATPase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 408, n. 4, p. 589-594, 2011.

ZHAI, P. P. et al. The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 26098-26106, 2008.

ZHU, X. X. et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1606-1614, 1996.