UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudos da interação entre a mortalina humana e as
duas isoformas das co-chaperonas GrpEs

Candidato: Leonardo Yoshida
Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos
2018

Leonardo Yoshida

Estudos da interação entre a mortalina humana e as duas isoformas das co-chaperonas GrpEs.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos
2018

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo contínuo apoio e incentivo para a minha formação, e por todo o trabalho e dedicação que me permitiram estar aqui.

Às agências de financiamento CNPq, CAPES e FAPESP pelos recursos disponibilizados.

Ao Professor Dr. Júlio César Borges pela oportunidade concedida e por todos os ensinamentos.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela infraestrutura, estímulo intelectual e compartilhamento do conhecimento.

Ao Professor Marcel Tabak e ao Professor Carlos Montanari pela concessão de espaço e equipamentos para que algumas etapas deste trabalho pudessem ser realizadas.

À Professora Lisandra Marques Gava e aos colegas do LBBFM da UFSCAR pelo espaço e auxílio em alguns experimentos.

Aos colegas mais experientes do laboratório: Ana Beatriz, Karine, Laudimir, Marcella, Natasha, Nicole, Noeli, Paulo, Sérgio e Vanessa. Certamente foram muito prestativos e contribuíram enormemente para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos colegas mais recentes, Amanda, Arthur, João, Louis, Marcela e Silvia, pela boa convivência e pelo aprendizado mútuo.

Às colegas do laboratório do Professor Marcel Tabak, Ana Elisa e Fernanda, pela disposição em ajudar quando requisitadas.

Aos técnicos e ex-técnicos Carlos e Júlia, respectivamente, pela manutenção da ordem e aconselhamentos.

RESUMO

As Hsp70 são proteínas centrais no sistema de homeostasia proteica da célula. Pelo fato delas estarem envolvidas em uma grande variedade de processos relacionados ao enovelamento correto das proteínas, elas estão envolvidas em processos como envelhecimento, doenças degenerativas, como Alzheimer, e alguns tipos de câncer. Uma das etapas essenciais no seu ciclo funcional é a troca de ADP por ATP, um processo que é acelerado pelos fatores de troca de nucleotídeos (NEFs) que, em bactérias e mitocôndrias, correspondem à proteína GrpE. Por razões ainda não bem compreendidas, duas isoformas estão presentes nas mitocôndrias de humanos, a GRPEL1 e a GRPEL2. Pouco se sabe da dinâmica da interação destas com a Hsp70 mitocondrial de humanos (mortalina) porque havia uma dificuldade em se obter esta proteína na sua forma solúvel e funcional (atualmente superada). Dessa forma, o presente trabalho de pesquisa busca caracterizar do ponto de vista bioquímico e biofísico a interação dessas proteínas com a mortalina, visando compreender a dinâmica da interação entre elas, contribuir para a elucidação da rede de interações das Hsp70 e compreender o porquê de 2 isoformas estarem presentes em mamíferos. Para isto, ensaios *in vitro* das proteínas mortalina, GRPEL1 e GRPEL2 recombinantes foram realizados. Elas foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ e gel filtração. As GrpEs tiveram seus graus de pureza e enovelamento correto avaliadas por SDS-PAGE e dicroísmo circular. Suas estruturas terciárias e quaternárias foram avaliadas através da cromatografia de exclusão por tamanho analítica e do *crosslinking* químico. Com as proteínas tendo sido purificadas, ensaios de interação molecular foram realizados através do *pull-down*, do ITC e, adicionalmente, foram feitos ensaios de agregação para investigar um possível papel das GrpEs no processo de agregação térmica da mortalina. Todas as proteínas puderam ser obtidas solúveis e com alto grau de pureza. Os ensaios de *pull-down* validaram a interação entre a mortalina e as GrpEs, mas essas interações não foram detectadas no ITC, possivelmente pelas limitações do *setup* experimental utilizado. Não houveram evidências de que as GrpEs atuem no sentido de prevenir a agregação térmica da mortalina. Em condições oxidativas, ligações dissulfeto inter-moleculares foram observadas apenas na GRPEL2, enquanto que as intra-moleculares parecem estar presentes tanto na GRPEL1 quanto na GRPEL2. Isto indica um possível mecanismo de regulação em situações de estresse oxidativo, mediado por mudanças no estado redox dessas ligações.

ABSTRACT

Hsp70 are proteins that play a central role in cellular protein homeostasis. Because they are involved in a variety of processes related to protein folding, they are also involved in processes such as aging, degenerative diseases like Alzheimer and certain types of cancer. One of the essential steps in the Hsp70 functional cycle is the exchange of ADP for ATP, a process accelerated by the nucleotide exchange factors (NEF's) which, in bacteria and mitochondria, corresponds to GrpE protein. For reasons not well understood yet, two isoforms are present on human mitochondria, GRPEL1 and GRPEL2. Little is known about the dynamics of their interaction with human mitochondrial Hsp70 (mortalin) because it was difficult to produce this protein in its soluble and functional form (now overcome by co-expression strategies with one co-chaperone). The current research work seeks to characterize the biochemical and biophysical aspects of the interaction between these proteins with mortalin in order to comprehend the dynamics of their interaction, to contribute on the elucidation of the Hsp70 interaction network and to comprehend why two isoforms are present. For this, in vitro assays of the recombinant proteins mortalin, GRPEL1 and GRPEL2 were carried out. They were expressed and purified by Ni^{2+} affinity chromatography and gel filtration. Both GrpEs had their degree of purity and correct folding assessed by SDS-PAGE and circular dichroism. Their tertiary and quaternary structures were evaluated by analytical size exclusion chromatography and chemical crosslinking. Having the proteins being purified, molecular interaction assays were done with pull-down, ITC and, additionally, aggregation assays were carried out to investigate a possible role played by GrpEs in the thermal aggregation of mortalin. All the proteins could be obtained soluble and with a high degree of purity. Pull-down assays validated the interaction between mortalin and GrpEs, but this interaction could not be detected by ITC, possibly because of the experimental setup utilized. There was no evidence that GrpEs are able to prevent the thermal aggregation of mortalin. Under oxidative conditions, intermolecular disulfide bonds were observed only in GRPEL2, whereas the intramolecular ones appear to exist in both GRPEL1 and GRPEL2. This indicates a possible mechanism of regulation under oxidative stress conditions, mediated by the redox state of those bonds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização de Domínios das Hsp70.....	5
Figura 2 – Estrutura tridimensional da Hsp70 e seus domínios.....	6
Figura 3 – Ciclo funcional da Hsp70 com suas co-chaperonas, ligantes e proteína substrato.	8
Figura 4 – As 4 famílias de NEFs identificadas em humanos.	10
Figura 5 – Estrutura da GrpE de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 6 – Comparação da sequência de aminoácidos das proteínas EcGrpE, GRPEL1 e GRPEL2.....	13
Figura 7 – Estrutura cristalográfica do domínio DLN da DnaK e sua co-chaperona GrpE. ..	14
Figura 8 – SDS-PAGE das proteínas GRPEL1, GRPEL2 e mortalina.....	24
Figura 9 – Espectros de CD das proteínas GRPEL1 e GRPEL2.	25
Figura 10 – SDS-Page das amostras antes e após a adição de DSS.	27
Figura 11 – Cromatograma das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 da cromatografia de exclusão por tamanho analítica.	29
Figura 12 – Gráficos do padrão de MM utilizados para calcular a MM_{app} e o Raio de Stokes (R_s) das proteínas GRPEL1 e GRPEL2.....	29
Figura 13 – <i>Pull-down</i> da mortalina com a GRPEL1.....	33
Figura 14 – <i>Pull-down</i> da mortalina com a GRPEL2.....	34
Figura 15 – Termogramas obtidos no ITC.....	38
Figura 16 – Ensaio de agregação térmica da mortalina na ausência e presença das GrpEs..	40
Figura 17 – SDS-PAGE das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 em diferentes estados oxidativos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Família das Hsp70 humanas.	4
Tabela 2. Parâmetros obtidos no ProtParam a partir da sequência de aminoácidos de cada proteína.	23
Tabela 3. Intensidade das bandas em 208 e 222 nm das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 obtidos no dicroísmo circular.	25
Tabela 4. Conteúdo de estrutura secundária das proteínas GRPEL1 e GRPEL2, estimadas pelo software CDNN Deconvolution.	26
Tabela 5. MM e Rsph das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 baseadas na sequência de aminoácidos	30
Tabela 6. Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 calculados a partir dos dados de cromatografia de exclusão por tamanho analítica.	30
Tabela 7. Aminoácidos da GRPEL1 e da GRPEL2 mais propensos a interagirem com o Ni ²⁺ ...	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg: Micrograma (10^{-6} gramas);

μL: Microlitro (10^{-6} litros);

μM: Micromolar (10^{-6} molar);

ADP: Adenosina difosfato;

ATP: Adenosina trifosfato;

CD: Circular Dichroism (Dicroísmo Circular);

cm: Centímetros;

DLN: domínio de ligação a nucleotídeos;

DLP: domínio de ligação a proteínas;

DSS: Disuccinimidyl suberate (suberato de disuccinimidila);

***f/f₀*:** razão friccional. Razão entre o coeficiente friccional experimental de uma proteína e o coeficiente friccional teórico da mesma proteína considerando-a como uma esfera perfeita;

Hsp: Heat Shock Proteins (Proteínas do Choque Térmico);

GRP: Glucose Regulated Protein (Proteína regulada por glicose);

GrpE: Proteína GroP-like. Nome que faz referência à história da descoberta desta proteína;

GRPEL: homóloga em humanos da GrpE bacteriana;

IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopuranside*;

ITC: Isothermal Titration Calorimetry (Calorimetria de Titulação Isotérmica);

K_{av}: coeficiente de partição;

kDa: kilodalton (10^3 daltons);

KDEL: sequência de aminoácidos lisina (K), aspartato (D), glutamato (E) e leucina (L). As proteínas que possuem essa sequência ficam retidas no retículo endoplasmático.

MM: Massa Molecular

MM_{app}: Massa Molecular aparente

NEF: Nucleotide Exchange Factor (Fator de Troca de Nucleotídeo)

PDB: Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)

pH: potencial hidrogeniônico

RCF: força centrífuga relativa (*relative centrifugal force*)

RE: retículo endoplasmático

R_s: raio de Stokes

R_{sph}: raio de Stokes teórico (considerando a proteína como uma esfera perfeita)

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

TPR: *tetratricopeptide repeat*.

UV: ultravioleta

VIS: visível

LISTA DE SÍMBOLOS

Å: Angstrom (10^{-10} metros)

α : Alfa;

β : Beta;

ϵ : Épsilon;

λ : Lambda;

μ : Micro

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteínas e chaperonas moleculares	1
1.2 A família Hsp70 em humanos	2
1.3 Estrutura e mecanismo funcional	6
1.4 Mortalina – a Hsp70 mitocondrial.....	8
1.5 Fatores de troca de nucleotídeos	10
1.6 A co-chaperona GrpE	11
1.7 Associação da GrpE com a Hsp70 e o mecanismo de ação	13
1.8 A GrpE como termosensora molecular	14
1.9 Possível papel das GrpEs mitocondriais humanas em condições de estresse oxidativo.....	15
2 DESENVOLVIMENTO	18
2.1 Objetivos	18
2.1.1 Gerais	18
2.1.2 Específicos	18
2.2 Materiais e Métodos	18
2.2.1 Expressão e purificação das GrpEs humanas recombinantes e da mortalina... 18	
2.2.2 Quantificação das Proteínas	19

2.2.3 Dicroísmo circular.....	20
2.2.4 Cromatografia de exclusão por tamanho analítica	20
2.2.5 Crosslinking	21
2.2.6 Ensaio de Pull-down.....	21
2.2.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	21
2.2.8 Influência das GrpEs na agregação térmica da mortalina.....	22
2.2.9 Presença de ligação dissulfeto nas GrpEs em diferentes estados oxidativos ...	22
2.3 Resultados e Discussão	22
2.3.1 Expressão e Purificação das proteínas GRPEL1, GRPEL2 e mortalina.....	22
2.3.2 Crosslinking	26
2.3.3 Cromatografia de Exclusão por tamanho Analítica	28
2.3.4 Ensaio de Pull-down.....	30
2.3.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	36
2.3.6 Influência das GrpEs na agregação térmica da mortalina.....	39
2.3.7 Presença de ligações dissulfeto nas GrpEs em diferentes estados oxidativos.	41
3 CONCLUSÕES	44
4 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas e chaperonas moleculares

As proteínas são macromoléculas que desempenham papel central nos processos biológicos (WODAK; JANIN, 2002). São construídas a partir de 20 diferentes tipos de aminoácidos e, devido à diversidade geométrica e de propriedades físico-químicas dos grupos funcionais destes aminoácidos, são possíveis de se construir as mais diversas formas de proteínas. Tal atributo é extensivamente explorado pela natureza durante o curso da evolução, o que por sua vez resultou nos mais variados graus de sofisticação em termos de estrutura e dinâmica de proteínas. A ação combinada de interações proteicas específicas permitem a regulação dos processos bioquímicos para as mais diversas necessidades da célula (WEIGT et al., 2009). Não surpreendentemente, essas macromoléculas estão envolvidas em praticamente todas as funções fisiológicas conhecidas (WODAK; JANIN, 2002) tais como: catálise enzimática, transporte de oxigênio, sinalização celular, defesa, controle de tráfego em membranas, entre outras. Cada uma dessas funções envolve o reconhecimento químico de partes de outras moléculas pelas proteínas e muitas vezes envolvem mais de uma região da mesma proteína, o que implica na necessidade de que as moléculas tenham acesso a essas regiões, posicionamento correto e afinidade química (KESKIN; MA; NUSSINOV, 2005).

Como consequência dessas exigências para o reconhecimento químico, surge uma notável sensibilidade das proteínas em relação à sua estrutura tridimensional: para que ela exerça sua função é necessário que ela possua o seu enovelamento correto e qualquer distúrbio que afete isto (e.g. mutações, estresse oxidativo, estresse térmico, etc.) pode levar à perda de função e também à formação daquilo que se chama de agregados proteicos - proteínas que se aglutinam e podem precipitar devido à interação intermolecular de regiões hidrofóbicas expostas (BEISSINGER; BUCHNER, 1998; RUDDON; BEDOWS, 1997). Neste cenário, evoluíram, conjuntamente e paralelamente às proteínas funcionais, outras proteínas capazes de contornar esses problemas, sendo responsáveis por, dentre outras funções, auxiliar o enovelamento correto de proteínas nascentes, prevenir o enovelamento incorreto e encaminhar para degradação as incorretamente enoveladas e/ou agregadas. Tais proteínas são coletivamente denominadas chaperonas moleculares ou proteínas do choque térmico, pois foram inicialmente identificadas quando células eram expostas a temperaturas elevadas (WANG et al., 2006).

As chaperonas moleculares são classificadas de acordo com sua MM em cinco principais famílias: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e smHsp. Assim, a Hsp100, por exemplo, possui uma MM em torno de 100 kDa e a Hsp90, em torno de 90 kDa (BORGES; RAMOS, 2005). Elas são proteínas altamente conservadas entre as espécies e também dentro de uma mesma espécie: membros da família Hsp70 e da Hsp60 de mitocôndrias de ratos e de *Escherichia coli*, por exemplo apresentam, respectivamente, 51 e 49% de identidade na sequência de aminoácidos (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). Em geral, as chaperonas moleculares não trabalham sozinhas, mas atuam em conjunto com um grupo de moléculas chamadas co-chaperonas que são responsáveis por regular a atividade das chaperonas (MAYER; BUKAU, 2005). O objetivo deste trabalho teve como foco a Hsp70 mitocondrial humana (mtHsp70/GRP75/HspA9/PBP74/mortalina) e suas co-chaperonas GrpEs, e a partir daqui atenção especial será dado a elas.

1.2 A família Hsp70 em humanos

A família das Hsp70 humanas compreende um total de 13 proteínas que diferem entre si pelo seu nível de expressão gênica, localização subcelular, composição de aminoácidos e se exibem ou não expressão aumentada quando submetidas a estresse (Tabela 1). Elas compartilham uma mesma organização de domínios (Figura 1), exceto por algumas regiões que determinam a localização subcelular, a capacidade de interagir com co-chaperonas, e também as Hsp70 que parecem não atuar nas suas atividades chaperona clássicas. As 6 isoformas citoplasmáticas que possuem um motivo EEVD na extremidade C-terminal interagem com várias co-chaperonas via domínio TPR. A Hsp9A (mortalina), a HspA5 e a HspA13 possuem um peptídeo sinal na extremidade N-terminal, que as direciona para suas respectivas organelas. Na HspA5, existe também o sinal de retenção KDEL, que a mantém retida no retículo. É interessante observar que algumas delas foram descritas como participantes de diversos processos alheios às atividades chaperonas clássicas das Hsp70, como a HspA7, as HspA12A/12B, a HspA13 e a HspA14 (RADONS, 2016). Elas exibem homologia estrutural somente no DLN, enquanto que o DLP está ausente ou em seu lugar há uma sequência de aminoácidos sem homologia.

As Hsp70 são componentes centrais no sistema de homeostasia proteica da célula. Elas estão envolvidas em uma grande variedade de processos que envolvem o enovelamento correto das proteínas, que incluem: participação no processo de enovelamento das proteínas

recém-sintetizadas nos ribossomos, participação no reenovelamento de proteínas mal enoveladas ou agregadas durante situações de estresse celular, contribuições na prevenção da formação de agregados e estão envolvidas também no processo de translocação de proteínas através de membranas (MAYER; BUKAU, 2005; DA SILVA; BORGES, 2011).

Além das funções já citadas acima, foi reconhecido também que as Hsp70 participam no controle da atividade de diversas proteínas regulatórias, que incluem: receptores nucleares, quinases e fatores de transcrição (MAYER; BUKAU, 2005). Em adição, elas podem dar diferentes destinos para as proteínas clientes por meio da interação com outras chaperonas como a Hsp90 e outras co-chaperonas (BATISTA et al., 2015; BORGES; RAMOS, 2005; SERAPHIM).

Tabela 1 – Família das Hsp70 humanas e suas respectivas localizações subcelulares, quantidade de aminoácidos e se são induzíveis por estresse ou não.

Proteína	Nomes alternativos	Gene	Localização subcelular	AA	Induzível por estresse	Identidade c/ Hsp70-1A (%)
HspA1A	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	HSPA1A	Citosol, núcleo, membrana, exossomos extracelulares	641	Sim	100
HspA1B	Hsp70-2, Hsp70-1B	HSPA1B	Citosol, núcleo, exossomos extracelulares	641	Sim	99
HspA1L	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	HSPA1L	Citosol, núcleo	641	Não	91
HspA2	Heat shock 70kD protein 2, Hsp70.2	HSPA2	Citosol, núcleo, membrana, exossomos extracelulares	639	Não	84
HspA5	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	HSPA5	RE, Exossomos extracelulares	654	Não	64
HspA6	Hsp70-6, Hsp70B'	HSPA6	Citosol, exossomos extracelulares	643	Sim	85
HspA7	Hsp70-7, Hsp70B	HSPA7	Micropartículas do sangue, exossomos extracelulares	367	Sim	78
HspA8	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	HSPA8	Citosol, núcleo, membrana, exossomos extracelulares	646	Não	86
HspA9	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalina	HSPA9	Mitocôndria, RE, citosol	679	Não	52
HspA12A	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	HSPA12A	Intracelular, exossomos extracelulares	675	Não	22
HspA12B	Hsp70-12B	HSPA12B	Células Endoteliais, intracelular, plasma sanguíneo	685	Não	22
HspA13	Hsp70-13	HSPA13	RE, exossomos extracelulares, microssomos	471	Não	42
HspA14	Hsp70-14, Hsp70L1	HSPA14	Citosol, membrana celular	509	Sim	35

RE: Retículo Endoplasmático.

AA: Aminoácidos

FONTE: Adaptado de (RADONS, 2016)

Figura 1 – Organização de Domínios das Hsp70. Representação esquemática das regiões em comum que as Hsp70 compartilham, e algumas de suas diferenças. As 6 isoformas que possuem o motivo EEVD interagem com co-chaperonas via domínio TPR. A isoforma mitocondrial (Hsp9A/mortalina), a do retículo endoplasmático (HspA5/BiP) e a HspA13 possuem peptídeos sinais que as direcionam para suas respectivas organelas. A análise das Hsp70 sem o DLP mostrou que elas possuem conservação somente no DLN, o restante está ausente ou possuem regiões sem conservação com as estruturas canônicas do DLP. Fonte: Adaptado de (RADONS, 2016)

Por conta desse amplo espectro de interações, as Hsp70 estão envolvidas em uma grande variedade de processos celulares, tais como: na transdução de sinais, na regulação do ciclo celular, na diferenciação celular e também na morte celular programada. Isto levou alguns pesquisadores a considerar que as Hsp70 desempenham papéis importantes em processos como o envelhecimento, no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas em que há a formação de agregados proteicos (como Alzheimer), em alguns tipos de câncer, etc. (BROADLEY; HARTL, 2009; BURBULLA et al., 2010; FLACHBARTOVÁ; KOVACECH, 2013; HINAULT; BEN-ZVI; GOLOUBINOFF, 2006; KIKIS; GIDALEVITZ; MORIMOTO,

2010; MORIMOTO, 2008; MUCHOWSKI; WACKER, 2005; POWERS et al., 2010; POWERS; CLARKE; WORKMAN, 2009).

1.3 Estrutura e mecanismo funcional

As Hsp70 apresentam ~70 kDa e são divididas em dois domínios (Figura 2): o domínio de ligação de nucleotídeos adenosina (DLN – ~45 kDa), que possui atividade ATPásica; e o domínio de ligação de proteínas-cliente (DLP – ~25 kDa), subdividido em DLP β , formado por estruturas em folha β pregueada que compõem o sítio de ligação de proteínas-clientes, e em DLP α , formado por estruturas em hélice α e que funciona como uma “tampa”, bloqueando ou permitindo a saída de proteínas clientes. O domínio DLP reconhece um motivo estrutural contendo 5 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por aminoácidos carregados positivamente (RÜDIGER et al., 1997; RÜDIGER; SCHNEIDER-MERGENER; BUKAU, 2001; ZHU et al., 1996). Esse motivo estrutural está presente em quase todas as proteínas e ocorre a cada 30-40 resíduos, o que permite que múltiplas moléculas de Hsp70 possam se ligar a uma proteína cliente parcialmente enovelada ou desenovelada (MAYER, 2013). Na estrutura nativa funcional de uma proteína esse motivo estrutural fica voltado para o interior da cadeia polipeptídica. Mas, em momentos como a síntese *de novo* de uma proteína, ou quando elas são desnaturadas essas regiões ficam expostas, o que explica a capacidade das Hsp70 de intervir nos processos celulares citados anteriormente (HARTL; HAYER-HARTL, 2002; MAYER; BUKAU, 2005; SCHLECHT et al., 2011).

Figura 2 – Estrutura tridimensional da Hsp70 e seus domínios. À esquerda em azul está o domínio de ligação de nucleotídeos adenosina (DLN). À direita em bege é mostrado a estrutura cristalográfica do domínio de ligação de proteínas-cliente (DLP), com seus subdomínios α e β em destaque, complexado com um peptídeo substrato. Estes domínios são unidos por um *linker* hidrofóbico. Fonte: Adaptado de (SAIBIL, 2013).

O mecanismo molecular que explica como a Hsp70, ao se ligar a aminoácidos hidrofóbicos expostos, restabelece a estrutura nativa de uma proteína, ou solubiliza agregados, ou auxilia na translocação de uma proteína, ainda não foi esclarecido (MAYER, 2013). Sabe-se, no entanto, que a hidrólise de ATP é essencial para a atividade chaperona de todas as Hsp70 investigadas até o momento (MAYER, 2013) e, de particular interesse para esse projeto de pesquisa, o ciclo de ATP/ADP ligado à Hsp70 altera a afinidade dela pelas proteínas-cliente (Figura 2).

Como mencionado anteriormente, é no domínio DLN que se ligam os nucleotídeos adenosina. Apesar de haver nesse domínio uma atividade ATPásica intrínseca, essa atividade ocorre em velocidades muito baixas (MAYER, 2013). Além disso, uma vez que o ATP tenha sido hidrolisado a ADP, é necessário que ocorra a troca do ADP por ATP para que a proteína cliente seja liberada e o ciclo reiniciado, processo que ocorre também em velocidades muito baixas. É neste contexto que se torna evidente a necessidade das co-chaperonas participarem no ciclo funcional das chaperonas. Com algumas poucas exceções, as Hsp70 trabalham em conjunto (Figura 3) com as co-chaperonas *J-Proteins*, que aceleram a atividade ATPásica (CYR; RAMOS, 2015; DA SILVA; BORGES, 2011; KAMPINGA; CRAIG, 2010; SUMMERS et al., 2009), e com as co-chaperonas pertencentes à classe dos NEFs (Fatores de troca de nucleotídeos), que aceleram a troca de ADP por ATP (BORGES; RAMOS, 2005; DA SILVA; BORGES, 2011; KAMPINGA; CRAIG, 2010; MAYER; BUKAU, 2005).

Figura 3 – Ciclo funcional da Hsp70 com suas co-chaperonas, ligantes e proteína substrato. As Proteínas J aceleram a hidrólise de ATP em ADP e P_i (levando a Hsp70 ao estado de alta afinidade pela proteína substrato) enquanto que as NEFs aceleram a troca de ADP por ATP (levando a Hsp70 ao estado de baixa afinidade pela proteína substrato). Fonte: Adaptado de (MAYER, 2013)

1.4 Mortalina – a Hsp70 mitocondrial

As mitocôndrias são organelas que desempenham processos essenciais nas células eucarióticas. Nesta organela estão localizados os complexos multiproteicos responsáveis pela produção aeróbica de ATP. Além disso, muitas rotas biossintéticas ocorrem em seu interior e existem vias de sinalização celular que podem fazer a mitocôndria responder por meio da apoptose ou da autofagia. Há fortes evidências que sugerem que essa organela evoluiu a partir de uma bactéria que foi capturada por um precursor da célula eucariótica, que incluem: a presença de material genético próprio, e também a organização das membranas em membrana externa e membrana interna, delimitando o chamado espaço intermembranas (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012).

A combinação dos dados de genômica, proteômica e bioinformática mostrou que o conjunto de proteínas total das mitocôndrias compreende mais de 1000 diferentes tipos de proteínas, com alguma variação dependendo do tecido analisado. No entanto, apesar das mitocôndrias possuírem seu material genético próprio, apenas 13 proteínas são codificadas a partir dele (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). O restante é sintetizado no citosol, e deve ser ativamente importado para o seu interior. Esta tarefa é executada por um sistema de

importação proteica em que a mortalina, a Hsp70 mitocondrial de metazoários, atua como um dos componentes centrais (CHACINSKA et al., 2009).

Além da participação ativa no processo de importação proteica, a mortalina também atua nas atividades chaperonas clássicas. Uma vez que a proteína cliente esteja dentro da mitocôndria, a mortalina recruta as Hsp60 para auxiliarem no seu enovelamento correto e, caso seja necessário, ela encaminha as proteínas mal enoveladas para degradação (WADHWA et al., 2005). Estruturalmente, ela possui a mesma organização de domínios das Hsp70: domínio DLN e domínio DLP unidos por um linker (DORES-SILVA et al., 2015a). Funcionalmente, ela necessita das Proteínas J e das GrpEs (uma classe de NEF) para modularem o estado ligado a ATP ou ADP, regulando os processos em que ela participa mencionados anteriormente (D'SILVA et al., 2008, 2003; LIU et al., 2003).

Conforme mostrado na Tabela 1, esta proteína não é encontrada somente na mitocôndria. Embora tradicionalmente tenha sido estudado o seu papel na mitocôndria, estima-se que em torno de 30% do seu conteúdo total é encontrado em outros compartimentos celulares como no citosol e no retículo endoplasmático (KAUL; DEOCARIS; WADHWA, 2007; RAN et al., 2000; WADHWA et al., 1993). Essa grande quantidade de processos e locais em que a mortalina está envolvida demonstra a importância que ela tem para a célula, o que é reforçado ainda mais pelos diversos processos patológicos com os quais ela já foi implicada.

No citosol de células tumorais, por exemplo, foi constatado que a mortalina era capaz de interagir com a proteína supressora de tumores p53 que, dentre outras funções, atua no núcleo em importantes processos biológicos relacionados ao desenvolvimento de tumores como no reparo de DNA, na regulação do ciclo celular e na apoptose (BATES et al., 1998; HUPP; LANE, 1995). Essa interação promove o sequestro da p53 no citosol, impedindo-a de exercer suas funções no núcleo e resultando na immortalização das células (WADHWA; TAIRA; KAUL, 2002). No campo das doenças neurodegenerativas, estudos do proteoma de células modelo ou de pacientes com doença de Alzheimer ou de Parkinson indicaram uma possível conexão dessas doenças com a mortalina. Nestes estudos, foi observado um nível reduzido na expressão desta proteína, além de ser constatado um efeito protetor da neurotoxicidade quando a mortalina era superexpressa nas células modelo (JIN et al., 2006; QU et al., 2011).

1.5 Fatores de troca de nucleotídeos

Como mencionado anteriormente, um passo importante no ciclo funcional das Hsp70 é a dissociação do nucleotídeo ADP do domínio DLN e posterior troca por ATP, evento acelerado pelos Fatores de Troca de Nucleotídeos (NEFs). No genoma humano foram identificadas 4 famílias de NEFs da Hsp70 (Figura 4), que se diferem em termos de estrutura proteica, número de isoformas e localização celular: as Hsp110/Grp170 (4 isoformas) , a família de proteínas BAG (5 isoformas) e as HspBP1/Sil1 (2 isoformas) estão localizadas majoritariamente no citosol, com algumas isoformas no núcleo e também no retículo endoplasmático, enquanto que as GrpEs (2 isoformas) se situam no interior das mitocôndrias (BRACHER; VERGHESE, 2015; DA SILVA; BORGES, 2011).

Figura 4 – As 4 famílias de NEFs identificadas em humanos. As figuras mostram a diversidade de estruturas proteicas que essas famílias exibem. Os NEFs estão em amarelo. Em amarelo está o domínio de ligação a nucleotídeos (DLN) da Hsp70, com seu subdomínio IIB destacado em vermelho. Fonte: Adaptado de (Bracher & Verghese, 2015)

Apesar da não existência de homologia estrutural entre as NEFs (Figura 4), todas elas parecem atuar, na promoção de mudanças conformacionais no NBD, levando-o a um estado

aberto que permite a troca de ADP por ATP, sugerindo um processo de convergência evolutiva.

Essa grande diversidade de NEFs parece permitir a adaptação das Hsp70 para as mais variadas situações e necessidades celulares. Embora não seja descartada a existência de funções redundantes, certas combinações de Hsp70/NEF/Proteína-J podem direcionar a maquinaria de proteção/degradação proteica a um grupo específico de proteínas cliente, permitindo que a célula atenda a demandas específicas de uma localização ou condição celular. Em sintonia com essa hipótese, foi demonstrado que algumas combinações funcionam melhor no processo de enovelamento da proteína Luciferase, enquanto que outras se mostram ineficazes (RAUCH; GESTWICKI, 2014; TZANKOV et al., 2008). Em outro, deleções individuais da HspBP1 ou da Apg-2 (uma isoforma da Hsp110) afetaram a espermatogênese (HELD et al., 2011; ROGON et al., 2014), indicando haver a existência de vias celulares específicas que são afetadas por um determinado grupo de chaperonas e co-chaperonas.

1.6 A co-chaperona GrpE

A co-chaperona GrpE é uma NEF encontrada em bactérias, leveduras, cloroplastos e também nas mitocôndrias de mamíferos (NAYLOR et al., 1998). As GrpEs são homodímeros simétricos quando livres em solução (BORGES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006) e possui uma estrutura quaternária em forma de cruz (Figura 5). Estruturalmente, ela pode ser dividida em 4 regiões: na extremidade N-terminal há uma região não estruturada seguida por uma longa hélice α . Na sequência, a estrutura em hélice α forma um feixe de 4 hélices α na parte superior da cruz, e por fim, na extremidade C-terminal, há um domínio compacto em conformação β .

Figura 5 – Estrutura da GrpE de *Escherichia coli* (EcGrpE). Estrutura tridimensional da proteína EcGrpE (derivada do complexo com a DnaK, PDB 1DKG) mostrando sua estrutura terciária, quaternária e a organização de seus domínios.

Em mamíferos, foram identificadas em suas mitocôndrias duas isoformas da co-chaperona GrpE (NAYLOR et al., 1998), denominadas GRPEL1 e GRPEL2. A sequência de aminoácidos destas duas isoformas em humanos está mostrada na Figura 6, junto com a sequência da GrpE de *E. coli* (EcGrpE).

A razão pela qual duas isoformas estão presentes ainda não está clara. Há indicações de que elas possuem padrão de expressão diferentes (NAYLOR et al., 1998) e que poderiam, por mecanismos como a regulação pós-transcricional, atuarem em diferentes condições celulares. Tradicionalmente, as GrpEs bacterianas têm sido associadas a uma função de termosensora molecular, mas no caso das GrpEs mitocondriais humanas não há evidências de que elas possuem essa mesma função. Trabalhos recentes (ALLU et al., 2018; KONOVALOVA et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2017) indicaram um possível papel no contexto do estresse oxidativo. Mais detalhes serão abordados adiante.

Figura 6 – Comparação da sequência de aminoácidos das proteínas EcGrpE, GRPEL1 e GRPEL2. As letras sombreadas representam regiões conservadas. Fracamente sombreadas: conservação entre somente 2 proteínas. Fortemente sombreadas: conservação entre as 3 proteínas. Os objetos acima das sequências indicam os aminoácidos pertencentes aos domínios mostrados na Figura 5. Alinhamento feito no software Ugene.

1.7 Associação da GrpE com a Hsp70 e o mecanismo de ação

Apesar de se apresentar como um homodímero simétrico quando livre em solução (BORGES et al., 2003), a GrpE se associa assimetricamente com a Hsp70 (Figura 7) (HARRISON et al., 1997). Conforme mostra a Figura 7, o maior ponto de contato entre essas proteínas se situa entre um dos domínios em conformação β da GrpE e o domínio DLN da DnaK.

Figura 7 – Estrutura cristalográfica do domínio DLN da DnaK e sua co-chaperona GrpE. A) Em vermelho: domínio DLN da Hsp70 de *E. coli* (DnaK); Restante: EcGrpE idêntica à Figura 5. Apesar da GrpE ser um homodímero, ela se associa assimetricamente com a DnaK. B) Domínio DLN da DnaK e os seus subdomínios. Em destaque: mecanismo de liberação de ADP promovido pela GrpE. Fonte: A) Adaptado de (HARRISON et al., 1997). B) Adaptado de (BRACHER; VERGHESE, 2015)

O domínio DLN da DnaK possui a forma de uma concha cuja cavidade é o sítio de ligação do nucleotídeo de adenosina. Ele pode ser dividido em 4 subdomínios: IA, IB, IIA e IIB (Figura 7B). O mecanismo de ação da GrpE atualmente aceito é aquele que afirma que o domínio em β -conformação da GrpE se liga ao subdomínio IIB e causa uma abertura mecânica desse subdomínio (Figura 7B), levando o domínio DLN a uma conformação com baixa afinidade por ADP. Nesta situação, o ADP é liberado e o ATP passa a ocupar o seu lugar (BREHMER et al., 2001; DA SILVA; BORGES, 2011; HARRISON et al., 1997).

1.8 A GrpE como termosensora molecular

Um dos modos de regulação da atividade da EcGrpE é executada em nível genético pelo fator de iniciação σ^{32} da RNA polimerase, de tal modo que sua expressão é aumentada em resposta a temperaturas elevadas (GUISBERT et al., 2008). Adicionalmente, foi proposta também a existência de uma regulação da sua atividade funcional associada à mudanças em sua estrutura tridimensional, desencadeada também por mudanças na temperatura (GRIMSHAW et al., 2003).

A análise térmica da EcGrpE revelou que ela desnatura reversivelmente com 2 transições térmicas: uma com T_m em torno de 50 °C, e outra ao redor dos 75 °C (GELINAS et al., 2002; GRIMSHAW et al., 2001). A primeira transição, em 50 °C, foi atribuída à desnaturação das longas hélices α , enquanto que a segunda, em 75 °C, foi atribuída ao desenovelamento do feixe de 4 hélices α e ao domínio em conformação β (GELINAS et al., 2003).

Como a primeira transição inicia-se perto da temperatura fisiológica desta bactéria, em torno dos 37° C, foi proposto que esta proteína funciona como uma termosensora molecular em microrganismos, desencadeando um efeito celular protetivo em resposta a mudanças na temperatura do ambiente (GELINAS et al., 2002). Neste mecanismo as longas hélices α se desestruturariam com o aumento da temperatura, desfavorecendo interações produtivas da GrpE com a Hsp70. Sem o processo de permuta do ADP por ATP o equilíbrio conformacional da Hsp70 se deslocaria para o estado ligado a ADP, fazendo com que ela passasse a atuar como uma segurase, ou seja, ela se manteria com alta afinidade pelas proteínas cliente para impedir a formação de agregados. Com a temperatura do ambiente retornando aos níveis fisiológicos normais, as longas hélices α se restabeleceriam e a proteína cliente seria liberada, podendo se re-enovelar e então retornar às suas atividades normais.

As GrpEs humanas também possuem formato molecular que lembra uma estrutura dimérica cruciforme com a presença das longas hélices alfa (BORGES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, a análise térmica não indicou mudanças conformacionais evidentes e reversíveis na faixa de temperatura fisiológica do humano. Esta observação indica que a região N-terminal das duas isoformas humanas podem ter outra (s) função(ões). Uma possibilidade é que a estrutura cruciforme e alongada das GrpEs seja importante para interagir, ao mesmo tempo, com ambos os domínios da Hsp70, como mostrado para a proteína de *E. coli* (MELERO et al., 2015). Em humanos, esta hipótese precisa ser devidamente comprovada.

1.9 Possível papel das GrpEs mitocondriais humanas em condições de estresse oxidativo

Recentemente foi reportado um possível papel da GRPEL2 na manutenção da atividade da mortalina em condições de estresse oxidativo (SRIVASTAVA et al., 2017). Células tratadas com Arsenito de sódio (NaAsO₂) exibiram uma redução de ~50% na expressão gênica da GRPEL1, enquanto que a da GRPEL2 permaneceu inalterada, o que por sua vez

permitiu que a atividade de importação proteica pela mitocôndria permanecesse ativa (SRIVASTAVA et al., 2017).

Mais recentemente ainda, foi observado que as 2 metioninas (Met44 e Met146) presentes na GRPEL1 são oxidadas na presença de H_2O_2 (ALLU et al., 2018). Entretanto, ao contrário da Met44 (situada na região N-terminal não estruturada) somente a Met146 (situada no feixe de 4 hélices α) tem sua oxidação revertida pela metionina sulfóxido redutase do tipo R. Interessantemente, a estimulação da atividade ATPásica da Hsp70 de levedura (yHsp70/Ssc1), estimulada *in vitro* pela GRPEL1, é perdida quando esta é tratada com H_2O_2 , mas a reversão enzimática desta oxidação faz com que esta estimulação retorne ao nível normal (ALLU et al., 2018). No caso da GRPEL2 um mecanismo de regulação também envolvendo H_2O_2 parece estar presente, mas neste caso envolvendo a cisteína na posição 87 e associado a um processo de dimerização (KONOVALOVA et al., 2018). É possível que a GRPEL2 esteja incluída em um grupo de proteínas contendo ligações dissulfeto alostéricas, um grupo que tem recentemente atraído a atenção de pesquisadores (CHIU; HOGG, 2019). Este grupo de proteínas transita entre diferentes estados conformacionais dependendo do estado redox da sua ligação dissulfeto, e chamam a atenção pelo fato de estarem presentes em compartimentos subcelulares como o citosol e o núcleo, considerados redutores demais para permitirem a formação dessas ligações. Como a GRPEL2 possui mais cisteínas que a GRPEL1 e está localizada dentro da mitocôndria, que também possui um ambiente redutor em condições normais, essa hipótese está sendo explorada.

Estes são dados interessantes pois fornecem algumas pistas para o entendimento da presença de 2 GrpEs na mitocôndria, pois é nesta organela que se situa o sítio principal de formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da célula. Desordens neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer são em parte atribuídas ao acúmulo excessivo de ROS nas células, e possivelmente essas 2 GrpEs, com a emergente figura que vai aos poucos se desenhando, podem desempenhar um papel importante nesses processos. Detalhes moleculares associados ao evento da interação entre as GrpEs e a mortalina, visando aprofundar o conhecimento dessa rede de interações, podem contribuir para o entendimento da presença de 2 isoformas e, em razão disto, motivaram a elaboração do presente projeto de pesquisa. Portanto, dois contextos celulares em que essas proteínas podem estar inseridas

serão estudadas: no contexto da agregação térmica da mortalina e em diferentes estados oxidativos das GrpEs.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos

2.1.1 Gerais

Caracterizar a interação das GrpEs humanas com a mortalina humana para buscar informações bioquímicas e biofísicas que expliquem porque humanos apresentam 2 isoformas da mesma co-chaperona na mesma organela.

2.1.2 Específicos

- Expressar e purificar as proteínas recombinantes mortalina humana, GRPEL1 e GRPEL2 humanas até a homogeneidade conforme protocolos já estabelecidos;
- Atestar a qualidade das amostras produzidas por dicroísmo circular;
- Verificar o estado oligomérico das GrpEs através do *Crosslinking* químico;
- Verificar a presença de estrutura terciária e quaternária das amostras produzidas por cromatografia de exclusão por tamanho analítica;
- Caracterizar a interação molecular das GrpEs humanas com a mortalina humana por *pull-down* e calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- Investigar a influência das GrpEs no processo de agregação térmica da mortalina.
- Investigar a presença de ligações dissulfeto nas GrpEs em diferentes estados oxidativos.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Expressão e purificação das GrpEs humanas recombinantes e da mortalina

As proteínas GRPEL1, GRPEL2 e mortalina foram produzidas conforme descritas anteriormente em Borges *et al.* (2003), Oliveira *et al.* (2006) e Dores-Silva *et al.* (2015), respectivamente, com modificações. Os plasmídeos utilizados foram os mesmos obtidos e estocados durante estes trabalhos. Sucintamente, a GRPEL1 (pET23a::GRPEL1) foi expressa em células de *E. coli* da cepa BL21(DE3) enquanto que a GRPEL2 (pET28a::GRPEL2) foi expressa na cepa pRARE. Ambas foram cultivadas em 37 °C, induzidas com 0,4 mM de IPTG quando a D.O. alcançou um valor entre 0,6-0,8, incubadas *overnight* a 20 °C e coletadas por

centrifugação (10 minutos, 12.000 RCF). A purificação da GRPEL1 (sem His-Tag) foi feita por cromatografia de troca aniônica utilizando-se uma coluna Macro-Prep High Q (Bio-Rad) enquanto que a GRPEL2 (com His-Tag) foi feita por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺. Ambas foram posteriormente submetidas a um passo adicional de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho preparativa utilizando-se uma coluna Superdex 200 pg 16/60 em tampão TKP (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM fosfato de sódio, e 2 mM β-mercaptoetanol).

A expressão e purificação da mortalina (pET28a::mortalina) foi efetuada conforme descrito em Dores-Silva *et al.* (2015). O grau de pureza das proteínas foi estimado por SDS-PAGE com auxílio do software GelQuant.NET (biochemlabsolutions.com), que fornece uma estimativa da quantidade de pixels presentes em uma dada canaleta, usados para o cálculo da pureza. A ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi utilizada para estimar a MM, o coeficiente de extinção molar (ϵ) para proteínas enoveladas, o ponto isoelétrico (pI) teórico e a quantidade de resíduos de aminoácidos cisteína, tirosina e triptofano.

2.2.2 Quantificação das Proteínas

A concentração das proteínas foi determinada utilizando-se o método de Pace (Pace *et al.*, 1995). Basicamente, utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1800 e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, a lei de Beer-Lambert (Equação 1) foi empregada:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equação 1}$$

onde A é a absorbância, ϵ é o coeficiente de extinção molar em M⁻¹cm⁻¹ obtido a partir do ProtParam, c é a concentração em mol/L e l é o caminho óptico em cm.

Para os experimentos de Dicroísmo circular, no entanto, por exigirem um maior grau de exatidão, o método de Edelhock (Edelhock, 1967) foi utilizado. Neste caso, a lei de Beer-Lambert foi novamente empregada. Porém, antes das leituras no espectrofotômetro serem feitas, as proteínas eram desnaturadas em 6M de Guanidina-HCl por 20 minutos. Tal desnaturação expõe possíveis grupos cromóforos que possam estar enterrados no interior da proteína enovelada, aumentando o grau de confiança das quantificações.

2.2.3 Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram conduzidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 utilizando-se uma cubeta com caminho óptico de 0,2 mm. As amostras de proteína foram preparadas em tampão TKP e os dados foram coletados de 195 nm a 260 nm com 50 acumulativas e a uma taxa de 100 nm/min. Os espectros obtidos foram convertidos para elipticidade molar residual utilizando-se a Equação 2.

$$[\theta]_{MRW(\lambda)} = \frac{\theta(\lambda)}{10 \cdot [c] \cdot d \cdot n} \quad \text{Equação 2}$$

onde $\theta(\lambda)$ é a elipticidade em grau ($^\circ$), $[c]$ é a concentração em mol/L, d é a distância do caminho óptico em cm e n é o número de resíduos de aminoácidos.

O software CDNN Deconvolution foi utilizado para estimar o conteúdo de estrutura secundária.

2.2.4 Cromatografia de exclusão por tamanho analítica

O perfil de eluição cromatográfico das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 foi analisado na cromatografia de exclusão por tamanho analítica utilizando-se uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). Foram injetados 100 μ L de cada proteína na concentração aproximada de 30 μ M. O K_{av} (Equação 2) obtido para cada proteína foi então utilizado para se estimar o perfil de estrutura terciária e quaternária destas proteínas a partir da curva de calibração obtido do padrão de MM, utilizando-se como V_0 o padrão de eluição do Blue Dextran. Com esta curva de calibração foi construído um gráfico de $\log MM \times K_{av}$, cuja equação da reta foi utilizada para se obter a massa molecular aparente (MM_{app}) da proteína injetada.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Equação 3}$$

Onde V_e é o volume de eluição da proteína, V_t é o volume total da coluna e V_0 é o volume de eluição do Blue Dextran.

O Raio de Stokes (R_s) e o Raio de Stokes teórico (R_{sph}) dessas proteínas foram obtidos, respectivamente, a partir da equação da reta gerada pelo gráfico de $R_s \times -(\log K_{av})^{1/2}$ e pelo programa Sednterp (www.jphilo.mailway.com). A razão friccional (f/f_0) foi calculada pela

razão entre R_s e R_{sph} . A mistura do padrão de MM continha as seguintes proteínas: Apoferritina (480 kDa – R_s 67 Å), γ -Globulina (160 kDa – R_s 48 Å), BSA (67 kDa - R_s 36,2 Å), Anidrase Carbônica (30 kDa – R_s 23,9 Å) e Citocromo C (12,3 kDa – R_s 14,1 Å).

2.2.5 Crosslinking

O *crosslinking* químico das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 foi efetuado com o uso do reagente suberato de disuccinimidila (DSS). As proteínas foram purificadas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, e 2 mM β -mercaptoetanol e testadas nas concentrações de 5, 10 e 15 μ M, sempre com um excesso de 50 vezes de DSS. A mistura reacional foi incubada por 30 minutos a 25 °C e posteriormente terminada pela adição de 50 mM de Tris-HCl por 15 minutos. Os produtos covalentes gerados foram analisados por SDS-PAGE na concentração de 12%.

2.2.6 Ensaios de Pull-down

Uma alíquota de 2 mL da mortalina com His-Tag (entre 5 e 7 μ M) foi incubada por 30 minutos a 25 °C com 2 mL de GRPEL1 ou GRPEL2 (ambas sem His-Tag e em concentração na faixa dos 15-20 μ M). Posteriormente, essa mistura de proteínas foi injetada em uma coluna de Ni^{2+} HisTrap HP (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5). Após contínuas lavagens com tampão A, foi efetuada a eluição com tampão B (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5). Todo o processo foi efetuado e monitorado por absorvância em 280 nm em um sistema AKTA Prime Plus. Os eluatos foram coletados em frações de 2 mL e as frações de interesse analisadas por SDS-PAGE.

2.2.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Os ensaios da calorimetria de titulação isotérmica foram efetuados em um microcalorímetro iTC200 (GE Healthcare). 18 injeções de 2 μ L da GRPEL1 ou GRPEL2 (entre 75 e 100 μ M) foram adicionadas na mortalina (entre 6 e 8 μ M). Antes das titulações as proteínas foram dialisadas em tampão TKP por 4 horas.

2.2.8 Influência das GrpEs na agregação térmica da mortalina

A influência das GrpEs no processo de agregação térmica da mortalina foi investigada monitorando-se o espalhamento de luz em 340 nm. Para isto, foi usado um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 acoplado a um sistema de controle de temperatura TCC-240A. Em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, alíquotas da mortalina (fixada em 8 μ M) foram incubadas e monitoradas no espectrofotômetro por 80 minutos a 43°C, na ausência e na presença de concentrações crescentes de GRPEL1 e GRPEL2.

2.2.9 Presença de ligação dissulfeto nas GrpEs em diferentes estados oxidativos

Ambas as proteínas GRPEL1 e GRPEL2 foram purificadas em tampão TKP na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol. Em seguida, nas análises por SDS-PAGE, amostras das proteínas (10 μ M) foram misturadas com corantes na presença e na ausência de ditioneitol e imediatamente aplicadas no gel.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Expressão e Purificação das proteínas GRPEL1, GRPEL2 e mortalina

Como ponto de partida para as purificações e análises dessas proteínas, foram estimados alguns parâmetros na ferramenta ProtParam a partir de suas sequências de aminoácidos. Seus valores estão listados na Tabela 2.

Conforme mostrados nos géis da Figura 8, ambas as proteínas GRPEL1 e GRPEL2 puderam ser obtidas solúveis (canaletas 4, 5 e 6) e, conforme estimativas do software GelQuant.NET, com pureza superior a 95% (dados não mostrados). O mesmo foi obtido para a mortalina, de maneira semelhante aos resultados obtidos em trabalhos anteriores (DORES-SILVA et al., 2015b). Em Oliveira *et al.* (2006) foi reportado que a GRPEL2 era obtida solúvel somente em altas concentrações salinas. Nesta condição, experimentos de interação (como o ITC) com a mortalina são inviabilizados pelo fato dela sofrer agregação em altas concentrações salinas. Entretanto, nas purificações atuais ambas as GrpEs puderam ser obtidas solúveis em baixas concentrações salinas, tornando possível, portanto, a tentativa de se caracterizar a interação entre elas.

Tabela 2 – Parâmetros obtidos no ProtParam a partir da sequência de aminoácidos de cada proteína.

Parâmetro	Proteína		
	Mortalina	GRPEL1	GRPEL2
Massa Molecular (MM) ^{*‡}	68759 Da	21467 Da	22121 Da
Coef. de Extinção Molar (ϵ) [§]	20400 M ⁻¹ cm ⁻¹	7450 M ⁻¹ cm ⁻¹	4470 M ⁻¹ cm ⁻¹
Ponto Isoelétrico (pI) [*]	5,44	6,02	6,13
Cisteína (C)	5	3	6
Tirosina (Y)	10	5	3
Triptofano (W)	1	0	0
Ácido Aspártico (D)	40	8	12
Ácido Glutâmico (E)	52	24	22
Histidina (H)	6	5	6
Arginina (R)	29	5	17
Lisina (K)	52	24	14

* considerando as proteínas sem a cauda de His-Tag e sem o peptídeo sinal de encaminhamento para a mitocôndria.

‡ considerando as proteínas como monômeros

§ para proteínas enoveladas (método de Pace)

No caso da mortalina (Figura 8C) a MM aparente corresponde ao valor predito a partir da estrutura primária, enquanto que a das GrpEs não. Esta aparente discrepância pode ser entendida por dois fatores: pela relação logarítmica entre distância percorrida e MM aparente; e pela carga adquirida pelas proteínas. Uma mesma distância (1 cm, por exemplo) medida na metade superior do gel corresponde a uma diferença de MM aparente maior do que essa mesma distância medida na metade inferior. Isto significa que diferenças pequenas de MM aparente são mais perceptíveis na parte inferior, resultando em maiores desvios aparentes.

Em geral, presume-se que no SDS-PAGE a única variável que influencia na distância percorrida é a MM, pois as proteínas são desnaturadas, têm suas ligações dissulfeto reduzidas e adquirem uma mesma relação carga/massa (por conta da ligação do SDS nas proteínas). Enquanto que as duas primeiras condições são geralmente satisfeitas, a terceira (mesma relação carga/massa) nem sempre é verdadeira. Algumas proteínas possuem mais grupos carregados negativamente e/ou menos grupos carregados positivamente (Tabela 2), o que faz

com que o SDS seja repelido ou interaja em menor quantidade. Isto, em consequência, faz com que a carga negativa adquirida pela proteína seja menor, resultando em menores distâncias percorridas no SDS-PAGE, o que pode ter sido o caso observado aqui.

Figura 8 – SDS-PAGE das proteínas GRPEL1, GRPEL2 e mortalina. A) GRPEL1. Canaleta 1: padrão de MM; 2: células não induzidas por IPTG; 3: células induzidas por IPTG; 4: sobrenadante das células sonicadas; 5: GRPEL1 após cromatografia de troca aniônica; 6: GRPEL1 após cromatografia de exclusão por tamanho. B) GRPEL2. 1: padrão de MM; 2: células não induzidas por IPTG; 3: células induzidas por IPTG; 4: sobrenadante das células sonicadas; 5: GRPEL2 após cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} ; 6: GRPEL2 após clivagem com Trombina e CEM. C) Mortalina. 1: padrão de MM; 2: células não induzidas por IPTG; 3: células induzidas por IPTG; 4: sobrenadante das células sonicadas; 5: Mortalina após cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} ; 6: Mortalina após CEM.

Os espectros de CD mostrados na Figura 9 mostram que as proteínas foram obtidas enoveladas. Nota-se que o perfil espectral das 2 proteínas é muito semelhante, exceto na região dos 222 nm. Em um espectro de CD, bandas negativas em 208 e 222 nm são indicadores de estrutura secundária em hélice α (KELLY; JESS; PRICE, 2005). A inspeção dos espectros obtido para essas proteínas revela que apesar das intensidades em 208 nm serem parecidas, em 222 nm a intensidade da GRPEL1 é maior (Tabela 3). Isto indica que ela possui

um conteúdo maior de hélices α , e esta maior quantidade foi confirmada pela deconvolução dos espectros no CDNN Deconvolution (Tabela 4). Estes resultados estão em concordância com os obtidos anteriormente em Borges *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2006), e com isso atestam a qualidade das amostras para que os experimentos posteriores possam ser realizados.

Figura 9 – Espectros de CD das proteínas GRPEL1 e GRPEL2. As proteínas foram analisadas em tampão TKP. Ambos os espectros foram coletados de 195 a 260 nm em uma cubeta com caminho óptico de 0,2 mm. Nota-se que para a proteína GRPEL1 a absorção em 222 nm é mais intensa, um reflexo do seu maior conteúdo de hélices α (Tabela 4).

Tabela 3 – Intensidade das bandas em 208 e 222 nm das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 obtidos no dicroísmo circular. Estas bandas indicam o conteúdo de hélices α presentes nas proteínas, e neste caso indica que a GRPEL1 é mais rica que a GRPEL2 nesse tipo de estrutura secundária.

Proteína	Elipticidade Molar Residual (deg.cm ² /dmol)			
	208 nm	222 nm	208 nm	222 nm
GRPEL1	-16600	-17500	-17000*	-18000*
GRPEL2	-15800	-15700	-16000#	-16000#

*valor aproximado obtido em (BORGES et al., 2003)

#valor aproximado obtido em (OLIVEIRA et al., 2006)

Tabela 4 – Conteúdo de estrutura secundária das proteínas GRPEL1 e GRPEL2, estimadas pelo software CDNN Deconvolution.

Proteína	Estrutura Secundária			
	hélice α	folhas β	voltas β	estrutura randômica
GRPEL1	55%	10%	13%	21%
GRPEL2	50%	10%	14%	26%

Ambas as GrpEs apresentaram um rendimento bom. Para cada litro de meio de cultura foi possível obter aproximadamente 15 mg de proteína pura. As estabilidades delas, no entanto, não foram similares. Por posteriores análises de SDS-PAGE e CD, a GRPEL1 se mostrou enovelada (pelo sinal de CD) e sem sinais de degradação (no SDS-PAGE) por pelo menos 7 dias quando armazenada a 4 °C, enquanto que a GRPEL2 já começava a apresentar sinais de degradação a partir de 48 horas na mesma condição (dados não mostrados).

No caso da mortalina, o rendimento médio foi em torno de 4 mg de proteína para cada litro de meio de cultura. Trabalhos anteriores (DORES-SILVA et al., 2015b) buscaram otimizar sua produção recombinante e já indicavam um baixo rendimento e perda de funcionalidade (medida pela atividade ATPásica) após as purificações. Não houveram tentativas, portanto, de otimizar seu rendimento ou averiguar sua estabilidade em relação ao seu armazenamento. Ao invés disto, buscou-se executar os experimentos envolvendo essa proteína em no máximo 24 horas após sua purificação, visando contornar as dificuldades observadas anteriormente.

2.3.2 *Crosslinking*

Com o *crosslinking* químico foi possível obter pistas sobre o estado oligomérico em que as proteínas se encontravam. Nesta técnica é utilizado um composto, neste caso o DSS, que possui dois grupos em suas extremidades com alta reatividade para aminas primárias. Proteínas possuem, além da extremidade amino-terminal, cadeias laterais como a da Lisina que exibem o grupo amino, e por essa razão tendem a reagir com o *crosslinker*. Diversos produtos têm o potencial de serem formados, mas, em geral, os produtos covalentes gerados tendem a refletir o estado conformacional em que as proteínas se encontravam, pois, como as reações são rápidas, existe uma probabilidade maior que o *crosslinker* reaja com grupos previamente posicionados próximos entre si.

Na Figura 10 são mostradas as imagens do SDS-PAGE com amostras das proteínas antes (sem DSS) e após o *crosslinking* químico. Nota-se que para ambas as proteínas se formaram bandas com o dobro (entre 45 e 66 kDa) da MM de seus monômeros (entre 21 e 31 kDa) em todas as concentrações testadas. Esta é uma indicação de que essas proteínas se organizam como dímeros, pois, como mencionado anteriormente, a reação do *crosslinker* tende a fixar covalentemente as proteínas em seu estado conformacional predominante. Dímeros unidos por interações fracas são solubilizados pelo SDS, enquanto que aqueles unidos por ligações covalentes não. O resultado disto é que a análise das proteínas por SDS-PAGE antes e depois da reação do *crosslinker* resultaram em, respectivamente, bandas com MM de monômero e bandas com MM de dímero. Nas concentrações de 10 e 15 μM foram observadas a formação de bandas com MM maior, acima dos 97 kDa. Ou seja, a partir de 10 μM a aglomeração das proteínas se torna alta o suficiente para que reações espúrias entre os diversos grupos aminos ocorram, formando produtos de alta MM unidos por ligações covalentes.

Figura 10 – SDS-Page das amostras antes e após a adição de DSS. A adição de DSS foi feita em 50x de excesso em relação à concentração de proteína. A mistura reacional foi incubada por 30 minutos a 25 °C e terminada com a adição de Tris-HCl.

2.3.3 Cromatografia de Exclusão por tamanho Analítica

Em adição ao espectro de dicroísmo circular, o perfil de eluição cromatográfico na cromatografia de exclusão por tamanho analítica foi analisado para verificar a homogeneidade das amostras de proteínas purificadas e a estrutura tridimensional geral delas. A ausência de picos adicionais além daqueles presentes em 13,5 mL (Figura 11, em vermelho) e em 14 mL (Figura 11, em preto) indicam que as amostras se mostravam homogêneas, ou seja, as proteínas estão com um alto grau de pureza e somente uma das possíveis formas oligoméricas dessas proteínas está presente.

Na Figura 12 estão os gráficos construídos a partir dos volumes de eluição do padrão de MM, utilizados para calcular os parâmetros hidrodinâmicos mostrados na Tabela 5. Por conta dos resultados obtidos no *Crosslinking* Químico, o R_{sph} usado como referência foi o da forma dimerica. A forte discrepância entre a MM_{app} e a MM obtida a partir da estrutura primária (Tabelas 5 e 6) pode ser entendida pela razão de atrito f/f_0 (calculada pela razão entre R_s e R_{sph}) calculadas. A R_{sph} é estimada à partir da sequência de aminoácidos da proteína, e considera que ela possui formato esférico e que não esteja solvatada. Sendo assim, um valor muito maior do que 1 (obtido por valores de R_s maiores que R_{sph}) indica que a proteína está significativamente alongada e/ou solvatada. Trabalhos anteriores mostraram por cristalografia (HARRISON et al., 1997), por SAXS e ultracentrifugação analítica (OLIVEIRA et al., 2006) Borges et al., 2003) que tanto a GRPEL1 quanto a GRPEL2 possuem formato alongado e são dímeros. Portanto, os valores altos de f/f_0 obtidos aqui podem ser explicados pela presença dessa estrutura terciária e quaternária, corroborando o que foi publicado naqueles trabalhos.

Figura 11 – Cromatograma das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 da cromatografia de exclusão por tamanho analítica. Os picos de absorbância estão normalizados. As setas tracejadas indicam o Volume de Eluição de proteínas de MM conhecidas usadas para calibrar a coluna.

Figura 12 – Gráficos do padrão de MM utilizados para calcular: A) MM_{app} e B) Raio de Stokes (R_s). Proteínas utilizadas para o padrão de MM: Apoferritina (480 kDa – R_s 67 Å), γ -Globulina (160 kDa – R_s 48 Å), BSA (67 kDa – R_s 36,2 Å), Anidrase Carbônica (30 kDa – R_s 23,9 Å) e Citocromo C (12,3 kDa – R_s 14,1 Å).

Tabela 5 – MM e Rsph das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 baseadas na sequência de aminoácidos.

Proteína	Propriedade	Estado Oligomérico			
		monômero	dímero	trímero	tetrâmero
GRPEL1*	MM (kDa)	21	43	64	86
	Rsph (Å)	18	23	27	29
GRPEL2*	MM (kDa)	22	44	66	88
	Rsph (Å)	19	23	27	30

*Ambas sem His-Tag.

Tabela 6 – Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 calculados a partir dos dados de cromatografia de exclusão por tamanho analítica.

Proteína	GRPEL1*	GRPEL2*
MMapp (kDa)	120 ± 20	120 ± 20
Rs (Å)	40 ± 2	41 ± 2
$f/f_0^{\&}$	1,7 ± 0,1 1,95 [#]	1,8 ± 0,1 1,61 ^{\$}

Obtido por AUC em (BORGES et al., 2003)

\$ Obtido por AUC em (OLIVEIRA et al., 2006)

* Ambas sem His-Tag.

& considerando como dímero

2.3.4 Ensaios de Pull-down

Visando validar a interação entre a mortalina e as GrpEs, ensaios de *pull-down* foram realizados. Nesta técnica busca-se demonstrar, de modo qualitativo, que 2 ou mais proteínas de fato interagem entre si. Baseada em princípios semelhantes aos da imunoprecipitação, uma das proteínas é imobilizada em uma matriz (geralmente com a adição covalente de uma “tag” na proteína, e uma matriz que se liga a essa tag), e as possíveis parceiras de interação (desprovidas da tag) são introduzidas e direcionadas a entrar em contato com ela. Verifica-se, então, após uma série de lavagens dessa matriz, se essas candidatas a parceiras de interação ficaram retidas ou não no conjunto matriz e proteína imobilizada. Tomados os devidos cuidados para descartar a possibilidade de que essas candidatas de interação não estejam interagindo com a matriz, conclui-se que, se alguma dessas candidatas forem detectadas juntas com a proteína imobilizada, elas estão ali devido à força de interação entre elas, pois de outra maneira a parceira de interação teria sido eliminada da matriz durante as lavagens.

Uma tag frequentemente utilizada é a cauda de poli-histidina, uma cadeia de 6 resíduos de Histidina que interage fortemente com metais divalentes como o Ni^{2+} , o Cu^{2+} e o Zn^{2+} . Essa interação é altamente específica, o que as torna bastante úteis em purificação de proteínas, e leva a graus relativamente altos de pureza. Devido à facilidade de se remover essa cauda, e aproveitando o fato de que as proteínas purificadas aqui já possuíam essa cauda, a técnica do *pull-down* foi realizada tendo ela como base para a imobilização.

Mais especificamente, a mortalina foi mantida com sua cauda de poli-histidina, enquanto que a GRPEL2 teve a sua clivada. A GRPEL1 foi produzida pelo vetor pET23a, o que significa que a sua produção recombinante não inclui esta cauda, não sendo necessário, portanto, a etapa de clivagem. Em suma, uma resina revestida com Ni^{2+} (o “anzol”) foi utilizada para imobilizar a mortalina a partir de sua cauda de poli-histidina (a “isca”) e as GrpEs sem a cauda foram testadas individualmente para confirmar se representavam, de fato, parceiros proteicos da mortalina (as “presas”).

As Figuras 13 e 14 mostram as imagens do SDS-PAGE das amostras obtidas de cada fração do *pull-down*: fração não ligada (*flowthrough*), fração da lavagem e fração da eluição. Todo o processo foi observado monitorando-se a absorbância em 280 nm, e os cromatogramas obtidos estão mostrados ao lado dos géis. A vantagem de se executar essa técnica monitorando-se os cromatogramas é que ela permite facilmente detectar o momento em que as frações não ligadas foram eliminadas da coluna, que é quando a absorção em 280 nm retorna para o zero. É importante eliminar toda a fração não ligada antes de se proceder com a eluição da proteína imobilizada, pois qualquer remanescente de outras proteínas pode ser interpretado erroneamente como um parceiro de interação.

Para minimizar ainda mais a possibilidade de se detectar falsos positivos, do momento em que a absorbância retornou ao zero em diante foram feitas lavagens com tampão A por 3-4 volumes de coluna. Este tampão contém uma pequena quantidade de imidazol (20 mM) que é suficientemente baixa para não eliminar a proteína imobilizada, mas é suficientemente alta para eliminar eventuais moléculas que, mesmo sem a cauda de poli-histidina, venham a interagir com a coluna.

Levando em conta que existe um espaço limitado de canaletas em cada gel para que as análises no SDS-PAGE possam ser feitas, foram selecionadas amostras representativas de cada uma das etapas do processo. Sendo assim, as canaletas de 1 a 4 de cada gel representam a

fração de moléculas que não se ligaram à coluna. A canaleta 5 representa a fração da última lavagem, ela vem de uma amostra situada em torno de 5 mL de distância anterior ao início da eluição. Por fim, as canaletas de 6 a 9 vêm das amostras eluídas com tampão B. Este tampão contém uma alta concentração de imidazol (500 mM) e sua passagem pela coluna faz com que as proteínas imobilizadas sejam eluídas. Essas canaletas representam, portanto, a fração da eluição.

Figura 13 – Pull-down da mortalina com a GRPEL1. Estão mostradas as imagens do SDS-Page e os cromatogramas indicando a que frações que correspondem cada canaleta. Canaletas 1 a 4: frações equivalentes ao *flowthrough*; Canaleta 5: fração da última lavagem; Canaletas 6 a 9: frações da eluição com tampão B. A seta vermelha indica a canaleta onde as 2 proteínas foram detectadas juntas.

Figura 14 – Pull-down da mortalina com a GRPEL2. Estão mostradas as imagens do SDS-PAGE e os cromatogramas indicando a que frações correspondem cada canaleta. Canaletas 1 a 4: frações equivalentes ao flowthrough; Canaleta 5: fração da última lavagem; Canaletas 6 a 9: frações da eluição com tampão B. A seta vermelha indica a canaleta onde as 2 proteínas foram detectadas juntas.

Pode ser observado uma pequena diferença no perfil cromatográfico do *flowthrough* das proteínas GRPEL1 (pico em 5 mL) e GRPEL2 (pico em 15 mL). Isso significa que por algum motivo a proteína GRPEL2 está interagindo com a coluna, mesmo sem a cauda de poli-histidina. Ela só começou a ser eliminada após o equilíbrio do tampão A, que provavelmente remove a proteína devido à maior concentração de sal (em comparação com o tampão em que a proteína foi purificada) e à pequena quantidade de imidazol que o tampão A possui. É difícil determinar a causa exata dessa interação, mas pode ter sido devido a interações entre o Ni^{2+} e as cisteínas ou histidinas adicionais da GRPEL2. Interações moleculares entre cadeias laterais de aminoácidos e o Ni^{2+} são observadas com a arginina e a lisina, mas as mais comuns e eficientes interações ocorrem com a cadeia lateral de histidinas e de cisteínas (ROWIŃSKA-ZYREK; KOZŁOWSKI, 2017).

Talvez o número maior de histidinas e cisteínas que a GRPEL2 possui (Tabela 7) seja o fator responsável por essa interação observada com a coluna. Nota-se na sequência de aminoácidos da GRPEL2 (Figura 6) que no domínio em β -conformação existe um grupo de histidinas e uma cisteína posicionadas próximas entre si, e que no domínio das longas hélices α existem cisteínas próximas uma da outra e posicionadas na interface de dimerização. Em tese, então, o requerimento para que um complexo de coordenação com o Ni^{2+} seja formado - organização espacial dos ligantes próximos entre si - é atendido. Em relação ao ponto isoelétrico, provavelmente ele não teve grande influência nesse processo de interação já que ele é aproximadamente o mesmo (em torno de 6) para as 2 GrpEs (Tabela 2).

Tabela 7 – Aminoácidos da GRPEL1 e da GRPEL2 mais comuns de interagirem com o Ni^{2+} .

Aminoácido	Proteína	
	GRPEL1	GRPEL2
Histidina	5	6
Cisteína	3	6
Arginina	5	17
Lisina	24	14

Este fenômeno é um alerta para que cuidados sejam tomados durante a execução desse tipo de experimento, pois ele pode impor dificuldades tanto no processo de clivagem da cauda de poli-histidina quanto na calibração da quantidade de lavagens necessárias para o *pull-down*.

Novamente, o monitoramento do processo no cromatograma oferece a vantagem de se poder detectar o momento em que as lavagens foram suficientes. Houveram tentativas de se executar a técnica no modo clássico (com uma resina de Ni^{2+} em microtubos), mas as análises foram inconclusivas devido à interação da GRPEL2 com a resina, dificultando a calibração da quantidade de lavagens e a exibição dos controles.

Das canaletas 6 a 9 de todos os géis estão representadas as frações de eluição obtidas, a etapa final do pull-down. O perfil cromatográfico referente a essas frações tem pouco valor interpretativo, pois a alta quantidade de imidazol tem como consequência uma elevada absorbância, que faz com que qualquer outra contribuição para a absorbância se torne pouco perceptível. De qualquer forma, nos géis é possível observar que ambas as proteínas GRPEL1 (Figura 13A, Canaleta 7) e GRPEL2 (Figura 14A, Canaleta 6), cujas bandas estão um pouco abaixo dos 31 kDa, são detectadas juntas com a mortalina (banda um pouco acima dos 66 kDa). Os controles feitos tanto para a GRPEL1 quanto para a GRPEL2 mostram que nenhuma delas foi retida pela coluna cromatográfica e eluídas pela alta concentração de imidazol. Portanto, estes resultados indicam que, apesar da baixa quantidade de GrpEs detectada devido ao setup experimental qualitativo, ambas as GrpEs são, de fato, parceiras proteicas da mortalina.

2.3.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica que mede diretamente o calor (ΔH) liberado ou absorvido da interação entre dois componentes. Além disso, mede também a estequiometria (n), a constante de dissociação (K_D) e a variação de energia livre (ΔG). Considerando que existe uma relação entre ΔG , ΔH e ΔS , permite calcular também a variação de entropia (ΔS) associada ao evento.

É uma técnica que oferece diversas vantagens na análise de interações moleculares. Pelo fato dela medir diretamente o calor advindo dessas interações, ela não necessita que modificações químicas sejam feitas em nenhum dos parceiros de interação, nem requer que estes possuam alguma propriedade espectroscópica específica para que o processo seja monitorado. O próprio calor é a sonda da interação (FREYER; LEWIS, 2008).

Como mencionado anteriormente, ela permite que o fenômeno da interação molecular seja dissecado em termos da contribuição entálpica e entrópica associados a esse evento. Isso

representa uma vantagem em relação a técnicas que medem somente a afinidade. Do ponto de vista teórico fundamental, o conhecimento da contribuição entálpica e entrópica das interações permite esclarecer questões associadas ao mecanismo dessas interações, como mudanças conformacionais ou mudanças no grau de solvatação. Coletivamente, dados de interações biomoleculares podem fazer emergir padrões de mecanismos de interação associados a um determinado grupo de aminoácidos ou estruturas proteicas. Esses padrões podem ajudar a refinar ou testar modelos teóricos e computacionais, conectando aspectos energéticos com os aspectos estruturais dos parceiros proteicos, que por sua vez podem aumentar o poder de predição da afinidade química à partir de suas estruturas (JELESAROV, 2010). Aplicações desse conhecimento poderão ser encontrados no desenho racional de fármacos, onde intervenções nas interações proteína-proteína ainda foram pouco exploradas (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006).

Existem, entretanto, algumas dificuldades associadas a um ensaio de ITC. Como o calor é a sonda da interação, qualquer aspecto associado a ele pode dificultar uma titulação. Interações de baixa afinidade, por exemplo, por liberarem pouco calor, podem acabar não sendo detectadas. Elas exigirão que a concentração das macromoléculas seja elevada, aumentando a quantidade de amostra exigida para o experimento e trazendo consigo o risco de alguma delas sofrerem agregação. A interpretação dos dados obtidos pode também ser um desafio. Deve-se sempre ter em mente o fato de que o calor é um fenômeno universal, e diversos outros processos como a diluição ou a protonação/desprotonação de grupos ácido-base liberam calor. Além disso, vale lembrar também que muitas proteínas exibem múltiplos sítios de interação e efeitos de cooperatividade, fazendo com que a interpretação dos dados se torne mais complexa. Tomados em conjunto, esses fatores exigirão que diferentes controles sejam feitos, e o tempo de execução do experimento pode se tornar alto.

Infelizmente, como mostra a Figura 15 abaixo, as titulações tanto da GRPEL1 quanto da GRPEL2 com a mortalina não resultaram em termogramas com o calor típico associado a eventos de interação, isto é, exibiram apenas o calor associado ao ruído. Embora mostrados apenas 1 termograma para cada parceiro proteico da mortalina, foram realizadas diversas tentativas em diversas condições diferentes (20, 25 e 30° C e presença do ligante ADP), mas em nenhuma dessas situações os dados do termograma exibiram um perfil claro de interação molecular.

Figura 15 – Termogramas obtidos no ITC. Estão representados testes efetuados a 25 °C. A concentração de mortalina utilizada foi de 5 a 9 μM , enquanto que das GrpEs foi de 70 a 120 μM . Não houveram dados com um perfil de interação molecular claro. A) Mortalina titulada com GRPEL1. B) Mortalina titulada com GRPEL2.

Isto aparentemente contradiz o resultado obtido anteriormente no *pulldown* (de que há interação) mas um resultado negativo no ITC não descarta definitivamente a possibilidade de que um par de proteínas interajam. É possível que eles não representem parceiros de interação, mas, muitas vezes, existem limitações associadas ao *setup* experimental que impedem a detecção da interação e a obtenção dos parâmetros termodinâmicos, por diversas razões. São exemplos: i) a interação não libera/absorve calor suficiente para sensibilizar o equipamento; ii) a interação é lenta e o calor liberado/absorvido é pouco intenso e se confunde com o ruído do sinal; iii) a afinidade nas condições testadas está acima das concentrações testadas.

As razões para uma aparente ausência de interação podem ser diversas. Como mencionado anteriormente, interações de baixa afinidade envolvem uma diferença pequena de entalpia e por isso são difíceis de serem detectadas no ITC. E talvez seja esse o caso para a interação entre as GrpEs e a mortalina. Outra dificuldade pode ter sido imposta também pelo

baixo rendimento da produção recombinante da mortalina e também da sua baixa estabilidade intrínseca. Ambos estes fatores podem impactar o ensaio calorimétrico por conta do período de diálise necessário antes das titulações. Durante esse período uma fração das proteínas pode sofrer agregação e/ou perda de estrutura, diminuindo a fração de moléculas funcionalmente ativa. Combinado com o baixo rendimento de sua produção, isso tende a resultar em diferenças de entalpia pequenas, insuficientes para serem detectados pelo calorímetro.

2.3.6 Influência das GrpEs na agregação térmica da mortalina

Em estudos recentes, foi demonstrado que a mortalina tem a propensão de sofrer agregação em temperaturas próximas do fisiológico (DORES-SILVA, Artigo em preparação). Normalmente, como foi demonstrado naquele estudo, isso é evitado pela ação da proteína hHep1, sendo ela inclusive utilizada como estratégia de co-expressão para que a mortalina possa ser produzida solúvel (DORES-SILVA et al., 2015b). Para testar a hipótese de que as GrpEs poderiam também atuar nesse sentido, ensaios de agregação da mortalina na ausência e presença de concentrações crescentes de GrpEs foram realizados.

Como mostrados na Figura 16, nenhuma das GrpEs parece prevenir a agregação da mortalina. Ao invés disto, pelo menos para o caso da GRPEL1, parece haver apenas um retardo no perfil cinético da agregação. No caso das homólogas de *E. coli* foi constatado que a EcGrpE parecia resgatar a forma monomérica da DnaK (SCHONFELD et al., 1995) à partir de sua forma oligomérica. Isto foi interpretado como uma estabilização da forma monomérica, e não como um processo ativo de desagregação ou sua prevenção. Este parece ser o mesmo caso observado aqui para a GRPEL1. A sua interação com a mortalina provavelmente estabiliza momentaneamente a forma monomérica desta, mas, na medida em que o tempo passa o complexo é rompido e a agregação procede até o seu nível máximo. Por isso, somente um atraso da agregação é observado.

Figura 16 – Ensaios de agregação térmica da mortalina na ausência e presença das GrpEs. A) Avaliação do efeito da GRPEL1. É observado um atraso na agregação da mortalina. A GRPEL1 começa a agregar em concentrações maiores, fazendo com que o sinal se amplifique para além daquilo que é observado para a mortalina isolada. B) Avaliação do efeito da GRPEL2. A GRPEL2 tem uma alta propensão de sofrer agregação, impossibilitando a observação de efeitos semelhantes àqueles observados para a GRPEL1. C) e D) Controles da GRPEL1 e da GRPEL2, respectivamente. Observa-se a alta propensão que GRPEL2 tem de sofrer agregação.

No caso da GRPEL2 um efeito análogo não pôde ser observado. Como mostram os controles (Figuras 16C e 16D) esta proteína já sofre agregação em pequenas concentrações, razão pela qual o sinal na presença de apenas 2μM de GRPEL2 já rapidamente excede o sinal da mortalina sozinha, impossibilitando que interpretações sejam feitas no início do evento de agregação. Isso era esperado, pois, como já havia sido demonstrado (OLIVEIRA et al., 2006), a GRPEL2 é menos estável termicamente que a GRPEL1. À partir dos 40 °C ela já começa a desenovelar, enquanto que a GRPEL1 se mantém estável até aproximadamente 45 °C. Como consequência dessa maior estabilidade a GRPEL1 acabou exibindo uma tendência de agregação menos acentuada. Não obstante, ambas as GrpEs mostraram uma tendência de

agregar quando a proporção estequiométrica delas (considerando o dímero) com a mortalina se aproximava de 1. Por esta razão os ensaios ficaram restritos somente às proporções substequiométricas.

Os dados mostraram que as GrpEs não atuam no sentido de prevenir a agregação térmica da mortalina. A razão de existirem duas GrpEs mitocondriais, portanto, ainda é uma pergunta em aberto. Provavelmente elas não evoluíram para atuar no contexto de um termosensor de estresse térmico, já que a temperatura no interior das células se mantém praticamente constante. Como alguns trabalhos recentemente publicados indicam (ALLU et al., 2018; KONOVALOVA et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2017), é plausível supor que elas atuem em situações de estresse oxidativo, já que o interior da mitocôndria é o sítio principal desse tipo de estresse. Seguindo essa linha de pensamento, estudos preliminares das GrpEs em diferentes estados oxidativos foram iniciados.

2.3.7 Presença de ligações dissulfeto nas GrpEs em diferentes estados oxidativos.

Na sequência de aminoácidos das GrpEs (Figura 6) constata-se que a GRPEL2 possui um número maior de cisteínas que a GRPEL1, que potencialmente podem estar unidas por ligações dissulfeto, principalmente aquelas situadas na interface de dimerização. Para investigar isto, análises por SDS-PAGE de ambas as proteínas (purificadas sem o agente redutor β -mercaptoetanol) foram realizadas na presença e na ausência de ditioneitol (o agente redutor que é adicionado no corante). Os resultados estão na Figura 17 abaixo.

Figura 17 – SDS-PAGE das proteínas GRPEL1 e GRPEL2 em diferentes estados oxidativos. DTT: agente redutor ditioneitol. Setas em azul indicam espécies com mobilidade eletroforética relativa maior, que possivelmente representam cadeias polipeptídicas com ligações dissulfeto intra-moleculares.

Para ambos os casos, observou-se a presença de uma espécie com aparente mobilidade eletroforética maior nas amostras de GRPEL1 e GRPEL2, preparadas na ausência de agente redutor (Figura 17, setas azuis). Espécies com maior mobilidade eletroforética relativa observadas podem ser um indicativo de formação de pontes dissulfeto intra-moleculares. Adicionalmente, como pode ser notado, a GRPEL2 exibiu bandas com o dobro da MM de seu monômero quando aplicada no gel na ausência de um agente redutor (também acompanhada de bandas com mobilidade eletroforética relativa maior). Isto indica que, ao contrário da GRPEL1, os monômeros da GRPEL2 conseguem formar dímeros unidos por ligações dissulfeto, o que levanta novas perguntas acerca de seu funcionamento e sua regulação dentro da mitocôndria. Esta organela contém um ambiente redutor (GO; JONES, 2008) que provavelmente desfavorece a formação de ligações dissulfeto, e a observação de que a GRPEL2 tem o potencial de formá-las aponta para um possível sítio de regulação. O ambiente redutor da mitocôndria é mantido pela alta relação de glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG), mas em situações de estresse oxidativo essa relação pode diminuir (OWEN; ALLAN BUTTERFIELD, 2010). Neste cenário, a baixa disponibilidade de glutathione reduzida poderia favorecer a formação das ligações dissulfeto, e isto por sua vez

poderia promover mudanças na GRPEL2 de tal forma que sua atividade/papel dentro da célula mudasse. Um princípio semelhante poderia se aplicar também para o caso da GRPEL1, mas envolvendo somente modificações intra-moleculares.

Tradicionalmente, as espécies reativas de oxigênio foram sempre estudadas sob a ótica dos danos celulares, mas recentemente tem sido demonstrado que elas atuam em diversas vias de sinalização celular que, em parte, são propagadas por reações de oxidação/redução de cisteínas (MAILLOUX; JIN; WILLMORE, 2014). Portanto, estudos adicionais envolvendo algumas espécies reativas de oxigênio conhecidas, como o peróxido de hidrogênio, a glutatona e o óxido nítrico, podem futuramente ser realizados com as GrpEs e talvez revelem novos mecanismos de regulação, auxiliando na compreensão da existência dessas duas co-chaperonas.

Na possibilidade de que as GrpEs façam parte de um grupo de proteínas com ligações dissulfeto alostéricas (CHIU; HOGG, 2019), é necessário mencionar que os estudos estruturais delas realizados anteriormente (BORGES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006) foram feitos somente em condições redutoras. Mudanças no estado redox da ligação dissulfeto desse grupo de proteínas desencadeiam mudanças em sua conformação, que podem resultar em uma variedade de efeitos, incluindo: mudanças na afinidade da ligação, mudanças na cinética enzimática se a proteína for uma enzima, aumento ou diminuição da susceptibilidade à proteólise e mudanças na propensão de formar homo/hetero-oligômeros (CHIU; HOGG, 2019).

Então, será necessário realizar também toda a caracterização da GRPEL1 e da GRPEL2, em termos de estrutura e estabilidade térmica/química, em condições oxidativas, para esclarecer essas questões. Vale lembrar que em condições redutoras ambas as GrpEs exibem tanto estrutura terciária quanto quaternária, independente da ligação dissulfeto (BORGES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Isto reforça a hipótese de que elas possuem uma ligação dissulfeto alostérica, o que deverá ser investigado por esses estudos. Diferenças estruturais e de estabilidade térmica/química observadas podem contribuir para a descrição de um novo mecanismo de regulação das GrpEs em nível molecular, que em seguida poderá ser complementada por estudos de interação com a mortalina. O ambiente redutor utilizado anteriormente nos testes de ITC pode ser considerado uma causa adicional do insucesso daqueles experimentos, e talvez exibam resultados diferentes em condições oxidativas.

3 CONCLUSÕES

Ambas as proteínas GRPEL1 e GRPEL2 foram expressas e purificadas solúveis e com alto grau de pureza, como evidenciado pelos experimentos de SDS-PAGE. Os espectros de CD indicam que elas foram obtidas enoveladas, com o mesmo perfil espectral e de conteúdo de estrutura secundária obtidos em trabalhos anteriores, isto é, elas se apresentaram com um conteúdo majoritário de estruturas em hélice alfa. Desta vez, no entanto, isto foi alcançado com as proteínas preparadas em tampão TKP, o mesmo tampão utilizado para purificar a mortalina. A presença de estrutura terciária e quaternária dessas proteínas foi verificada pelos experimentos de gel filtração analítica e *crosslinking* químico, respectivamente. Eles revelaram a natureza dimérica e o perfil de estrutura alongada de ambas as proteínas, em acordo com as estruturas cristalográficas e de SAXS publicadas em outros trabalhos. Em condições oxidativas a GRPEL2, ao contrário da GRPEL1, se dimeriza por ligações dissulfeto e, nessa mesma condição, ambas parecem exibir ligações dissulfeto intra-moleculares.

A interação entre a mortalina e as GrpEs foi validada pelos ensaios de *pull-down* em coluna. Nas condições aqui testadas, a interação entre elas não apresentou uma diferença de entalpia razoavelmente elevada, de modo que os ensaios de ITC acabaram não resultando em termogramas com um perfil de interação, possivelmente por causa do *setup* experimental utilizado. Nenhuma das GrpEs preveniu a agregação térmica da mortalina a 43 °C. Há apenas um atraso dessa agregação promovida pela GRPEL1, provavelmente devido a uma estabilização promovida pela interação entre elas. A GRPEL2 exibiu uma alta propensão a agregação e este efeito de atraso da agregação não pôde ser observado. Entretanto, estes experimentos precisam ser repetidos em condições oxidantes para avaliar se a GRPEL2 contendo pontes dissulfeto é capaz de bloquear a agregação da mortalina. Em suma, os testes realizados aqui mostraram que as duas GrpEs mitocondriais representam, de fato, duas co-chaperonas da mortalina. Esforços foram feitos para purificá-las no mesmo tampão da mortalina, com o objetivo de se obter os parâmetros termodinâmicos dessas interações através do ITC, o que não foi possível até o momento.

4 REFERÊNCIAS

ALLU, P. K. et al. A conserved R type Methionine Sulfoxide Reductase reverses oxidized GrpEL1/Mge1 to regulate Hsp70 chaperone cycle. **Scientific reports**, 2018.

BATES, S. et al. **p14(ARF) links the tumour suppressors RB and p53 [5]** *Nature*, 1998.

BATISTA, F. A. H. et al. From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/Hsp90 Network. **Current protein & peptide science**, v. 16, n. 8, p. 735–753, 2015.

BEISSINGER, M.; BUCHNER, J. How Chaperones Fold Proteins. **Biol. Chem.**, 1998.

BORGES, J. C. et al. Free human mitochondrial GrpE is a symmetric dimer in solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35337–35344, 2003.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, 2005.

BRACHER, A.; VERGHESE, J. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, n. April, p. 1–9, 2015.

BREHMER, D. et al. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 5, p. 427–432, 2001.

BROADLEY, S. A.; HARTL, F. U. **The role of molecular chaperones in human misfolding diseases** *FEBS Letters*, 2009.

BURBULLA, L. F. et al. Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: Functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. **Human Molecular Genetics**, 2010.

CHACINSKA, A. et al. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 628–644, 2009.

CHIU, J.; HOGG, P. J. Allosteric disulfides: Sophisticated molecular structures

enabling flexible protein regulation. **Journal of Biological Chemistry**, 2019.

CYR, D. M.; RAMOS, C. H. Specification of Hsp70 function by type and type II Hsp40. **Sub-Cellular Biochemistry**, 2015.

D'SILVA, P. et al. Interaction of the J-protein heterodimer Pam18/Pam16 of the mitochondrial import motor with the translocon of the inner membrane. **Mol Biol Cell**, 2008.

D'SILVA, P. D. et al. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The Molecular Chaperone Hsp70 Family Members Function by a Bidirectional Heterotrophic Allosteric Mechanism. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, n. 2, p. 132–142, 2011.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3702–3710, 2007.

DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein - Hep1 - of *Leishmania braziliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015a.

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. 1–24, 2015b.

FLACHBARTOVÁ, Z.; KOVACECH, B. **Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration** *Acta virologica*, 2013.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. **Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions** *Methods in Cell Biology*, 2008.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. **Mitochondrial form and function** *Nature*, 2014.

GELINAS, A. D. et al. A structure-based interpretation of E. coli GrpE thermodynamic properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 323, n. 1, p. 131–142, 2002.

GELINAS, A. D. et al. Thermodynamic linkage in the GrpE nucleotide exchange factor, a molecular thermosensor. **Biochemistry**, 2003.

GO, Y. M.; JONES, D. P. **Redox compartmentalization in eukaryotic cells** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2008.

GRIMSHAW, J. P. A. et al. Reversible Thermal Transition in GrpE, the Nucleotide Exchange Factor of the DnaK Heat-Shock System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6098–6104, 2001.

GRIMSHAW, J. P. A. et al. Thermosensor action of GrpE: The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

GUISBERT, E. et al. Convergence of Molecular, Modeling, and Systems Approaches for an Understanding of the Escherichia coli Heat Shock Response. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2008.

HARRISON, C. J. et al. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. **Science**, 1997.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. **Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein** *Science*, 2002.

HELD, T. et al. Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis. **Reproduction**, 2011.

HINAULT, M. P.; BEN-ZVI, A.; GOLOUBINOFF, P. **Chaperones and proteases: Cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging** *Journal of Molecular Neuroscience*, 2006.

HUPP, T. R.; LANE, D. P. Two distinct signaling pathways activate the latent DNA

binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

JELESAROV, I. Energetics of Protein – Protein Interactions. In: **Protein-Protein Complexes Analysis, Modeling and Drug Design**. [s.l: s.n.]. p. 46–88.

JIN, J. et al. Proteomic Identification of a Stress Protein, Mortalin/mthsp70/GRP75. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2006.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. **The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity** (*Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010) 11 (579-592))*Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010.

KAUL, S. C.; DEOCARIS, C. C.; WADHWA, R. **Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer***Experimental Gerontology*, 2007.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. **How to study proteins by circular dichroism***Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2005.

KESKIN, O.; MA, B.; NUSSINOV, R. Hot regions in protein-protein interactions: The organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, n. 5, p. 1281–1294, 2005.

KIKIS, E. A.; GIDALEVITZ, T.; MORIMOTO, R. I. Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2010.

KONOVALOVA, S. et al. Redox regulation of GRPEL2 nucleotide exchange factor for mitochondrial HSP70 chaperone. **Redox Biology**, v. 19, n. June, p. 37–45, 2018.

LIU, Q. et al. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. **Science**, 2003.

MAILLOUX, R. J.; JIN, X.; WILLMORE, W. G. **Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions***Redox Biology*, 2014.

MAYER, M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 10, p. 507–514, 2013.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. **Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism** **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2005.

MELERO, R. et al. Modulation of the chaperone DnaK allosterism by the nucleotide exchange factor GrpE. **Journal of Biological Chemistry**, 2015.

MORIMOTO, R. I. **Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging** **Genes and Development**, 2008.

MUCHOWSKI, P. J.; WACKER, J. L. **Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones** **Nature Reviews Neuroscience**, 2005.

NAYLOR, D. J. et al. Evidence for the existence of distinct mammalian cytosolic, microsomal, and two mitochondrial GrpE-like proteins, the co-chaperones of specific Hsp70 members. **Journal of Biological Chemistry**, 1998.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145–1159, 2012.

OLIVEIRA, C. L. P. et al. Low resolution structure and stability studies of human GrpE#2, a mitochondrial nucleotide exchange factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 449, n. 1–2, p. 77–86, 2006.

OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. How many drug targets are there? **Nature Reviews Drug Discovery**, 2006.

OWEN, J. B.; ALLAN BUTTERFIEL, D. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.].

POWERS, M. V. et al. **Targeting HSP70: The second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone?** **Cell Cycle**, 2010.

POWERS, M. V; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Death by chaperone: HSP90,

HSP70 or both? **Cell Cycle**, 2009.

QU, M. et al. Mortalin overexpression attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Brain Research**, 2011.

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 379–404, 2016.

RAN, Q. et al. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000.

RAUCH, J. N.; GESTWICKI, J. E. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

ROGON, C. et al. HSP70-binding protein HSPBP1 regulates chaperone expression at a posttranslational level and is essential for spermatogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, 2014.

ROWIŃSKA-ZYREK, M.; KOZŁOWSKI, H. Nickel Binding Sites - Coordination Modes and Thermodynamics. In: **RSC Metallobiology**. [s.l: s.n.].

RUDDON, R. W.; BEDOWS, E. **Assisted protein folding** **Journal of Biological Chemistry**, 1997.

RÜDIGER, S. et al. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. **EMBO Journal**, 1997.

RÜDIGER, S.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. **EMBO Journal**, 2001.

SAIBIL, H. **Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation** **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2013.

SCHLECHT, R. et al. Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction

with client proteins. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2011.

SCHONFELD, H. J. et al. **The DnaK chaperone system of Escherichia coli: Quaternary structures and interactions of the DnaK and GrpE components** **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The interaction networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania parasites. In: **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**. [s.l.: s.n.].

SRIVASTAVA, S. et al. Regulation of mitochondrial protein import by the nucleotide exchange factors GrpEL1 and GrpEL2 in human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 18075–18090, 2017.

SUMMERS, D. W. et al. **Polypeptide transfer from Hsp40 to Hsp70 molecular chaperones** **Trends in Biochemical Sciences**, 2009.

TZANKOV, S. et al. Functional divergence between Co-chaperones of Hsc70. **Journal of Biological Chemistry**, 2008.

WADHWA, R. et al. Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, 1993.

WADHWA, R. et al. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mtHsp70 and HSP60. **The Biochemical journal**, 2005.

WADHWA, R.; TAIRA, K.; KAUL, S. C. **An Hsp70 family chaperone, mortalin/mtHsp70/PBP74/Grp75: What, when, and where?** **Cell Stress and Chaperones**, 2002.

WANG, X. et al. Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. **Cell**, 2006.

WEIGT, M. et al. PNAS-2009-Weigt-67-72. v. 106, n. 1, 2009.

WODAK, S. J.; JANIN, J. **Structural basis of macromolecular recognition** **Advances**

in Protein Chemistry, 2002.

ZHU, X. et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, 1996.