Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Marcela da Silva Torricillas

Caracterização de domínios da Hsp90 de *Plasmodium
falciparum* e mapeamento da interação com a sua co-
chaperona Aha4

São Carlos

2019

Marcela da Silva Torricillas

Caracterização de domínios da Hsp90 de *Plasmodium falciparum* e mapeamento da interação com a sua co-chaperona Aha4

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, *Milton e Cristiane*, por toda dedicação, amor e compreensão durante toda minha vida, e por nunca medirem esforços para me incentivar a ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Júlio César Borges*, pela orientação, dedicação ao trabalho, disposição e paciência para tirar dúvidas e me ajudar quantas vezes fossem necessárias. Muito obrigada por acreditar em mim e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Às minhas ex-orientadoras, Prof. Dra. *Delia Rita Tapia Blácido* e Prof. Dra. *Rosa dos Prazeres Melo Furriel*, pelos ensinamentos e incentivos para continuar engajada com pesquisa e ciência.

Ao programa de pós-graduação do IQSC pela infraestrutura, corpo docente e funcionários, em especial às meninas da secretaria e da pós-graduação pela paciência e suporte.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais por disponibilizarem a infraestrutura para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida (nº do processo 130530/2017-4) e pelo apoio financeiro das agências de fomento FAPESP e CAPES.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, sou grata por todo acolhimento, ajuda, risadas e cafés compartilhados. Obrigada pela amizade *Amanda, Ana Beatriz* (minha fiel companheira de lab), *Arthur, Carlos, João, Laudimir, Leonardo, Louis, Marcella, Nicole e Silvinha*.

Agradeço em especial à Dra. *Karine Minari*, pela orientação, ensinamentos, conversas e toda paciência desde minha entrada no grupo, foi muito bom trabalhar com você. Obrigada *Noeli e Serginho* pela amizade e convivência, vocês são pessoas incríveis, e não poderia me esquecer do anjo que apareceu na minha vida, *Vanessa Kiraly*, muito obrigada pela amizade, pela preocupação e pró-atividade para ajudar, o mundo precisa de mais pessoas como você.

Ao Dr. *Paulo Roberto*, não somente pela realização dos experimentos de SAXS, mas também pelos ensinamentos e por deixar qualquer ocasião mais alegre e descontraída.

Ao Dr. *Thiago Seraphim*, pelo tratamento dos dados de SAXS e pela disponibilidade e envolvimento no meu projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. *Marcel Tabak* por ceder equipamentos e espaço do seu laboratório para realização de experimentos, agradeço também as meninas *Ana Elisa e Fernanda*.

Às minhas primas *Gabi*, *Duda*, *Tainá* e *Paulinha*, e às minhas amigas de longa data *Laís*, *Larissa*, *Maraiane*, *Rayssa* e *Soraya* que se fizeram sempre presentes e que acreditaram em mim, muitas vezes mais que eu mesma. E também as minhas novas amigas de São Carlos, *Bianca* e *Daiane*, obrigada pelas “gordices” balanceadas com os treinos, pelas conversas e principalmente por tornarem meus dias mais agradáveis e divertidos.

Ao querido *Rafael*, pelo amor, cuidado e por sempre me incentivar a percorrer meus sonhos, você me ensinou que o caminho não é fácil, pois a vida pede iniciativa, e exige muito trabalho e dedicação para alcançar o sucesso. Obrigada por fazer parte da minha história.

À minha querida e amada madrinha, *Neliane*, pela ajuda, apoio e carinho, durante toda minha jornada de estudos, obrigada por se interessar por mim e pelo meu trabalho, e saiba que você é minha maior inspiração.

Aos meus irmãos, *João Gabriel*, *Vinícius* e *Victor* por serem meu alicerce e darem sentido à vida, amo vocês.

À toda minha família, em especial à minha avó, *Maria*, que se enche de orgulho com cada uma das minhas conquistas, você é meu exemplo de força e perseverança.

Obrigada a todos os envolvidos, que contribuíram direta ou indiretamente com meu trabalho, crescimento profissional e pessoal.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

A malária é a doença parasitária mais comum no mundo e é causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.*, sendo transmitida por dípteros do gênero *Anopheles spp.* para hospedeiros vertebrados. Há casos em que espécies de parasitos e vetores adquiriram resistência aos tratamentos e medidas profiláticas, respectivamente, indicando a necessidade de novas formas de controle. Chaperonas moleculares e co-chaperonas são interessantes alvos de estudo para desenvolvimento de terapias mais eficazes, uma vez que estas biomoléculas desempenham papel importante no processo de adaptação e sobrevivência do protozoário. As chaperonas da família Hsp90 participam de vários processos fisiológicos, que não somente auxiliar o enovelamento de proteínas cliente. Cada protômero da Hsp90 é composto por três domínios denominados N, M e C, e a proteína se organiza na forma de homodímeros flexíveis. As co-chaperonas são proteínas auxiliares, essenciais para modulação do ciclo funcional da Hsp90. A co-chaperona Aha1 (do inglês *Activator of the Hsp90-ATPase activity 1*) estabiliza a Hsp90 em um estado conformacional intermediário e estimula a atividade ATPásica da mesma. Neste contexto, é usual a busca por inibidores potenciais diretos e indiretos para Hsp90 e por respostas sobre seu mecanismo de inibição. O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização bioquímica e biofísica da proteína Hsp90 recombinante de *Plasmodium falciparum* (PfHsp90) e construções PfHsp90NM e PfHsp90M, além do mapeamento da interação com a co-chaperona Aha4 de *P. falciparum* (PfAha4). Os experimentos de caracterização estrutural revelam que o domínio N é menos estável termicamente do que o domínio M e também é o mais rico em estrutura secundária do tipo hélice α . A PfHsp90 comporta-se majoritariamente como homodímero alongado e flexível em solução, sendo o domínio C essencial para a dimerização, todavia as construções PfHsp90NM e PfHsp90M comportam-se como monômeros. Ensaio de fluorescência revelaram que as construções exibem diferenças na estabilidade química e que possuem estrutura terciária local com seus triptofanos parcialmente expostos ao solvente. A atividade ATPásica da PfHsp90 foi estimulada por PfAha4, e a interação entre elas foi resolvida com estequiometria de duas moléculas de PfAha4 por dímero de PfHsp90. Tal interação foi entálpicamente dirigida, ocorrendo liberação de moléculas de água, com interação mediada principalmente por contatos hidrofóbicos. O mapeamento das regiões de contato sugere que o cerne da interação ocorra entre a PfAha4 e o domínio M da PfHsp90. As diferenças exibidas pela PfHsp90 com relação as propriedades de proteínas ortólogas podem ter relação com os resíduos de aminoácidos que conectam os domínios N e M em sua estrutura, devido a sua flexibilidade, tamanho e composição.

ABSTRACT

Malaria is the most common parasitic disease in the world and is caused by protozoa of the genus *Plasmodium spp.*, and transmitted by dipterans of the genus *Anopheles spp.* for vertebrate hosts. There are cases in which species of parasites and vectors acquired resistance to treatments and prophylactic measures, respectively, indicating the need for new forms of control. Molecular chaperones and co-chaperones are interesting targets for the development of more effective therapies, since these biomolecules play an important role in the process of adaptation and survival of the protozoan. The chaperones of the Hsp90 family participate in several physiological processes, which not only aid in the folding of client proteins. Each Hsp90 protomer have three domains called N, M and C, and the protein is organized as flexible homodimers. Co-chaperones are assistant proteins, they are essential for modulating the functional cycle of Hsp90. The Aha1 (*Activator of the Hsp90-ATPase activity 1*) co-chaperone stabilizes Hsp90 in an intermediate conformational state and stimulates the ATPase activity thereof. In this context, it is usual the search for direct and indirect potential inhibitors for Hsp90 and for responses about its inhibition mechanism. The objective of this work was the biochemical and biophysical characterization of the Hsp90 recombinant protein of *Plasmodium falciparum* (*PfHsp90*) and *PfHsp90NM* and *PfHsp90M* constructions, as well as to map interactions with the Aha4 co-chaperone of *P. falciparum* (*PfAha4*). Structural characterization experiments show that the N domain is less thermally stable than the M domain and is also the richest in α -helix secondary structure. *PfHsp90* behaves mostly as elongated and flexible homodimer in solution, domain C is essential for dimerization, on the other hand the constructs *PfHsp90NM* and *PfHsp90M* behave as monomers. Fluorescence assays revealed that the constructs exhibit differences in chemical stability and have local tertiary structure with their tryptophans partially exposed to the solvent. The ATPase activity of *PfHsp90* was stimulated by *PfAha4*, and the interaction between them was solved with stoichiometry of two molecules of *PfAha4* by *PfHsp90* dimer. Such interaction was enthalpically driven, releasing water molecules, with interaction mediated mainly by hydrophobic contacts. The mapping of contact regions suggests that the core of the interaction occurs between *PfAha4* and the M domain of *PfHsp90*. The differences exhibited by *PfHsp90* concerning the properties of orthologous proteins may be related to the amino acid residues that connect the N and M domains in its structure, due to its flexibility, size and composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da organização dos domínios em um dímero de Hsp90.	14
Figura 2. Ciclo da Hsp90 com co-chaperonas em levedura	16
Figura 3. Ciclo de vida do protozoário <i>Plasmodium spp</i>	17
Figura 4. Nomenclatura de AHAs	20
Figura 5. Alinhamento das sequências completas de Hsp90 homólogas	32
Figura 6. Gel de agarose 0,8% (A) PCR: Amplificação de fragmento de DNA alvo (B) PCR de colônias.....	35
Figura 7. Análise de restrição do vetor pET28a::PfHsp90NM	36
Figura 8. Monitoramento das etapas de expressão e purificação de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i> em SDS-PAGE.....	38
Figura 9. Monitoramento das etapas de expressão e purificação de <i>PfAha4</i> em SDS-PAGE 15%	39
Figura 10. Caracterização da estrutura secundária por CD	40
Figura 11. Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	42
Figura 12. Cromatografia de exclusão molecular analítica de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	44
Figura 13. Crosslinking químico em SDS-PAGE 12%.....	45
Figura 14. Cromatografia de exclusão molecular analítica de <i>PfHsp90</i> em função da concentração de proteína	46
Figura 15. Análise dos dados de SAXS da <i>PfHsp90</i> e domínios	48
Figura 16. Modelo <i>ab initio</i> gerado a partir das curvas de SAXS para a <i>PfHsp90</i> e construções.	49
Figura 17. Estabilidade química de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	50
Figura 18. Estabilidade térmica por DSC	52
Figura 19. Variação da T_m das proteínas em função da condição experimentada por DSC. ..	54
Figura 20. Estimulação da atividade ATPásica de <i>PfHsp90</i> por <i>PfAha4</i>	56
Figura 21. Interação de <i>PfAha4</i> com as construções de <i>PfHsp90</i> por ITC	58
Figura 22. Variação dos parâmetros termodinâmicos em função da temperatura.....	59
Figura 23. Assinatura termodinâmica da interação entre <i>PfHsp90</i> e construções, com a <i>PfAha4</i> , em 25 °C.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de soluções-tampão utilizadas em procedimentos experimentais.....	23
Tabela 2. Propriedades físico-químicas das proteínas.....	25
Tabela 3. Identidade de sequências entre as Hsp90 homólogas	33
Tabela 4. Caracterização dos <i>linkers</i> de Hsp90 homólogas	34
Tabela 5. Conteúdo de estrutura secundária de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	40
Tabela 6. Informações e conteúdo de estrutura secundária, empregando método STRIDE, para proteínas com modelo estrutural depositado no PDB.	41
Tabela 7. Parâmetros espectroscópicos de <i>PfHsp90</i> , <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	43
Tabela 8. Dimensões da <i>PfHsp90</i> e das construções a partir dos experimentos de SAXS.	48
Tabela 9. Parâmetros de estabilidade química obtidos por fluorescência	50
Tabela 10. Parâmetros de estabilidade térmica obtidos por DSC.....	53
Tabela 11. Parâmetros termodinâmicos da interação de <i>PfAha4</i> com <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\langle\lambda\rangle$: centro de massa espectral, em nanômetros.

ADP: Difosfato de adenosina, do inglês *adenosine di-phosphate*.

AHA: classe de proteínas ativadoras da atividade ATPásica da Hsp90.

Aha1: nome genérico da proteína ativadora da atividade ATPásica da Hsp90, do inglês *activator of Hsp90 ATPase activity-1*.

Aha2: denominação genérica de proteína com dois domínios N-terminais canônicos de Aha1, conectados por um *linker*.

Aha3: denominação genérica da proteína contendo somente o domínio N-terminal canônico da Aha1.

Aha4: denominação genérica da proteína contendo somente domínio C-terminal canônico da Aha1.

APO: referente a parte proteica da proteína ou condição em que a mesma não interage com grupo prostético.

aSEC: cromatografia de exclusão molecular analítica, do inglês *analytical size exclusion chromatography*.

ATP: Trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine tri-phosphate*.

CD: espectropolarimetria de dicroísmo circular, do inglês *circular dichroism*.

C_m: concentração média de agente desnaturante na transição, onde 50% de espécies estão enoveladas e 50% desenoveladas.

Da: dalton, unidade de massa atômica.

D_{máx}: dimensão máxima, em Å.

DSC: calorimetria de varredura diferencial, do inglês *differential scanning calorimetry*.

DSS: disuccinimidil suberato.

EC₅₀: A concentração de um composto em que 50% do efeito máximo é observado.

EMR: elipticidade molar residual média, em graus cm² dmol⁻¹.

EOM: método de otimização de conjuntos, do inglês *ensemble optimization method*.

f/f_0 : razão entre o coeficiente friccional experimental e o coeficiente friccional de uma esfera rígida de igual massa molecular à proteína de interesse.

GgHsp90 α : isoforma α da proteína de choque térmico de 90 kDa de *Gallus gallus domesticus*

GgHsp90 α _N: domínio N de GgHsp90 α .

GndCl: cloridrato de guanidina.

His-tag: motivo estrutural de aminoácidos que tem em pelo menos seis resíduos de histidina.

HsHsp90 α : isoforma α da proteína de choque térmico de 90 kDa de *Homo Sapiens*.

HsHsp90 β : isoforma β da proteína de choque térmico de 90 kDa de *Homo Sapiens*.

HsHsp90β_N: domínio N de *HsHsp90β*.

Hsp: proteína de choque térmico, do inglês *heat shock protein*.

Hsp90: nome genérico da proteína de choque térmico de 90 kDa, do inglês *heat shock protein of 90 kDa*.

IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo.

ITC: calorimetria de titulação isotérmica, do inglês *isothermal titration calorimetry*.

K_A : constante de afinidade ou associação, é recíproca da constante de dissociação.

K_{av} : coeficiente de partição

K_D : constante de dissociação.

K_M : constante de Michaelis-Menten (concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima de uma curva cinética).

k_{cat} : constante catalítica (número de moléculas de substrato convertidos em produto em unidade de tempo por uma única enzima saturada com o substrato).

kDa: quilodalton, equivalente a mil daltons.

LbHsp90: proteína de choque térmico de 90 kDa de *Leishmania braziliensis*.

LbHsp90NM: domínios N e M da proteína *LbHsp90*.

$MgCl_2$: cloreto de magnésio.

M: letra que representa molaridade, concentração molar ($mol.L^{-1}$).

MM: massa molecular.

n: estequiometria da reação em experimentos de calorimetria de titulação isotérmica.

PCR: reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*.

PDB: banco de dados de proteínas, do inglês *Protein Data Bank*.

PDDF: função de distribuição de distâncias da partícula, do inglês *particle-distance distribution function*.

pI: ponto isoelétrico (pH em que a molécula apresenta carga elétrica líquida igual a zero).

Pi: ortofosfato inorgânico.

PfHsp90: proteína de choque térmico de 90 kDa de *Plasmodium Falciparum*.

PfHsp90NM: domínios N e M da proteína *PfHsp90*.

PfHsp90M: domínio M da proteína *PfHsp90*.

R_0 : raio de uma esfera rígida de mesma massa molecular que a proteína de interesse.

R_g : raio de giro, em Å.

R_s : raio de Stokes, em Å.

SAXS: espalhamento de raios-X a baixo ângulo, do inglês *small angle X-ray scattering*.

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*.

STRIDE: ferramenta utilizada para atribuir estrutura secundária de proteínas

SsHsp90 α : isoforma α da proteína de choque térmico de 90 kDa de *Sus scrofa domesticus*

T_m: temperatura média da transição, onde 50% de espécies estão enoveladas e 50% desenoveladas.

Trp: acrônimo de triptofano.

UA: unidades arbitrárias

yHsp90wt: proteína de choque térmico de 90 kDa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), do inglês *yeast*. WT é abreviação de *wild type*, representa a proteína nativa.

yHsp82: nomenclatura comum para a proteína de choque térmico de 90 kDa de levedura.

ΔC_{papp} : variação da capacidade calorífica aparente.

ΔG_{app} : variação de energia livre de Gibbs aparente.

ΔH_{app} : variação de entalpia aparente.

ΔS_{app} : variação de entropia aparente.

ϵ : coeficiente de extinção molar, em mol.L⁻¹ cm⁻¹.

$\lambda_{m\acute{a}x}$: comprimento de onda máximo, em nanômetros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Chaperonas moleculares	12
1.2 Família das Hsp90	13
1.3 A co-chaperona ativadora da atividade ATPásica	15
1.4 Malária	16
1.5 Hsp90 e Aha4 de <i>Plasmodium falciparum</i>	19
1.6 Objetivos.....	21
1.6.1 Objetivos específicos.....	21
2. DESENVOLVIMENTO.....	22
2.1 Material e Métodos.....	22
2.1.1 Clonagem.....	22
2.1.2 Soluções-tampão	23
2.1.3 Expressão e purificação de proteínas	23
2.1.4 Propriedades físico-químicas das proteínas	24
2.1.5 Quantificação de proteínas	25
2.1.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular	25
2.1.7 Fluorescência intrínseca do triptofano	26
2.1.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica	27
2.1.9 <i>Crosslinking</i> químico	28
2.1.10 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	28
2.1.11 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	28
2.1.12 Atividade ATPásica	29
2.1.13 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	30
2.2 Resultados e Discussão	31
2.2.1 Análise Bioinformática.....	31
2.2.2 Subclonagem de <i>PfHsp90NM</i>.....	35
2.2.3 Obtenção de <i>PfHsp90</i>, <i>PfHsp90NM</i> e <i>PfHsp90M</i>	37
2.2.4 Caracterização da estrutura secundária	39
2.2.5 Fluorescência intrínseca do triptofano	42
2.2.6 Caracterização hidrodinâmica e investigação do estado oligomérico	44
2.2.7 Estrutura em baixa resolução.....	47
2.2.8 Avaliação da estabilidade química e térmica	49

2.2.9 Estimulação da atividade ATPásica de <i>PfHsp90</i> pela <i>PfAha4</i>.....	55
2.2.10 Análise termodinâmica da interação entre <i>PfAha4</i> e as construções de <i>PfHsp90</i>	57
3. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes e que exibem grande diversidade de funções biológicas, sendo assim, estão envolvidas no controle de quase todos os processos que ocorrem nas células, portanto são essenciais à vida. Dentre os papéis desempenhados por essa classe de moléculas pode-se citar a sinalização celular, transporte, catálise reacional e componente estrutural (Nelson e Cox, 2014).

Após serem sintetizadas pelos ribossomos, grande parte das proteínas necessita adquirir estrutura tridimensional para tornarem-se funcionais, portanto o enovelamento é um aspecto importante para a fisiologia celular. Tal processo deve ocorrer de maneira espontânea ou com o auxílio de proteínas denominadas chaperonas moleculares, em que a auto-organização estrutural é ditada pela própria sequência de resíduos de aminoácidos (Ramos e Ferreira, 2005; Stravopodis *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2015b; Seraphim *et al.*, 2015).

A homeostase proteica é sustentada por três processos essenciais: síntese, enovelamento e degradação. A etapa de enovelamento ocorre em ambiente onde estão dispersas outras macromoléculas diversas e por vezes em condições de estresse, então é possível que o processo não seja eficaz, ocasionando o incorreto enovelamento proteico e/ou formação de agregados (Bozaykut *et al.*, 2014). As chaperonas moleculares interagem com os estados não nativos de outras proteínas e dão subsídios para que alcancem a conformação adequada e funcional. Eventuais falhas neste sistema podem acarretar a formação de agregados proteicos que estão relacionados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças degenerativas humanas, tais como: Parkinson, Alzheimer, diabetes e câncer (Batista *et al.*, 2015b; Smith *et al.*, 2015). Desta forma, as chaperonas moleculares atuam no controle de qualidade das proteínas, desempenhando papel fundamental para a manutenção da homeostase, evitando a agregação e mal enovelamento. Adicionalmente, quando o enovelamento não é eficaz e a agregação ocorre, algumas chaperonas moleculares podem atuar dissolvendo agregados proteicos e reenovelando as proteínas ou encaminhando-as para proteólise.

1.1 Chaperonas moleculares

Dentre as chaperonas moleculares, existem as proteínas de choque térmico, do inglês *heat shock proteins* (Hsp), que são assim denominadas devido ao aumento na sua produção sob condição de estresse térmico (Wang *et al.*, 2006). Essa classe de proteínas tem a capacidade de interagir e auxiliar outras proteínas, denominadas clientes, na obtenção de sua forma nativa,

garantindo que alterações sejam controladas. A chaperona dissocia-se prontamente após a formação da estrutura funcionalmente ativa da proteína cliente (Schopf *et al.*, 2017).

As Hsp são divididas em cinco famílias principais, sendo que a classificação é feita de acordo com a massa molecular, identidade da sequência de aminoácidos e função exibida pela proteína. As famílias são: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e *small* Hsp (smHsp). O reconhecimento e ligação de proteínas parcial ou totalmente desenoveladas à superfície hidrofóbica das chaperonas moleculares são características comuns à todas as famílias de chaperonas moleculares citadas (Batista *et al.*, 2015b).

1.2 Família das Hsp90

As Hsp90 são chaperonas que exibem massa molecular entre 82-96 kDa, estruturalmente são proteínas diméricas e flexíveis. Cada monômero é composto de três domínios altamente conservados, que diferem especialmente em termos de função, devido as diferenças estruturais entre eles (Krukenberg *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Li e Buchner, 2013; Schopf *et al.*, 2017). Variados processos fisiológicos, não somente assistir e auxiliar o enovelamento de proteínas cliente, são mediados pela ação de chaperonas Hsp90, tais como a transdução de sinal, transporte intracelular e encaminhamento de proteínas cliente para a degradação. Dentre as proteínas cliente de Hsp90 pode-se citar algumas quinases, fatores de transcrição e receptores hormonais esteroides (Picard, 2002; Zhao *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2006; McClellan *et al.*, 2007).

Cada monômero da Hsp90 é composto por três domínios: amino-terminal (N), intermediário (M) e carboxi-terminal (C). O domínio N interage com nucleotídeos adenosina (ATP e ADP), o M é responsável pela hidrólise de ATP e tem sido indicado como o principal sítio de interação com proteínas cliente, e o C é responsável pela dimerização (Prodromou *et al.*, 1997; Buchner, 1999; Scheufler *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004; Ratzke *et al.*, 2010). Em eucariotos, os domínios N e M da Hsp90 são conectados por um *linker*, região extensa, desprovida de estrutura secundária e composta principalmente por resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Hainzl *et al.*, 2009; Tsutsumi *et al.*, 2012). A disposição dos domínios e regiões citadas anteriormente está exemplificada na Figura 1.

Figura 1. Representação da organização dos domínios em um dímero de Hsp90.

Fonte: Adaptado de (Dollins *et al.*, 2007)

Uma característica estrutural importante é observada no domínio N, na região de ligação de ATP há um *loop* contendo resíduos de aminoácidos conservados que formam uma “tampa” (do inglês, *lid*) responsável por fechar-se sobre o bolsão de ligação de ATP. O *lid* apresenta-se aberto durante o estado ligado a ADP (Shiau *et al.*, 2006; Schopf *et al.*, 2017).

Na ausência de ATP, a Hsp90 se mostra num equilíbrio conformacional majoritariamente em conformação aberta em forma de “V” (Figura 1) (Shiau *et al.*, 2006; Dollins *et al.*, 2007). O ciclo da Hsp90 é iniciado pela ligação de ATP, que desencadeia uma série de alterações e rearranjos conformacionais, em seguida o *lid* fecha-se sobre o sítio de ligação, no estado ligado a ATP, direcionando a proteína a estados intermediários. Rearranjos subsequentes promovem a interação e dimerização dos domínios N, que posteriormente acoplam-se aos M, formando o estado fechado (Schopf *et al.*, 2017). Este último estado contempla a hidrólise de ATP, subsequentemente os domínios N se dissociam, ADP e fosfato inorgânico (Pi) são liberados e a Hsp90 retorna ao início do ciclo, em conformação aberta (Meyer *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 2008; Hessling *et al.*, 2009; Hellenkamp *et al.*, 2017).

De maneira geral, Hsp90 é o componente central de uma maquinaria bastante importante, responsável pelo efeito tamponante contra possíveis alterações em proteínas cliente, das quais, grande parte está envolvida em importantes vias celulares (Buchner, 1999; Weikl *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Powers e Workman, 2007; Schopf *et al.*, 2017). Esta maquinaria é regulada, e compreende grande número de cofatores proteicos que se ligam reversivelmente à Hsp90, denominados co-chaperonas. Além disso, a chaperona pode sofrer modificações pós-traducionais, tais como fosforilação e acetilação, que proporcionam outro nível de regulação e influenciam no ciclo de alterações conformacionais, na interação com co-

chaperonas, na comunicação entre os domínios e maturação de proteínas cliente (Mollapour e Neckers, 2012; Li e Buchner, 2013; Schopf *et al.*, 2017).

O sítio de ligação de ATP no domínio N acopla-se ao domínio M ocasionando a hidrólise do nucleotídeo. Todavia, a Hsp90 possui baixa atividade enzimática para esta transformação, ou seja, a chaperona hidrolisa cerca de 0,1 ATP.min⁻¹ em humanos e em levedura (Prodromou *et al.*, 1997; Scheibel *et al.*, 1997; Stebbins *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 2001; McLaughlin *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2008). O direcionamento do ciclo funcional da Hsp90 é impulsionado pela hidrólise de ATP, entretanto, com a evolução as Hsp90 tornaram-se menos dependentes de nucleotídeos e mais dependentes de co-chaperonas, devido à necessidade de aprimorar a regulação do ciclo funcional, esta característica é comumente requerida para proteínas que exercem variadas funções (Mickler *et al.*, 2009; Ratzke *et al.*, 2014).

1.3 A co-chaperona ativadora da atividade ATPásica

As co-chaperonas são uma classe de proteínas especializadas em regular a atividade de chaperonas moleculares. Dentre as variadas funções que podem apresentar, uma delas é a atuação como inibidor ou estimulador da atividade ATPásica, que por consequência influencia no enovelamento da proteína cliente (Batista *et al.*, 2015b). Dentre elas pode-se citar a Aha1 (*Activator of Hsp90 ATPase activity 1*), que é uma proteína ativadora que desempenha papel relevante na estabilização do intermediário no ciclo da Hsp90 (Li *et al.*, 2013; Seraphim *et al.*, 2013; Woodford *et al.*, 2016).

As proteínas Aha1 humana e de levedura são monoméricas e apresentam dois domínios canônicos independentes: N-terminal (N) e C-terminal (C) que são unidos por um *linker*. A interação da Aha1 com a Hsp90 é estabelecida entre os domínios N e M da chaperona e os N e C da co-chaperona através de interações fracas, tais como: interações hidrofóbicas, iônicas, ligações de hidrogênio e dipolos com moléculas de água (Meyer *et al.*, 2004; Schopf *et al.*, 2017). A aceleração das mudanças conformacionais da Hsp90 é uma característica do mecanismo de ativação de Aha1, a qual seria responsável por estabilizar o *estado fechado 1*, intermediário do ciclo da Hsp90 que apresenta os domínios N dos protômeros interagindo um com o outro, tornando o complexo competente para a hidrólise do ATP (Li *et al.*, 2013). Além disso, a Aha1 atua com a Hsp90 na maturação de proteínas quinases e diminui a afinidade da chaperona por inibidores (Chua *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014). A Figura 2 representa o papel da Aha1 no ciclo da Hsp90 atuando em sinergismo com outras co-chaperonas.

Figura 2. Ciclo da Hsp90 com co-chaperonas em levedura. (1) Ocorre ligação de ATP nos sítios presentes nos domínios N de cada protômero da Hsp90, inicialmente em conformação aberta, posteriormente a Sti1 (denominada HOP em eucariotos superiores) é responsável por ocupar um sítio receptor TPR e tem papel importante na estabilização da conformação aberta da Hsp90 e recrutamento de proteínas cliente por Hsp70/Hsp40. (2) A PPIase ocupa o sítio receptor TPR disponível no outro protômero, formando um complexo assimétrico, apto para transferir e ligar a proteína cliente. (3) O efeito sinérgico de Aha1, PPIase e nucleotídeo condiz com a saída de Sti1. A Aha1 acelera a transição para o estado fechado 1 da Hsp90, em que ocorre dimerização dos domínios N e estimula a atividade ATPásica, (4) a Hsp90 passa por espécies transitórias entre os estados fechados 1 e 2, onde a Aha1 é dissociada e o estado totalmente fechado é formado para a associação da p23. (5) A ligação de p23 estabiliza o estado fechado 2 da Hsp90 após expulsar Aha1. (6) Após hidrólise de ATP é liberada a p23, juntamente com a proteína cliente maturada, PPIase, ADP e fosfato inorgânico, e a Hsp90 retorna à conformação inicial.

Fonte: Adaptado de (Li *et al.* 2013b)

1.4 Malária

A malária é a doença parasitária que acomete maior número de pessoas ao redor do mundo, e exibe alto índice de mortalidade: em 2015 foram estimadas entre 438.000 e 631.000 mortes pela doença, comparado ao número de 167.000 mortes em conflitos armados (Gething *et al.*, 2016; Malaria, U.S. Armed Forces 2016, 2017; Phillips *et al.*, 2017). Devido à propagação de casos graves, especialmente aqueles relacionados à espécie *P. falciparum*, faz-se necessário o uso de medidas preventivas e terapêuticas. Entretanto, existem adversidades, pois além da doença ser causada por 5 espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* e disseminada por mais de 40 espécies de dípteros do gênero *Anopheles* com alto índice de difusão, também há casos de resistência por parte de ambos os organismos citados. Há relatos de resistência a agentes químicos por parte do vetor, os insetos gradualmente voltam a popular

as áreas tratadas com inseticidas, sendo que cerca de 77% das regiões tratadas apresentaram este tipo de resistência. Além disso, foram registrados casos de resistência do parasito por fármacos já utilizados em terapias comuns, havendo relatos de pacientes tratados com artemisinina que não reagiram ao tratamento (Phillips *et al.*, 2017).

O ciclo de vida do parasito é complexo, sendo observadas 28 fases. A Figura 3 sintetiza o ciclo de vida do *Plasmodium*.

Figura 3. Ciclo de vida do protozoário *Plasmodium* spp. (1) A infecção do hospedeiro mamífero ocorre com a transferência da forma esporozoítio do parasito através da picada do díptero fêmea do gênero *Anopheles* sp. (2) Após a infecção estes esporozoítios migram para as células do fígado, (3) e se replicam na forma esquizonte. (4) Os merozoítos são então liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, (5) se transformando nas formas trofozoítos imaturos (forma em anel) e (6) trofozoítos. (7) Ocorre nova formação de esquizontes e liberação de merozoítos na corrente sanguínea para (8a) infectar eritrócitos adicionais. (8b) Alguns merozoítos se diferenciam na forma sexuada em gametócitos, que podem ser ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles* sp. e (9) gerar novos esporozoítos.

Adaptado de (Seraphim *et al.*, 2014)

Em humanos, o ciclo de vida tem início quando o vetor infectado pica e transfere, através da saliva, o protozoário na forma esporozoíta para o hospedeiro, e nesta forma os parasitos invadem células do fígado, onde se replicam de maneira assexuada e dividem-se como merozoítos, este estágio é denominado exoeritrocítico. Na sequência os hepatócitos são rompidos e liberam os parasitos na corrente sanguínea para infectar hemácias, iniciando o estágio intraeritrocítico. Nos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos imaturos e a transformação continua para a forma de trofozoítos maduros, fase em que o parasito está mais ativo metabolicamente e então são replicados para formar esquizontes. A forma madura

esquizonte contém muitos merozoítos, e quando rompida libera-os na corrente sanguínea para infecção de outras hemácias. Esta é a etapa sintomática da doença em que o hospedeiro tem picos de febre, o intervalo ocorre entre 36-72 horas, em cada episódio os eritrócitos infectados liberam não somente merozoítos como também grande quantidade de endotoxinas. Uma pequena parte dos merozoítos desenvolve-se de maneira sexuada, eles são diferenciados em gametócitos que são transmitidos para o vetor no momento da picada. No intestino do inseto ocorre a fusão dos gametócitos feminino e masculino para formação de um zigoto diploide, que dá origem a oocinetos capazes de penetrar o epitélio do intestino e gerar oocistos que se dividem para formar inúmeros esporozoítos. Estes, por sua vez, movem-se do abdômen para as glândulas salivares do mosquito, e assim o ciclo se completa (Seraphim *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2017).

O ciclo de vida do *Plasmodium spp.* depende da expressão de inúmeras proteínas próprias e do hospedeiro, as quais determinam sua sobrevivência intracelular e extracelular, a invasão de vários tipos celulares e a evasão das respostas imunológicas (Gomes *et al.*, 2011). Sabe-se que a Hsp90 está relacionada a vários processos e que interage com numerosos e diversos grupos de proteínas, ao menos 10% de todas as proteínas produzidas por uma célula interagem com a chaperona citada (Welch e Feramisco, 1982).

O complexo da Hsp90 está associado à muitas doenças humanas comuns, ou seja, aquelas que exibem mais de 1 milhão de casos por ano no país, dentre as quais estão incluídas as infecções por vírus e protozoários, doenças neurodegenerativas e câncer (Luo *et al.*, 2010; Barrott e Haystead, 2013). Para a malária, a Hsp90 está diretamente relacionada ao desenvolvimento e sobrevivência do protozoário, visto que, ela é responsável pela manutenção da homeostase proteica, sobretudo em condições de estresse, que são comuns ao ciclo de desenvolvimento do parasito e aos sintomas causados ao hospedeiro pela infecção. É comum que em resposta a mudanças de pH, temperatura, espécies reativas de oxigênio e degradação enzimática, o parasito produza proteínas Hsps para permitir então a diferenciação celular e consequentemente a adaptação. O genoma de *P. falciparum* revelou a presença de genes de todas as famílias de chaperonas, sendo que as Hsp90 e Hsp70 são superexpressas sobretudo após a infecção do hospedeiro mamífero e durante episódios de febre (Pavithra *et al.*, 2007; Seraphim *et al.*, 2014).

Dentre todas as formas que o parasito pode se apresentar, o trofozoíto é a forma mais ativa, que se alimenta e reproduz, esta fase representa a maturidade do protozoário e também sua forma mais resistente, e é justamente nela em que a PfHsp90 e outras chaperonas estão superexpressas (Pavithra *et al.*, 2007). O papel central do complexo da Hsp90, que inclui chaperona e co-chaperonas, na sobrevivência do protozoário e em especial na sua fase de maior

resistência a fármacos, coloca estas proteínas como alvos de estudo para o desenvolvimento de terapias para a doença. A produção de proteínas funcionais e necessárias para o parasito, mesmo em condições adversas, é permitida devido ao tamponamento das mesmas pela Hsp90, esta família de chaperonas é altamente conservada, o que implica em interações pouco seletivas com inibidores, e justifica também o estudo e mapeamento da interação com co-chaperonas como ponto chave para a regulação (Rutherford e Lindquist, 1998).

Atualmente, têm sido desenvolvidos estudos a respeito de inibidores potenciais diretos (ligam-se a chaperona) e indiretos (ligam-se a co-chaperonas ou complexo) para Hsp90, e respostas sobre seu mecanismo de inibição. Foram identificadas moléculas que inibem seletivamente *HsHsp90 α* , isoforma α da Hsp90 humana, frente a *PfHsp90*, resultado que sugere a existência de diferenças estruturais entre as duas proteínas apesar do alto percentual de identidade entre elas, cerca de 70%, todavia não aponta um potencial fármaco para o tratamento de malária, demonstrando que estudos nesta área ainda precisam ser desenvolvidos (Garg *et al.*, 2016; Posfai *et al.*, 2018).

1.5 Hsp90 e Aha4 de *Plasmodium falciparum*

A Hsp86 de *P. falciparum*, mencionada como *PfHsp90*, é uma proteína da família das Hsp90 de 86 kDa (Corbett & Berger, 2010; Silva *et al.*, 2018), sendo a única da família encontrada no citoplasma do protozoário. Além disso, o genoma de *P. falciparum* codifica ainda três proteínas parálogas da Hsp90, que são a *PfGrp94*, *PfTrap-1* e *PfTrap*, que estão localizadas no retículo endoplasmático, mitocôndria e superfície do esporozoíto, respectivamente (Frey *et al.*, 2007; Pavithra *et al.*, 2007; Pihlajamaa *et al.*, 2013). A *PfHsp90* exibe diferenças pronunciadas com relação ao *linker* que conecta os domínios N e M de cada protômero, a região é mais alongada e carregada do que em proteínas ortólogas e parálogas. Apesar desta conexão entre domínios não influenciar na viabilidade dos organismos, tem especial importância na flexibilidade necessária para os rearranjos entre os domínios, atividade chaperona, interação com proteínas cliente, desempenho do mecanismo de ação de co-chaperonas, além de influenciarem na dimerização dos domínios N e por consequência na atividade ATPásica. Estudos revelam que yHsp90wt exibe diferentes propriedades quando tem o *linker* substituído pelo da *PfHsp90*, a proteína mutante exibe maior sensibilidade a temperatura, menor interação com proteínas cliente e atividade ATPásica menos eficiente, estas características exprimem que a proteína de *P. falciparum* se diferencia das proteínas ortólogas pois contém uma região com

propriedades exclusivas, responsável por controlar a maquinaria da chaperona (Hainzl *et al.*, 2009; Tsutsumi *et al.*, 2012).

A forma canônica *PfHsp90* e duas construções (*PfHsp90NM* e *PfHsp90M*) foram alvos de estudo deste projeto de pesquisa como via de analisar os domínios como regiões autônomas e com relação à função e à interação com outras proteínas.

O genoma de *P. falciparum* apresenta genes que expressam diversas co-chaperonas, as quais podem ser estudadas com relação à interação com a Hsp90, pois são responsáveis pela regulação do ciclo funcional. O *P. falciparum* não apresenta um gene para a forma canônica da Aha1. Entretanto, o gene de uma co-chaperona ativadora da atividade ATPásica de *PfHsp90* é encontrado no genoma de *P. falciparum* (denominada aqui como *PfAha2*). A estrutura desta proteína já se encontra elucidada e depositada no PDB (código 3N72) e indica a presença de dois domínios N-terminais canônicos, um localizado na extremidade N-terminal e outro na extremidade C-terminal, conectados por uma região de *linker*. Além da Aha1 canônica e da Aha2, outros organismos apresentam a Aha3 (também chamada de Hch1), que corresponde somente ao domínio N-terminal e a Aha4 correspondente ao C-terminal canônico (Figura 4). Interessantemente, o genoma de *P. falciparum* apresenta um gene para a Aha4 (aqui denominada de *PfAha4*) que também tem estrutura tridimensional depositada no PDB sob o código 3NI8. Apesar da *PfAha2* e *PfAha4* terem suas estruturas tridimensionais determinadas e depositadas no PDB, não existem dados da caracterização funcional e da interação destas proteínas com a *PfHsp90*.

Figura 4. Nomenclatura de AHAs. Esquema baseado em proteínas de levedura (yAha1 e yAha3) e de *P. falciparum* (*PfAha2* e *PfAha4*) com respectivos códigos PDB.

Fonte: Autoria própria.

1.6 Objetivos

Este trabalho de dissertação de mestrado teve como objetivos caracterizar estruturalmente a *PfHsp90* e duas construções contendo seus domínios NM e M. Também foi objetivo compreender os mecanismos de interação das duas construções da *PfHsp90* com a *PfAha4* além do efeito desta sobre a atividade ATPásica da *PfHsp90*.

1.6.1 Objetivos específicos

- A. Identificação e análise das sequências de aminoácidos de *PfHsp90* e das construções *PfHsp90M* e *PfHsp90NM*;
- B. Subclonagem de *PfHsp90NM* em vetor de expressão pET28a;
- C. Produção e purificação das proteínas *PfAha4*, *PfHsp90M*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90* recombinantes;
- D. Caracterização de elementos de estrutura secundária e terciária da *PfHsp90M*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90*;
- E. Avaliação do estado oligomérico da *PfHsp90M*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90*;
- F. Caracterização da estabilidade química e térmica da *PfHsp90M*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90*;
- G. Determinação da estrutura em baixa resolução da *PfHsp90*, *PfHsp90M* e *PfHsp90NM* e a dinâmica dos domínios em solução;
- H. Avaliação da funcionalidade de *PfAha4* na estimulação da atividade ATPásica de *PfHsp90*;
- I. Avaliação da interação de *PfHsp90M* e *PfHsp90NM* com a co-chaperona *PfAha4*;

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Clonagem

A identificação das sequências de nucleotídeos relativas às construções *PfHsp90M* e *PfHsp90NM* foi realizada com o auxílio do banco de dados *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e do programa que identifica as regiões correspondentes aos domínios *Smart Protein* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Adicionalmente foi realizado o alinhamento global via *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A proteína completa *PfHsp90*, denominada *Heat Shock Protein 86*, tem código de acesso XP_001348998.1 no banco de dados do NCBI. O plasmídeo pET28a::*PfHsp90* (Silva *et al.*, 2018) foi utilizado como molde para as construções pET28a::*PfHsp90M* e pET28a::*PfHsp90NM*.

O vetor de expressão pET28a::*PfHsp90M* foi obtido previamente por ex-integrantes do grupo (Dr. Thiago Vargas Seraphim e Srta. Marina de Matteu Alves). O vetor pET28a::*PfHsp90NM* foi obtido por subclonagem, sendo que a sequência de 1698 pb foi amplificada por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) a partir do vetor pET28a::*PfHsp90* pelo uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos, denominados *primers*. O *primer* direto foi o T7 Promoter (Invitrogen), pois na sequência do DNA molde já existia um sítio de reconhecimento para *Nde* I. O *primer* reverso foi desenhado com sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Sac* I. Os oligonucleotídeos foram:

T7_Pro (F): 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

PfHsp90M_C (R) (*Sac*I): 5' CATCAATATGAGCTCATTCTTTGGTAC 3'

(*) A região em destaque é referente aos nucleotídeos do sítio de restrição.

Para a PCR foi utilizado *Phusion High Fidelity PCR Master Mix 2x* (Thermo Scientific). Os reagentes foram combinados de modo a garantir concentrações finais de 200 pg.µL⁻¹ para o DNA molde (pET28a::*PfHsp90*), 0,5 µmol.L⁻¹ de cada primer, 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 200 µmol.L⁻¹ de cada dNTP e 1 U de *Phusion High Fidelity DNA polymerase*. A reação aconteceu à 98 °C por 30", depois foram 35 ciclos de: 98 °C por 10" (desnaturação), 51 °C por 30" (anelamento) e 72 °C por 45" (extensão), ao final dos ciclos foi feita uma única etapa de 72 °C por 10'.

Ao produto de PCR foi adicionado 6x *Gel Loading Dye* (Fermentas) e este foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v) preparado em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mmol.L⁻¹ e EDTA mmol.L⁻¹, pH 8,0). O gel foi corado em solução de EtBr (Brometo de Etídio), o padrão utilizado

foi o *GeneRuler 1 kb* (Thermo Scientific). A sequência amplificada foi purificada utilizando *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen) e posteriormente inserida em pET28a, sendo que o vetor e o fragmento de DNA foram previamente digeridos com as enzimas de restrição *Nde I* e *Sac I*, e ligados empregando T4 DNA ligase (Thermo Scientific) a 26 °C por 1 hora.

Após a clonagem foram realizadas as análises de restrição, PCR de colônia e sequenciamento para o plasmídeo pET28a::*PfHsp90NM*, visando averiguar a fidelidade e sucesso do procedimento de clonagem. As construções para *PfHsp90M* e *PfHsp90NM* resultam em proteínas de 256 e 566 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

2.1.2 Soluções-tampão

As soluções-tampão empregadas, para obtenção e caracterização das proteínas, foram identificadas e organizadas em composição e propósito na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação de soluções-tampão utilizadas em procedimentos experimentais.

Solução-tampão	Composição	Propósito de uso
A	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, EDTA 1 mM	Lise bacteriana
B	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM	Lavagem da coluna na cromatografia de afinidade
C	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM	Eluição das proteínas na cromatografia de afinidade
D	Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), KCl 100 mM β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM	Cromatografia de exclusão molecular
E	Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), KCl 500 mM β -mercaptoetanol 1 mM	Cromatografia de exclusão molecular analítica
F	HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 100 mM	Ensaio de Atividade ATPásica
G	HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 5 mM	Ensaio de interação por ITC

2.1.3 Expressão e purificação de proteínas

As proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM*, *PfHsp90M* e *PfAha4* recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21(DE3), sendo que a *PfHsp90* foi produzida conforme descrito em (Silva *et al.*, 2018). Resumidamente, as células foram transformadas via choque térmico e cultivadas em meio LB (*Lysogeny broth*) suplementado com ágar (5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona e 10 g.L⁻¹ de NaCl com pH 7,0), e as placas foram incubadas a 37 °C durante 16-18hrs. O pré-inóculo foi preparado pelo inóculo de uma colônia das células transformadas em 25 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina em concentração de 30 μ mol.L⁻¹, esta preparação foi incubada entre 16-18 horas a 37 °C. Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído em meio a 5% (v/v), considerando o volume final de 500 mL de meio LB. Esta cultura foi incubada a 37 °C até o crescimento bacteriano atingir DO_{600nm} $\approx$ 0,6. A indução

da expressão ocorreu pela adição de IPTG em concentração de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, a temperatura de 30°C durante 4 horas para *PfHsp90M* e também para *PfAha4*, e 20°C por 18 horas para a *PfHsp90* e para a *PfHsp90NM*. Ao fim deste período as células foram colhidas por centrifugação ($13600 \times g$, 4°C , 15 min) e posteriormente foram ressuspensas em 30 mL de tampão A com adição de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ lisozima e 5 unidades de DNase, a mistura foi submetida à sonicação em banho de gelo para obtenção do lisado celular (amplitude de 35%, pulsos de 6 s intervalados por 1 min). O lisado celular foi então centrifugado a $43200 \times g$, 4°C por 40 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore).

A purificação das proteínas ocorreu em duas etapas, primeiramente foi empregada a cromatografia de afinidade ao níquel em coluna *HisTrap Chelating HP 5mL* (GE Healthcare Lifesciences) equilibrada em tampão B, com eluição de proteínas em tampão C. A *PfAha4* teve cauda His-tag clivada com trombina (Sigma) em tampão B, sob diálise *overnight* a 4°C , posteriormente foi realizada etapa adicional de cromatografia de afinidade ao níquel, em que a proteína *PfAha4* sem cauda foi eluída em tampão A, o processo foi monitorado em AKTA Prime. Para a segunda etapa de purificação foi utilizada a cromatografia de exclusão molecular preparativa empregando a coluna Superdex 200 16/60 ou 26/60 (GE Healthcare Lifesciences) equilibrada em tampão D. A eficiência e o grau de pureza das amostras foram confirmados por meio de análises eletroforéticas em condições desnaturantes em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10 a 15% mediante massa molecular da proteína, conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R.

2.1.4 Propriedades físico-químicas das proteínas

Foram calculados os parâmetros físico-químicos das proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM*, *PfHsp90M* e *PfAha4* a partir das sequências de aminoácidos pelo programa *Sednterp* (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas das proteínas.

Proteína	$\epsilon_{280\text{nm}}$ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) <i>Edelhoc</i>	$\epsilon_{280\text{nm}}$ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) <i>Pace</i>	MM (kDa)	pI	Nº de aminoácidos	W*	Y*	C*
<i>PfHsp90</i> [‡]	64150	66810	88,3	5,30	765	7	19	7
<i>PfHsp90NM</i> [#]	50210	53830	68,1	5,21	586	5	17	5
<i>PfHsp90M</i> [#]	29870	31400	32,5	7,68	276	3	10	4
<i>PfAha4</i>	24750	25440	16,4	7,22	143	3	6	2

[#]Os valores calculados para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* consideram proteína com His₆-tag (20 aa ≈ 2,2 kDa)

*Referente ao número de resíduos de triptofano (W), tirosina (Y) e cisteína (C).

[‡]Ensaios com *PfHsp90* descritos na literatura por uma integrante do grupo (Silva *et al.*, 2018)

Fonte: Autoria própria.

2.1.5 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi determinada por espectroscopia de absorção molecular em condições desnaturantes, para eliminar interferências na absorção de luz pelos triptofanos e tirosinas, devido ao ambiente em que se encontram na estrutura compacta da proteína enovelada. A proteína foi diluída 5 vezes em solução de cloridrato de guanidina 7,5 mol.L⁻¹ e fosfato de sódio 25 mmol.L⁻¹ (pH 6,5), e incubada durante 30 minutos antes da leitura (Edelhoc, 1967). O espectro de absorbância foi coletado entre os comprimentos de onda 320 a 250 nm, e para cálculo da concentração foi aplicada a lei de Lambert-Beer a 280 nm (Equação 1).

$$A = C \times l \times \epsilon \quad \text{Equação 1}$$

Na equação A é a absorbância em unidades arbitrárias, C é a concentração (mol.L⁻¹), l é o caminho óptico (cm), e ϵ é o coeficiente de extinção molar em (mol⁻¹.L.cm⁻¹) (Tabela 2).

2.1.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

Os experimentos de CD foram realizados utilizando o espectropolarímetro Jasco *J-815* acoplado a um *peltier* e banho térmico para controle de temperatura. Para investigação da estrutura secundária foram obtidos os espectros da *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* em concentrações que variaram de 2,5 a 15 µmol.L⁻¹, dependendo da intensidade de sinal obtida. As diluições foram realizadas em tampão D e as leituras foram feitas em cubeta com caminho óptico de 0,1 cm.

Para todas as análises o sinal de CD foi convertido para Elipticidade Molar Residual ($[\theta]_{EMR}$) mediante Equação 2:

$$[\theta]_{EMR} = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10 \cdot [c] \cdot l \cdot nR} \quad \text{Equação 2}$$

onde, $\theta_{(\lambda)}$ é o sinal de CD em elipicidade, nR é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, $[c]$ é a concentração de proteína em mol.L⁻¹, e l é o caminho óptico em cm.

Posteriormente foi feita a deconvolução do espectro normalizado pelo uso do *software* CDNN *Deconvolution*, como via de estimar a percentagem relativa de estruturas secundárias presentes nas proteínas (Böhm *et al.*, 1992).

2.1.7 Fluorescência intrínseca do triptofano

Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência, resíduos de triptofano (Trp) foram utilizados como sondas intrínsecas. Os espectros de fluorescência foram coletados de 298-420 nm e 305-420 nm empregando comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm, respectivamente. O equipamento utilizado foi o Fluorímetro F-4500 (Hitachi), e para todas as preparações as proteínas estavam em concentração de 5 µmol.L⁻¹ em tampão D, sendo analisadas em duas condições: na presença e na ausência de desnaturante, neste caso, cloridrato de guanidina a 6 mol.L⁻¹ (GndCl).

A estabilidade química das proteínas foi avaliada utilizando concentração fixa de 5 µmol.L⁻¹ de *PfHsp90*, e 10 µmol.L⁻¹ de *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. Os ensaios foram realizados individualmente para cada proteína, empregando concentrações crescentes de ureia. As amostras foram preparadas em tampão D em placa Microlon 96 poços (Greiner), incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente e excitadas a 295nm; os espectros foram coletados em equipamento Varioskan™ LUX 3020-197 (Thermo Fisher Scientific). Após a coleta, os dados foram tratados para obtenção do centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$) (Equação 3).

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i \cdot F_i}{\sum F_i} \quad \text{Equação 3}$$

onde, λ_i é o comprimento de onda e F_i a intensidade de fluorescência neste ponto. O $\langle \lambda \rangle$ foi calculado para a faixa espectral entre aproximadamente 300 e 420 nm, como previamente descrito em (Seraphim *et al.*, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata experimental e repetidos para replicatas biológicas. Os ajustes para os experimentos de desenovelamento químico foram realizados pelo programa OriginPro 2016 empregando a função de Boltzmann, para uma única transição, ou Double Boltzmann, no caso de duas transições, e assim foi obtido o valor de C_m , referente a concentração de agente desnaturante no ponto médio da transição.

2.1.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica

A cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC) foi realizada segundo (Silva *et al.*, 2013). Foi empregada coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Lifesciences) equilibrada com o tampão E, e acoplada a um Äkta Prime Plus (GE Healthcare Lifesciences), as proteínas PfHsp90, PfHsp90NM e PfHsp90M foram injetadas individualmente em concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Como padrão foi empregada uma mistura de proteínas globulares com raios de Stokes (R_s) e MM conhecidas, em concentração de aproximadamente 1 mg.mL^{-1} cada. As proteínas empregadas na mistura foram: Apoferritina (480 kDa – R_s 67 Å), γ -globulina (160 kDa – R_s 48 Å), Albumina Sérica Bovina - BSA (67 kDa – R_s 36 Å), Anidrase Carbônica (30 kDa – R_s 24 Å) e Citocromo C (12,3 kDa – R_s 14 Å) (Sigma–Aldrich). O volume da fase móvel (V_0) da coluna foi determinado pela eluição de blue dextran 1 mg.mL^{-1} (Sigma).

O tratamento dos dados é baseado em cálculos simples e modelos matemáticos de regressão linear, a partir dos volumes de eluição pode-se calcular o coeficiente de partição (K_{av}) utilizando a Equação 4, e a identificação dos volumes ocorre a partir da análise do perfil cromatográfico das proteínas.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Equação 4}$$

onde, V_e é o volume de eluição da proteína, V_0 é o volume da fase móvel e V_t é o volume total da coluna (24 mL).

A determinação da massa molecular aparente (MM_{app}) é proveniente do gráfico K_{av} versus $\log(MM_{padrão})$, e o valor de R_s a partir do gráfico R_s versus $-\log K_{av}^{1/2}$. Pode-se ainda determinar a razão friccional (f/f_0) para cada proteína a partir da Equação 5.

$$\frac{f}{f_0} = \frac{R_s}{R_0} \quad \text{Equação 5}$$

Onde, R_s é o valor experimental e R_0 é o valor teórico fornecido pelo Software *Sedenterp*.

Para obtenção da constante de dissociação do dímero de PfHsp90 (K_{Dapp}) foram realizados ensaios de aSEC conforme reportando em (Silva *et al.*, 2013), empregando diferentes concentrações da proteína, de 0,1 a 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com posterior avaliação dos cromatogramas com relação ao volume de eluição. Para determinação de K_{Dapp} foi empregado o modelo DoseResp, representado pela equação 6.

$$t_R = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log K_{Dapp}) \cdot p}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, t_R é o tempo de retenção em minutos, A_1 é a assíntota inferior, A_2 é a assíntota superior, $\log K_{Dapp}$ é o centro, e p é o parâmetro que indica a inclinação da curva.

2.1.9 Crosslinking químico

Os ensaios de *crosslinking* químico foram procedidos com utilização do *crosslinker* disuccinimidil suberato (DSS), agente responsável pela formação de ligações cruzadas que permitem verificar a dimerização das proteínas, segundo Coto *et al.* (2018). As proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* foram preparadas a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio 25 mmol.L^{-1} (pH 7,4) contendo NaCl 100 mmol.L^{-1} e β -mercaptoetanol 1 mmol.L^{-1} . As proteínas foram incubadas com 50x de excesso molar de DSS nos tempos de 5, 15 e 30 min, as reações foram interrompidas pela adição de tampão Tris-HCl (pH 8,0) em concentração final de 50 mmol.L^{-1} . Após 15 min, as amostras foram coradas e submetidas a SDS-PAGE a 12%.

2.1.10 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os experimentos de DSC foram realizados utilizando o calorímetro Nano DSC (TA Instruments), a técnica permite estimar transições conformacionais e analisar a estabilidade térmica das proteínas (Gill *et al.*, 2010). Os principais parâmetros que podem ser determinados são: temperatura de *melting* (T_m), a variação da entalpia de desnaturação (ΔH) e também a variação da capacidade calorífica (ΔC_p).

Foi avaliada a estabilidade térmica das proteínas na ausência e na presença de nucleotídeos (ATP e ADP) a 5 mmol.L^{-1} , incluindo ou não MgCl_2 a 2 mmol.L^{-1} . As proteínas foram preparadas em tampão D, e dialisadas exaustivamente a 4°C em tampão sem β -mercaptoetanol, as concentrações utilizadas foram de 1 mg.mL^{-1} para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. Ensaios adicionais com *HsHsp90 β* e *HsHsp90 β N* foram realizados para comparar a estabilidade do domínio N entre diversos organismos, estas proteínas foram expressas e purificadas no laboratório de acordo com (Minari, 2018). A faixa de temperatura utilizada foi de 20 a 90°C com taxa de aumento da temperatura de 1°C/min , todos os experimentos foram realizados em duas etapas, aquecimento e resfriamento, para avaliar se o processo é reversível (Batista *et al.*, 2015a). Os termogramas foram registrados no software *DSC Run* (TA Instruments) e os dados foram analisados pelo software *Launch NanoAnalyse*.

2.1.11 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas na linha SAXS1, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPEM, Campinas-SP). Utilizando-se feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e distância detector-amostra de, 1000 mm . As amostras foram medidas em célula com janela de mica com 1 mm de caminho

óptico. Os padrões de espalhamento foram coletados por um detector MarCCD durante 300 segundos para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, e as concentrações empregadas para cada proteínas foram de aproximadamente $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo que as mesmas haviam sido purificadas e dialisadas em tampão D.

As curvas de SAXS foram normalizadas pelas concentrações de proteína e a qualidade dos dados foi avaliada manualmente e pelo programa Primus (Konarev et al, 2003). Baseando-se na aproximação da lei de Guinier foram determinados os valores de raio de giro (R_g), e as massas moleculares (MMs) foram estimadas pelo programa SAXSMoW (Fischer et al, 2010). Para o cálculo das funções de distribuição das distâncias da partícula (PDDF) o programa GNOM foi utilizado (Svergun, 1992). Os modelos *ab initio* das proteínas foram gerados pelo programa DAMMIN (Svergun, 1999), que usa o método de *simulated annealing* para posicionar átomos-modelo espacialmente de forma a refletir a curva experimental de SAXS.

Os experimentos de SAXS foram realizados sob coordenação do Dr. Paulo Roberto das Dores da Silva e os dados foram analisados pela Dr. Thiago Vargas Seraphim.

2.1.12 Atividade ATPásica

O efeito de *PfAha4* sobre a atividade enzimática da *PfHsp90* foi avaliado por meio de ensaios empregando o kit colorimétrico PiColorLock Gold™ (Innova Biosciences), que detecta fosfato inorgânico (Pi) liberado como produto da hidrólise de ATP. O kit baseia-se na alteração da absorbância do corante verde malaquita na presença de complexos de fosfomolibdato, permitindo a quantificação de fosfato total liberado (Silva *et al.*, 2018).

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços Greiner UV-Star® (Sigma), e as amostras foram preparadas em tampão F na presença de 2 mmol.L^{-1} de MgCl_2 . Foram procedidos os seguintes experimentos: (i) aumento crescente da concentração de *PfAha4* (0 a $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) empregando concentrações fixas de *PfHsp90* ($1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de dímero) e ATP (1 mmol.L^{-1}), e (ii) aumento crescente da concentração de ATP (0 a 2 mmol.L^{-1}) empregando concentrações fixas de *PfHsp90* ($1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de dímero) e *PfAha4* ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). As placas foram incubadas por 20 minutos a 37°C , a reação foi interrompida pela adição de *Gold mix*, após 5 minutos foi adicionado o estabilizador, e posteriormente realizada a leitura, em comprimentos de onda entre 590 e 650 nm no leitor de placas Varioskan™ LUX 3020-197 (Thermo Fisher Scientific).

Os experimentos foram realizados em quintuplicata, e a partir dos dados de estimulação da atividade (A) foi calculado o percentual de estímulo e o valor de EC_{50} , empregando uma curva com ajuste dose-resposta por meio do *software* OriginPro 2016.

A partir da curva de v_0 (velocidade inicial), concentração de Pi pelo tempo, em função da concentração de substrato (ATP) (B) obteve-se os parâmetros cinéticos da interação de *PfHsp90* com *PfAha4*, empregando o ajuste de Michaelis-Menten (Equação 7) por meio do *software* OriginPro 2016.

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 7}$$

Na equação 7, v_0 é a velocidade (taxa de fosfato liberado por minuto), $V_{\max}$ é a velocidade máxima, K_M é a constante de Michaelis-Menten e $[S]$ é a concentração de substrato (ATP).

2.1.13 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de ITC foram realizados empregando calorímetro iTC200 (GE Healthcare Lifesciences). As proteínas foram dialisadas por 16 horas a 4 °C em tampão G. As construções da chaperona (*PfHsp90NM* e *PfHsp90M*) foram utilizadas na célula em concentrações de 10 a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de monômeros, e a *PfAha4* foi empregada na seringa, em concentrações de 100 a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O regime variou em torno de 2 μL a cada nova injeção, dependendo da intensidade de sinal observado nas titulações. Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, da mesma forma descrita para os experimentos de interação de *PfHsp90* e *PfAha4*, realizados por outra integrante do grupo como parte do seu projeto de doutorado (Minari, 2018, p.79).

A análise dos dados foi realizada conforme descrito por Seraphim (2015, p. 39), o calor da interação (Q) foi determinado a partir da integração das áreas dos picos a cada injeção ($\mu\text{cal seg}^{-1}$), as quais são proporcionais ao volume da célula (V_{cel}), concentração de ligante ($[L]$) e ΔH . O calor de diluição do titulante e do titulado foi calculado a partir da linha de base ao final da titulação, em condições onde todos os sítios foram saturados, e foi subtraído do calor de interação determinado. O Q obtido por mol de ligante injetado foi analisado em função da razão molar entre titulante/titulado e os valores de ΔH_{app} , n e K_A foram estimados pelo ajuste dos dados, realizado com auxílio do programa Origin Microcal segundo a equação abaixo (Equação 8):

$$Q = \left(\frac{n[M]\Delta H_{V_{\text{cel}}}}{2} \right) \left\{ 1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} - \sqrt{\left[\left(1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} \right)^2 - \frac{4[L]}{(n[M])}} \right]} \right\} \quad \text{Equação 8}$$

onde, $[M]$ é a concentração molar do titulado e ΔH_{app} é a variação de entalpia, em cal mol^{-1} . Neste procedimento, o programa Origin Microcal supôs, inicialmente, valores de n, K_A e ΔH_{app} ,

calculando a variação do calor (ΔQ) em cada injeção e comparando-os com o calor medido experimentalmente em cada injeção. Os valores de n , K_A e ΔH_{app} foram otimizados progressivamente até melhoras significativas nestes valores não fossem mais observadas (Leavitt & Freire, 2001; Pierce *et al.*, 1999).

A variação de entropia aparente (ΔS_{app}) e variação de energia livre de Gibbs aparente (ΔG_{app}) foram calculadas segundo a equação 9.

$$\Delta G_{app} = -RT \ln K_A = \Delta H_{app} - T\Delta S_{app} \quad \text{Equação 9}$$

Onde, R é a constante dos gases em $\text{cal.K}^{-1}.\text{mol.L}^{-1}$, e T é a temperatura absoluta em K. A variação da capacidade calorífica aparente da interação (ΔC_{papp}) foi calculada pela dependência da ΔH_{app} em função da temperatura, segundo a equação 10.

$$\Delta C_{papp} = \frac{\Delta \Delta H_{app}}{\Delta T} \quad \text{Equação 10}$$

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Análise Bioinformática

A proteína Hsp90 em sua forma canônica é organizada em três domínios, conforme descrito no item 1.2 da Introdução.

A Figura 5 representa o alinhamento da sequência de aminoácidos da *PfHsp90* com as proteínas homólogas de *Leishmania braziliensis* (*LbHsp90*), *Gallus gallus domesticus* (*GgHsp90α*), *Sus scrofa domesticus* (*SsHsp90α*), as duas isoformas humanas (*HsHsp90α* e *HsHsp90β*) e a paróloga *PfGrp94*, encontrada no retículo endoplasmático de células de *P. falciparum*. A paróloga *PfTrap* não foi apresentada no alinhamento, pois possui relativamente baixa identidade na sequência de aminoácidos com as outras proteínas dispostas, tornando as sequências fragmentadas e de difícil visualização.

possivelmente confere maior flexibilidade entre os domínios citados anteriormente, pois se trata de uma região fortemente carregada e de essencial importância para que a Hsp90 exerça sua função (Borges *et al.*, 2016; Seraphim *et al.*, 2017).

Os percentuais de identidade entre as estruturas primárias das Hsp90 alinhadas estão dispostos na Tabela 3, mediante análise das sequências utilizando *ClustalW2*. Nota-se que a *PfHsp90* tem maior identidade com proteínas citoplasmáticas de outros organismos (*LbHsp90*, *HsHsp90α*, *HsHsp90β*, *GgHsp90α* e *SsHsp90α*) do que com as parálogas, localizadas em diferentes organelas (*PfGrp94* e *PfTrap*), destacando que estas apresentam sequência de endereçamento e retenção.

Tabela 3. Identidade de sequências entre as Hsp90 homólogas. Foram destacados os percentuais de identidade entre *PfHsp90* e proteínas ortólogas, de *L. braziliensis*, *S. scrofa domesticus*, *G. gallus domesticus* e isoformas α e β humanas, e as proteínas parálogas *Grp94* e *Trap*.

Proteína	<i>PfHsp90</i>	<i>LbHsp90</i>	<i>HsHsp90α</i>	<i>HsHsp90β</i>	<i>GgHsp90α</i>	<i>SsHsp90α</i>	<i>PfGrp94</i>	<i>PfTrap</i>
<i>PfHsp90</i>	100%	-	-	-	-	-	-	-
<i>LbHsp90</i>	65%	100%	-	-	-	-	-	-
<i>HsHsp90α</i>	68%	65%	100%	-	-	-	-	-
<i>HsHsp90β</i>	68%	64%	87%	100%	-	-	-	-
<i>GgHsp90α</i>	68%	65%	96%	86%	100%	-	-	-
<i>SsHsp90α</i>	68%	65%	99%	87%	96%	100%	-	-
<i>PfGrp94</i>	41%	40%	41%	41%	40%	41%	100%	-
<i>PfTrap</i>	22%	23%	23%	23%	24%	23%	20%	100%

Fonte: Autoria própria.

Além disso, quando são alinhadas as sequências que correspondem a cada domínio individualmente, observa-se que o domínio N, na ausência do *linker*, é o mais conservado entre as proteínas, nesta região a *PfHsp90* exibe entre 72 e 75% de identidade com proteínas ortólogas, 56% com a *PfGrp94* e 24% com a *PfTrap*. Neste sentido, o domínio N é mais conservado do que o M (*PfHsp90* exibe entre 69 e 75% de identidade com proteínas ortólogas, 42% com a *PfGrp94* e 22% com *PfTrap*), e este por sua vez, mais conservado do que o C (cerca de 60% de identidade com o de proteínas ortólogas, 29% com a *PfGrp94* e 18% com *PfTrap*). Sendo assim, a região de menor similaridade e com maior variação da composição é o *linker* que conecta os domínios N e M. Os percentuais de identidade entre o *linker* de *PfHsp90* e homólogas, composição em termos de aminoácidos carregados, carga líquida em pH neutro, pI da região e pI das proteínas completas, foram dispostos na Tabela 4, os valores foram obtidos pelos programas *Sednterp* e *ClustalW2*.

Tabela 4. Caracterização dos *linkers* de Hsp90 homólogos. Os *linkers* foram comparados com relação à identidade de sequência com PfHsp90_CL e em função da composição, tamanho e carga.

Proteína	Identidade com PfHsp90_CL*	Composição					Número de resíduos	Carga a pH 7,0	pI linker	pI proteína
		R	H	K	D	E				
PfHsp90_CL	100%	3	3	19	8	33	95	-19	4,78	5,17
LbHsp90_CL	42%	0	0	14	5	15	53	-6	4,95	5,30
HsHsp90 α _CL	37%	1	0	18	9	22	63	-12	4,78	5,17
HsHsp90 β _CL	42%	1	0	16	10	18	60	-11	4,76	5,19
GgHsp90 α _CL	39%	1	0	17	8	21	60	-11	4,79	5,24
SsHsp90 α _CL	37%	1	0	18	9	23	64	-13	4,74	5,16
PfGrp94_CL	25%	1	0	7	6	6	45	-4	4,87	5,53
PfTrap_CL	17%	2	0	2	5	9	48	-10	4,21	5,21

* CL é referente a região do *linker*, do inglês: *Charged Linker*.

Obs: R = Arginina, H = Histidina, K = Lisina, D = Aspartato e E = Glutamato.

Fonte: Autoria própria.

O *linker* de PfHsp90 exibe características exclusivas, é o mais longo e mais carregado negativamente dentre os analisados, é composto por 95 resíduos de aminoácidos, frente ao de PfGrp94 com apenas 45 resíduos, esta é a proteína da família com maior identidade sequencial em *P. falciparum* (cerca de 41% entre as proteínas completas e 25% entre as regiões de *linker*). Além disso, enquanto o *linker* da proteína HsHsp90 α , com 63 resíduos, apresenta carga residual negativa de -12 em pH neutro, a PfHsp90 aumenta a carga líquida da proteína em -19, na mesma condição. Observa-se, mediante análise da Tabela 4, que o *linker* é composto majoritariamente por resíduos de aminoácidos carregados, e a carga residual negativa é oriunda do balanço de cargas na proteína. No caso da PfHsp90 a carga residual negativa, superior aos valores encontrados para proteínas parálogas e ortólogas, tem relação direta com o conteúdo de resíduos de aminoácidos carregados negativamente, são 33 resíduos de glutamato, 10 a mais do que para a SsHsp90 α .

No geral, as características que diferenciam a PfHsp90 de proteínas homólogas, tornam esta proteína interessante do ponto de vista estrutural e funcional, especialmente no estudo comparativo do acoplamento entre os domínios N e M em decorrência da hidrólise de ATP, e da interação com co-chaperonas, que são eventos essenciais para o funcionamento do ciclo da Hsp90.

2.2.2 Subclonagem de *PfHsp90*NM

O laboratório já detinha o DNA codante da *PfHsp90* clonado em vetor pET28a assim como a construção correspondente ao domínio M da *PfHsp90* clonado no mesmo vetor de expressão. Porém, para completar os experimentos, foi necessário obter a construção *PfHsp90*NM clonada em vetor pET28a. Cabe mencionar que a construção correspondente ao domínio N da *PfHsp90* não gerou proteína factível de purificação no estado solúvel inviabilizando o seu estudo funcional e estrutural (dados não publicados).

A amplificação do DNA codificante para *PfHsp90*NM por PCR foi realizada mediante metodologia descrita no item 2.1.1. A Figura 6A mostra os fragmentos de DNA referentes a PCR anterior a subclonagem, e a Figura 6B mostra os fragmentos da PCR de colônias recombinantes, após a subclonagem em vetor de expressão pET28a. Para todos os casos, as bandas referentes aos fragmentos amplificados foram visualizadas entre 1500 e 2000 pb.

Figura 6. Gel de agarose 0,8% (A) PCR: Amplificação de fragmento de DNA alvo (B) PCR de colônias: amplificação de fragmento de DNA em teste de verificação da clonagem. PM: Padrão de massa em pares de base nucleotídicas (pb). (A) Anterior a subclonagem (1): Produto de PCR é o fragmento do DNA alvo que codifica *PfHsp90*NM (B) Após subclonagem (1-7): Produto de PCR proveniente de 7 colônias, após transformação com a construção pET28a::*PfHsp90*NM.

Fonte: Autoria própria

As bandas foram visualizadas com mais de 1500 bp, o que condiz com o resultado esperado (>1698 pb). O fragmento na canaleta 1 da Figura 6A é referente ao DNA alvo que posteriormente foi excisado do gel e purificado por *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen) e inserido em pET28a. Tanto o vetor quanto o fragmento foram previamente digeridos com as enzimas de restrição *Nde* I e *Sac* I.

O vetor obtido, pET28a::P*f*Hsp90NM, foi inserido em células competentes de *E. coli* BL21(DE3). As colônias resultantes da transformação foram testadas para conferir a eficiência da clonagem, foram escolhidas 7 colônias recombinantes para realizar novas reações de PCR nas mesmas condições da inicial. A Figura 6B é o resultado dos ensaios de PCR de colônia, e sua análise infere que todas as colônias em estudo continham o DNA de interesse que pôde ser isolado e purificado para novas transformações.

Para realizar a análise de restrição, foram extraídos os DNA das colônias 1, 3 e 4 utilizando *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), para cada uma das colônias escolhidas foram realizadas 4 preparações: (1) pET28a::P*f*Hsp90NM em tampão, (2) pET28a::P*f*Hsp90NM incubado com a enzima *Nde* I, (3) pET28a::P*f*Hsp90NM incubado com a enzima *Sac* I, e (4) pET28a::P*f*Hsp90NM incubado com as enzimas *Nde* I e *Sac* I. Mediante análise da Figura 7, é possível observar a liberação de fragmentos maiores de que 1500 pb quando o DNA foi incubado com ambas as enzimas (caneletas 1d, 2d, 3d). A detecção da imagem do gel de agarose (Figura 7) foi obtida por *Gel DocTM EZ Imager* (Bio-Rad) e tratada empregando o *software Image Lab*.

Figura 7. Análise de restrição do vetor pET28a::P*f*Hsp90NM. Gel de agarose 0,8%. MM: Marcador Molecular em pb. As canaletas de número 1 são referentes a análise de restrição da colônia 1, as canaletas 2 são referentes a colônia 3, e as canaletas 3 são referentes a colônia 4, todas proveniente da PCR de colônias. O gel representa as quatro condições de análise do DNA (a-d) para as três colônias analisadas. A condição (a) é referente ao tubo contendo DNA em tampão (controle negativo da digestão); (b) DNA com *Nde* I; (c) DNA com *Sac* I, e (d) DNA com *Nde* I e *Sac* I. Todas as preparações foram incubadas por 8 horas a 37°C.

Fonte: Autoria própria.

O DNA plasmidial das colônias 1, 3 e 4 foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia automático, confirmando que a clonagem foi realizada com sucesso e sem mutações nas seqüências codificantes (dados não mostrados).

2.2.3 Obtenção de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*

As proteínas *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* são referentes aos domínios NM e M da forma canônica da *PfHsp90*, respectivamente (Silva *et al.*, 2013). Os domínios podem ser observados na Figura 8A. O estudo da Hsp90 de protozoários tem importância, sobretudo em relação a estrutura, função e propriedades inibitórias, visto que, esta chaperona desempenha papel fundamental no desenvolvimento e sobrevivência de espécies causadoras de doenças parasitárias (Pavithra *et al.*, 2007; Seraphim *et al.*, 2014; Posfai *et al.*, 2018).

As proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e a *PfHsp90M* foram obtidas fusionadas à His-tag até o final das etapas de purificação e assim utilizadas para os testes subsequentes. As etapas de purificação foram monitoradas por SDS-PAGE 10% para as proteínas com massas de 88,3 e 68,1 kDa, referentes à *PfHsp90* e *PfHsp90NM*, respectivamente (Figura 8B-C), e SDS-PAGE 15% para a proteína com massa de 32,5 kDa, referente à *PfHsp90M* (Figura 8D). As proteínas foram obtidas com grau de pureza superior a 95% (*ImageJ*) e o rendimento para o processo de purificação foi satisfatório, com obtenção de aproximadamente 10 mg de proteína por litro de meio de cultura, para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*.

Figura 8. Monitoramento das etapas de expressão e purificação de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* em SDS-PAGE. (A) Esquema ilustrativo da organização dos domínios para cada uma das proteínas (B) *PfHsp90*, (C) *PfHsp90NM* e (D) *PfHsp90M*. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida em placa empregando (A) e (B) 10% e (C) 15% de acrilamida. As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R. Padrão: marcador de massa molecular pré-corado (kDa). As frações coletadas são referentes a amostras de (1) proteínas totais da cultura não induzida; (2) proteínas totais da cultura induzida; (3) fração solúvel de proteínas totais da cultura induzida; (4) proteína eluída após etapa de purificação por afinidade e (5) proteína eluída da exclusão molecular.

Fonte: Autoria própria.

As etapas de purificação de *PfAha4* foram monitoradas em SDS-PAGE 15%, a proteína apresenta MM de 16,4 kDa, após clivagem da His-tag com trombina (Figura 9), e foi obtida com grau de pureza superior a 95% e rendimento de aproximadamente 30 mg.L⁻¹ de meio de cultura. A caracterização estrutural da *PfAha4* foi realizada por (Minari, 2018).

Figura 9. Monitoramento das etapas de expressão e purificação de *PfAha4* em SDS-PAGE 15%. Foram coletadas frações referentes as etapas de purificação e as bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R. As etapas são referente a amostra de: (1) proteínas totais da cultura não induzida; (2) proteínas totais da cultura induzida; (3) fração insolúvel de proteínas totais da cultura induzida; (4) fração solúvel de proteínas totais da cultura induzida; (5) proteína eluída após etapa de purificação por afinidade; (6) proteína, após clivagem da His-tag, eluída da exclusão molecular. MM: marcador de massa molecular pré-corado (kDa).

Fonte: Autoria própria.

2.2.4 Caracterização da estrutura secundária

Para verificar se as proteínas recombinantes foram obtidas enoveladas, foram realizados experimentos de CD, que mostraram que *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* têm como elementos de estrutura secundária hélice α e folha β . Os espectros de CD normalizados para elipticidade molar residual para as proteínas recombinantes são apresentados na Figura 10 indicando que não existiu efeito concentração dependente.

Figura 10. Caracterização da estrutura secundária por espectropolarimetria de dicroísmo circular. (A) Espectros de *PfHsp90* em concentrações de 2,5, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, (B) *PfHsp90NM* em concentrações de 2,5, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, (C) *PfHsp90M* a 5, 10 e 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (D) Sobreposição dos espectros de CD.

Fonte: Autoria própria.

Foi calculado o conteúdo percentual de estrutura secundária para as proteínas a partir da deconvolução do sinal de CD, empregando o programa CDNN 2.1, os dados foram organizados na Tabela 5.

Tabela 5. Conteúdo de estrutura secundária de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*.

Proteína	Tipo de estrutura secundária			
	Hélice α (%)	Folha β (%)	Outras (%)	Total (%)
<i>PfHsp90</i>	27	21	52	100
<i>PfHsp90NM</i>	30	19	51	100
<i>PfHsp90M</i>	26	22	52	100

Fonte: Autoria própria.

Os espectros nas diferentes concentrações analisadas coincidiram em $[\theta]_{\text{EMR}}$, o que sugere que não há ganhos em estrutura secundária com aumento da concentração de proteína.

Como resultado da investigação estrutural pode-se inferir que as proteínas foram obtidas enoveladas.

A *PfHsp90NM* apresentou maior conteúdo de hélice α do que a *PfHsp90M* e do que a proteína completa, indicativo de que o domínio N é mais rico neste tipo de estrutura secundária do que o domínio M e C. O domínio N-terminal de *PfHsp90*, na ausência do *linker*, tem estrutura elucidada e depositada no PDB (cód. 3K60) e apresenta 37% de hélice α e 23% de Folha β , confirmando a presença de maior conteúdo de estrutura helicoidal neste domínio (Corbett & Berger, 2010).

O conteúdo de estrutura secundária de proteínas depositadas no PDB pode ser atribuído pelo programa STRIDE, que emprega coordenadas atômicas na predição da estrutura (Frishman & Argos, 1995). Sendo assim, foram selecionados três modelos depositados no PDB, com códigos 5FWK, 3PRY e 3K60, referentes a proteínas que exibem alta identidade estrutural com a *PfHsp90* e construções, e suas informações, percentual de identidade e conteúdo de estrutura secundária foram dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Informações e conteúdo de estrutura secundária, empregando método STRIDE, para proteínas com modelo estrutural depositado no PDB.

Proteína	PDB ID	N° de resíduos	Estrutura secundária		Identidade
			Hélice α (%)	Folha β (%)	
<i>HsHsp90β</i>	5FWK	727	33	16	68% com <i>PfHsp90</i>
<i>HsHsp90β_NM[§]</i>	5FWK	576	31	22	70% com <i>PfHsp90NM</i> [#]
<i>HsHsp90β_M</i>	3PRY	268	37	18	75% com <i>PfHsp90M</i>
<i>PfHsp90N</i> [*]	3K60	223	36	25	100% com <i>PfHsp90NM</i> [#]

^{*}*PfHsp90N* é referente ao domínio N de *PfHsp90* na ausência do *linker*.

[#] *PfHsp90NM* tem 586 resíduos de aminoácidos, não tem o domínio C, portanto corresponde a parte da estrutura de *HsHsp90 β* , e *PfHsp90N* é parte de sua estrutura.

[§] Dados parciais, referente a parte da estrutura depositada no PDB.

Fonte: Autoria própria.

A estrutura depositada com código 3K60 (*PfHsp90N*^{*}), é a que apresenta maior identidade com a *PfHsp90NM* quando comparada a outras estruturas disponíveis no PDB. A *PfHsp90N* é composta por 223 resíduos de aminoácidos que representam parte da estrutura de *PfHsp90NM*, e mediante o programa STRIDE, apresenta 36% de hélice α e 25% folha β , estes valores são condizentes com os dados e discussão reportados por CD anteriormente.

Nota-se que o conteúdo de estrutura secundária obtido para a *PfHsp90* é similar ao obtido para a *HsHsp90 β* , quando é excluído o domínio C, com aproximadamente 30% de hélice α e 20% de folha β . Apesar da alta identidade estrutural entre as proteínas completas e os

domínios M de *HsHsp90β* e *PfHsp90*, existe notável discrepância com relação ao percentual de estrutura secundária. No geral a proteína humana exibe maior percentual de hélice α e menor de folha β , o fato se deve à prováveis diferenças estruturais localizadas nos domínios M e C que são características de cada organismo.

2.2.5 Fluorescência intrínseca do triptofano

Com o intuito de investigar a estrutura terciária local das proteínas foram realizados ensaios de fluorescência utilizando sondas intrínsecas, ou seja, os próprios resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na estrutura de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. Os ensaios foram realizados a 280 e 295 nm, no primeiro comprimento de onda os triptofanos (W) e tirosinas (Y) foram excitados, e no segundo comprimento de onda somente W, por este motivo a intensidade de fluorescência apresentou-se maior quando a proteína foi excitada a 280 nm (Eftink, 1994). Além disso, foram experimentadas duas condições: proteína nativa e na presença de 6 mol.L⁻¹ de GndCl, para todos os casos o desnaturante gerou supressão da fluorescência e deslocamento do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) para comprimentos de onda menos energéticos (Figura 11). Portanto confirmou-se a obtenção das proteínas enoveladas.

Figura 11. Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. As amostras foram excitadas a (A) 280 nm e (B) 295 nm, na ausência e presença de desnaturante (GndCl 6 mol.L⁻¹).

Fonte: Autoria própria

Os valores calculados de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle \lambda \rangle$ para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* quando excitadas a 295 nm foram organizados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros espectroscópicos de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*.

Parâmetro	Proteína		
	<i>PfHsp90</i>	<i>PfHsp90NM</i>	<i>PfHsp90M</i>
$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	338 ± 1	331 ± 1	331 ± 1
$\lambda_{\text{máx.}}$ 6M GndCl (nm)	346 ± 1	348 ± 1	351 ± 1
$\langle \lambda \rangle$ (nm)	$347,6 \pm 0,1$	$343,6 \pm 0,1$	$344,6 \pm 0,1$
$\langle \lambda \rangle$ 6M GndCl (nm)	$358,7 \pm 0,1$	$360,6 \pm 0,1$	$360,5 \pm 0,1$

Fonte: Autoria própria

Nota-se que a *PfHsp90* exibe maior intensidade de fluorescência que a *PfHsp90NM* e a *PfHsp90M*, respectivamente. Este resultado corrobora com fato de que quanto maior a proteína ou construção, maior é o número de triptofanos e tirosinas presentes na estrutura, conforme observado na Tabela 2.

A partir da análise das propriedades espectroscópicas dispostas na Tabela 7, que se referem exclusivamente a fluorescência emitida por triptofanos, pode-se estabelecer uma relação entre o $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle \lambda \rangle$ com o ambiente em que os resíduos de aminoácidos se encontram. Os resíduos de triptofano funcionam como sonda para avaliar a presença de estrutura terciária local. Quando a proteína está enovelada parte dos triptofanos se encontram no cerne hidrofóbico, entretanto, em condição desnaturante os resíduos tornam-se expostos à água. Neste sentido, a polaridade do solvente implica em deslocamento do espectro de emissão para comprimentos de onda menos energéticos, devido a reorganização de dipolos elétricos (Lakowicz, 2006). Sendo assim, a análise dos espectros de emissão, na ausência e na presença de desnaturante, conferem uma avaliação geral de enovelamento, que deve refletir a média dos ambientes dos triptofanos, (Lakowicz, 2006).

A *PfHsp90NM* exibe 5 triptofanos que fluorescem com $\lambda_{\text{máx}}$ de 331 ± 1 nm, e esta propriedade indica que em média os aminoácidos estão parcialmente expostos ao solvente, na presença de GndCl foram promovidas mudanças conformacionais que culminaram no desenovelamento proteico e tornaram os triptofanos mais expostos ao solvente, exibindo $\lambda_{\text{máx}}$ de 348 ± 1 nm. O mesmo raciocínio se aplica para a *PfHsp90M*, com 3 triptofanos que na média estão parcialmente expostos ao solvente, e na presença do agente desnaturante tornam-se também mais expostos. Entretanto, a *PfHsp90* tem 7 triptofanos que fluorescem com $\lambda_{\text{máx}}$ de 338 ± 1 nm, indicativo de que no geral a proteína completa apresenta estes resíduos mais expostos ao solvente do que nas construções citadas anteriormente, e esta característica possivelmente foi conferida pela localização dos 2 triptofanos presentes no domínio C-terminal, que devem estar expostos ao solvente.

2.2.6 Caracterização hidrodinâmica e investigação do estado oligomérico

Como via de analisar o estado oligomérico e forma das proteínas, foram determinadas as propriedades hidrodinâmicas da proteína completa e das construções da *PfHsp90* por aSEC. A *PfHsp90NM* eluiu em volume de aproximadamente 13,2 mL, entre aos padrões de 160 e 67 kDa, e a *PfHsp90M* eluiu em 16,2 mL, próxima ao padrão de 30 kDa (Figura 12). A *PfHsp90* apresentou volume de eluição de 10,9 mL, correspondente a uma proteína globular de aproximadamente 400 kDa. A partir do volume de eluição das proteínas padrão, *blue dextran* e das proteínas em estudo, foi possível determinar os parâmetros R_s e f/f_0 para cada uma delas.

Figura 12. Cromatografia de exclusão molecular analítica de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. (A) As amostras foram aplicadas em coluna Superdex 200 10/300 GL e detectadas por absorvância à 280 nm. Os perfis cromatográficos das proteínas em estudo foram identificados por cores diferentes, e as massas moleculares referentes as proteínas padrão estão indicadas pelas linhas tracejadas. (B) Estimativa do Raio de Stokes de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* como uma função dos valores de $-(\log K_{av})^{1/2}$.

Fonte: Autoria própria

A partir da equação descrita no item 2.1.8, foi possível estimar a MM_{app} para a construção *PfHsp90M* em 29 kDa e R_s de $24 \pm 1 \text{ \AA}$, indicando um f/f_0 de $1,1 \pm 0,1$. Os resultados para a *PfHsp90NM* indicaram MM_{app} 125 kDa e R_s de $42 \pm 1 \text{ \AA}$, resultando num f/f_0 $1,5 \pm 0,1$. Para a *PfHsp90*, a MM_{app} estimada foi de 350 kDa e o R_s de $62 \pm 1 \text{ \AA}$, indicando um f/f_0 de $1,7 \pm 0,1$, para a forma dimérica.

Deve-se considerar que os volumes de eluição para as proteínas mais alongadas são superiores aos valores esperados para proteínas globulares de mesma MM (Batista *et al.*, 2015b), que é o caso da *PfHsp90* e *PfHsp90NM* quando observados os valores de f/f_0 obtidos, considerando a proteína completa como dímero e a *PfHsp90NM* como monômero. Comportamento similar foi descrito para a proteína Hsp90 e construção Hsp90NM de *L.*

brasiliensis, que exibiram f/f_0 de 1,6 e 1,4, respectivamente. A *LbHsp90* apresentou R_s de 59 Å, que equivale a uma proteína globular de aproximadamente 300 kDa (Silva *et al.*, 2013). Sendo assim, os resultados indicam que a Hsp90 de *P. falciparum* aparenta ter forma mais alongada do que a de *L. brasiliensis*.

Estudos estruturais envolvendo Hsp90 de diversos organismos, mostram que a proteína completa se apresenta na forma de dímero (Nemoto *et al.*, 1995; Richter *et al.*, 2001; Wayne & Bolon, 2007; Silva *et al.*, 2013; Mayer *et al.*, 2015), sendo assim, como via de atestar o estado oligomérico de cada uma das proteínas em estudo, foram realizados ensaios de *crosslinking* químico (Figura 13).

Figura 13. Crosslinking químico em SDS-PAGE 12%. As amostras de proteína foram incubadas com DSS por 5, 15 e 30 minutos, posteriormente foram resolvidas em SDS-PAGE 12%, e as bandas foram reveladas com corante Coomassie Brilliant Blue. No gel, as proteínas foram identificadas logo acima das condições empregadas: (C) controle (proteína na ausência de DSS) e tempos de reação de 5, 15 e 30 minutos. As bandas que se referem a *PfHsp90* na forma de dímero e monômero, foram indicadas por setas. MM: marcador molecular (kDa).

Fonte: Autoria própria

Como resultado do experimento pode-se observar que todas as proteínas, na ausência de DSS e em condição desnaturante, apresentaram-se na forma monomérica (Figura 13, canaletas referentes aos controles). Na presença de DSS, houve o aparecimento de bandas que correspondem a formação de *PfHsp90* em estado dimérico por meio de ligações cruzadas, quando empregados os tempos de 5, 15 e 30 minutos de reação (Figura 13). Contudo, a formação de dímeros não foi observada para as construções *PfHsp90M* e *PfHsp90NM*, devido à ausência do sítio de dimerização localizado no C-terminal, que é responsável por estabilizar o dímero por meio de interações eletrostáticas e contatos hidrofóbicos entre resíduos

corretamente orientados (Nemoto *et al.*, 1995; Garnier *et al.*, 2002). Desta forma, o resultado confirma a tendência natural de organização da proteína e construções.

Adicionalmente, nota-se a presença de bandas menos intensas logo acima daquelas que se referem a forma monomérica das proteínas *PfHsp90NM* e *PfHsp90* (Figura 13). Estas bandas são provenientes de reações espúrias e possivelmente estão relacionadas a formação de espécies entre domínios por *crosslinking* interno, esta formação é responsável por alterar o padrão de migração eletroforética das proteínas em SDS-PAGE (Fioramonte *et al.*, 2012).

Baseando-se em estudos estruturais que envolvem as Hsp90 (Wayne & Bolon, 2007; Mayer & Breton 2015; Shopf *et al.*, 2017) e no experimento exposto acima, empregando *crosslinker* químico, pode-se afirmar que há formação dimérica de *PfHsp90*. Como via de determinar a constante de equilíbrio aparente, da dissociação de dímero em monômero, (K_{Dapp}) para *PfHsp90*, foram avaliados os cromatogramas quando empregadas diferentes concentrações de proteína (0,1 a 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), implicando em um fator de diluição de 7 vezes que é característico da coluna utilizada (Richter *et al.*, 2001).

Nota-se que mediante diminuição da concentração de proteína há deslocamento do pico para maiores volumes de eluição, e este assume perfil menos simétrico e com base mais larga, indicando a presença de diferentes espécies em análise (Figura 14A). Os valores de concentração da proteína em função do tempo de retenção fornecem o valor de K_{Dapp} pelo uso do ajuste DoseResp (Figura 14B).

Figura 14. Cromatografia de exclusão molecular analítica de *PfHsp90* em função da concentração de proteína. (A) Sobreposição de cromatogramas de *PfHsp90* em diferentes concentrações da proteína. (B) Concentração de *PfHsp90* em função do tempo de retenção, para obtenção da $K_{Dapp} = 110 \pm 10 \text{ nmol.L}^{-1}$ empregando ajuste DoseResp

Fonte: Autoria própria.

Em todas as condições empregadas, nota-se um único pico nos cromatogramas (Figura 14A), sendo assim, assume-se o equilíbrio monômero-dímero da Hsp90 em qualquer concentração da proteína, e a partir do modelo foi obtida a K_{Dapp} para a *PfHsp90* de 110 ± 10 nmol.L⁻¹, este valor é similar ao encontrado para *LbHsp90* de 80 ± 10 nmol.L⁻¹ (Silva *et al.*, 2013), e para *yHsp82* de 60 ± 12 nmol.L⁻¹ (Richter *et al.*, 2001). O resultado indica que a *PfHsp90* tem equilíbrio um pouco mais deslocado para o estado monomérico do que as proteínas ortólogas, e para ambos os casos se observa formação majoritária de dímeros em maiores concentrações de proteína. Sabe-se ainda, que há equilíbrio entre as formações para as proteínas humanas, as espécies de *HsHsp90α* apresentam-se majoritariamente como homodímeros e as de *HsHsp90β* como monômeros, quando analisadas em gel nativo (Nemoto *et al.*, 1995).

2.2.7 Estrutura em baixa resolução

O estudo estrutural de proteínas modulares e flexíveis, como as Hsp90, é um desafio devido a diversas conformações possíveis e dependência de ligantes. SAXS é uma excelente técnica para o estudo deste tipo de proteínas, pois permite analisá-las em solução e em diversas condições experimentais (Borges *et al.*, 2016). Os resultados de SAXS já reportados para Hsp90 ortólogas como a *LbHsp90* é uma demonstração do potencial desta técnica (Seraphim *et al.*, 2017). Os dados foram coletados para obtenção das curvas de espalhamento (Figura 15A) e, mediante observação da região de Guinier nota-se que não houve agregação aparente das amostras analisadas, independentemente da concentração e do tempo de exposição aos feixes de raios-X.

A partir da função de distribuição de distâncias $p(r)$, foram obtidos os valores de $D_{máx}$, R_g e o perfil da curva forneceu informações sobre a estrutura das construções (Figura 15B). Os parâmetros obtidos estão dispostos na Tabela 8. A *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* exibiram $D_{máx}$ de 190, 140 e 80 Å, e R_g de 57, 40 e 24 Å, respectivamente. A *PfHsp90* e a construção *PfHsp90NM* exibiram decaimento sutil e característico de proteínas alongadas e flexíveis (Borges *et al.*, 2016; Seraphim *et al.*, 2017), entretanto a *PfHsp90M* exibiu perfil mais simétrico, sugerindo que o domínio seja levemente alongado e com menor flexibilidade. Os dados apresentados estão de acordo com o esperado, visto que, *PfHsp90M* representa um domínio isolado da *PfHsp90*, na ausência do *linker* alongado entre os domínios N e M.

Figura 15. Análise dos dados de SAXS da PfHsp90 e domínios. (A) Curvas de espalhamento de SAXS da *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* (símbolos abertos) sobrepostas com as curvas calculadas pelo programa GNOM (linha). (B) Curvas $p(r)$ obtidas para a *PfHsp90* e domínios nas condições analisadas.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8. Dimensões da PfHsp90 e das construções a partir dos experimentos de SAXS.

Parâmetro	Proteína		
	<i>PfHsp90</i> *	<i>PfHsp90NM</i>	<i>PfHsp90M</i>
R_g (Å)	57	40	24
$D_{máx}$ (Å)	190	140	80
MM (kDa)	186 ± 10	90 ± 2	40 ± 1

(*) *PfHsp90* é dimérica.

Fonte: Autoria própria.

As MM para *PfHsp90* e construções, foram estimadas pelo programa SAXS MoW a partir de curvas em diferentes concentrações de proteína. Todavia, a técnica exibe um erro, que varia de 10 a 20%, na determinação da MM, além de erros sistemáticos que podem ser conferidos pela determinação da concentração de proteína. Desta forma, a partir dos valores de MM, dispostos na Tabela 8, além do perfil das curvas de SAXS em diferentes concentrações de proteína, em conjunto com outra técnica hidrodinâmica (aSEC) e ensaios de *crosslinking*, pode-se inferir que a *PfHsp90* é dimérica, e a *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* são monoméricas.

Além da determinação de parâmetros hidrodinâmicos, as análises de SAXS foram empregadas para obtenção dos modelos estruturais em baixa resolução das proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*. O modelo *ab initio* foi baseado em ajustes de curvas simuladas pelo software DAMMIN, desta forma, foram obtidos os envelopes para cada uma das proteínas em solução. A *PfHsp90* encontra-se monodispersa e majoritariamente em seu estado oligomérico, como dímero. Por outro lado, as construções *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, como já mencionado anteriormente, apresentam-se como monômeros em solução. Cada protômero de *PfHsp90* exibe

forma alongada e flexível, e as regiões de contato para formação do dímero parecem estar localizados nos domínios N e C (Figura 16).

Figura 16. Modelo *ab initio* gerado a partir das curvas de SAXS para a PfHsp90 e construções. A proteína completa comporta-se como dímero em solução, e as construções como monômeros.

Fonte: Autoria própria.

2.2.8 Avaliação da estabilidade química e térmica

Os ensaios de estabilidade térmica e química foram realizados com o objetivo de entender a estrutura e organização de domínios nas proteínas. A estabilidade química das proteínas foi monitorada por fluorescência intrínseca do triptofano em concentrações crescentes de ureia.

Os espectros de fluorescência para *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* exibiram dois eventos progressivos, mediante aumento da concentração de desnaturante, que foram: deslocamento para comprimentos de onda menos energéticos e supressão da fluorescência (Figuras 17A-C). O desenovelamento químico, tanto para a proteína como para as construções citadas, acontece em duas transições (Figura 17D). Contudo, para *PfHsp90M* foram observadas transições mais sutis, e para *PfHsp90* e *PfHsp90NM* transições mais acentuadas, que são características de eventos cooperativos (Bennion & Dagget, 2003; Myers, 2014). Além disso, nota-se que a curva de *PfHsp90* é iniciada em maior valor de $\langle \lambda \rangle$, o fato está relacionado à

localização dos triptofanos no C-terminal, que é exclusivo para a proteína completa com relação as construções analisadas. Os valores de C_m foram dispostos na Tabela 9.

Figura 17. Estabilidade química de PfHsp90, PfHsp90NM e PfHsp90M. Espectros de fluorescência monitorados de 0 a 7 mol.L⁻¹ de ureia para (A) 5 μmol.L⁻¹ de PfHsp90, (B) 10 μmol.L⁻¹ de PfHsp90NM e (C) 10 μmol.L⁻¹ de PfHsp90M. (D) Perfil de desenovelamento químico para as proteínas e obtenção dos valores de C_m empregando o ajuste DoubleBoltzmann.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9. Parâmetros de estabilidade química obtidos por fluorescência: valores de C_m de PfHsp90, PfHsp90NM e PfHsp90M, determinados por desenovelamento químico em duas transições definidas.

Transição	Proteína		
	PfHsp90	PfHsp90NM	PfHsp90M
C_{m1} (mol.L ⁻¹)	$2,3 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$
C_{m2} (mol.L ⁻¹)	$4,8 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$

Fonte: Autoria própria.

Os dados apresentados sugerem que *PfHsp90M*, referente a um único domínio estrutural, desenovela-se em pelo menos dois estágios com transições discretas, exibindo C_m de 2,7 e 5,2 mol.L⁻¹, respectivamente, este comportamento já foi descrito para outras chaperonas (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva *et al.*, 2015). Em contrapartida, a construção *PfHsp90NM* tem perda estrutural mais proeminente do que *PfHsp90M*, observada especialmente na primeira transição (Figura 17D) com $C_{m1} = 2,2 \pm 0,1$ mol.L⁻¹, esta característica possivelmente está relacionada a estabilidade do domínio N-terminal. A *PfHsp90* exibe transição mais acentuada no segundo estágio com $C_{m2} = 4,8 \pm 0,2$ mol.L⁻¹.

A estabilidade térmica das proteínas foi avaliada por DSC e a análise conjunta dos termogramas de *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, fornece informações sobre a estabilidade dos domínios, incluindo investigação na presença de nucleotídeos ATP e ADP (Figura 18). Os parâmetros obtidos pelo *software NanoAnalyse* empregando o modelo gaussiano foram dispostos na Tabela 10.

Figura 18. Estabilidade térmica por DSC. Termogramas na ausência e presença de 5 mmol.L⁻¹ de ATP e ADP de (A) *PfHsp90*, (B) *PfHsp90NM* e (C) *PfHsp90M*. (D) Sobreposição de termogramas da *PfHsp90* e construções NM e M no estado APO.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10. Parâmetros de estabilidade térmica obtidos por DSC: Valores de T_m e ΔH_{app} obtidos para *PfHsp90* e construções, *HsHsp90β* completa e domínio N (*HsHsp90β_N*).

Proteína	Condição	Parâmetro			
		T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH_{app1} (kJ/mol)	ΔH_{app2} (kJ/mol)
<i>PfHsp90</i>	APO	40,1 ± 0,5	54,1 ± 0,3	70 ± 10	160 ± 10
	Mg ²⁺	40,7 ± 0,5	54,4 ± 0,4	60 ± 10	150 ± 10
	ATP	41,1 ± 0,5	52,9 ± 0,3	70 ± 10	120 ± 10
	ADP	41,2 ± 0,4	52,7 ± 0,3	70 ± 10	120 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	44,2 ± 0,2	53,0 ± 0,4	70 ± 10	80 ± 10
	ADP + Mg ²⁺	45,3 ± 0,2	53,2 ± 0,1	90 ± 10	70 ± 10
<i>PfHsp90NM</i>	APO	42,2 ± 0,3	52,3 ± 0,3	90 ± 10	100 ± 10
	Mg ²⁺	42,8 ± 0,4	52,5 ± 0,5	80 ± 10	90 ± 10
	ATP	43,2 ± 0,4	52,3 ± 0,3	60 ± 10	80 ± 10
	ADP	43,0 ± 0,4	52,0 ± 0,5	60 ± 10	80 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	44,2 ± 0,4	52,7 ± 0,5	80 ± 10	60 ± 10
	ADP + Mg ²⁺	46,1 ± 0,2	53,5 ± 0,5	80 ± 10	40 ± 10
<i>PfHsp90M*</i>	APO	-	55,6 ± 0,6	-	60 ± 10
	Mg ²⁺	-	55,6 ± 0,5	-	60 ± 10
	ATP	-	54,3 ± 0,5	-	60 ± 10
	ADP	-	54,6 ± 0,7	-	60 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	-	53,7 ± 0,5	-	60 ± 10
	ADP + Mg ²⁺	-	53,3 ± 0,4	-	70 ± 10
<i>HsHsp90β</i>	APO	49,3 ± 0,3	62,9 ± 0,5	50 ± 10	90 ± 10
	ATP	50,8 ± 0,3	63,5 ± 0,4	60 ± 10	110 ± 10
	ADP	51,3 ± 0,4	63,9 ± 0,3	60 ± 10	110 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	51,1 ± 0,2	60,9 ± 0,4	70 ± 10	40 ± 10
	ADP + Mg ²⁺	54,2 ± 0,2	60,7 ± 0,3	80 ± 10	50 ± 10
<i>HsHsp90β_N*</i>	APO	48,1 ± 0,3	-	100 ± 10	-
	ATP	49,4 ± 0,1	-	70 ± 10	-
	ADP	50,1 ± 0,3	-	70 ± 10	-
	ATP + Mg ²⁺	49,0 ± 0,2	-	70 ± 10	-
	ADP + Mg ²⁺	52,1 ± 0,1	-	80 ± 10	-
<i>LbHsp90_N</i> (Silva <i>et al.</i> , 2013)	APO	45,5	NA	NA	NA
<i>SsHsp90α</i> (Garnier <i>et al.</i> , 2002)	APO	53,7	60,5	NA	NA
	ATP	55,6	63,4	NA	NA
<i>GgHsp90α_N</i> (Garnier <i>et al.</i> , 2002)	APO	48,0	NA	NA	NA
	ATP	49,7	NA	NA	NA

N.A.: Não aplicável

(*) *PfHsp90M* e *HsHsp90β_N* exibem única transição

Fonte: Autoria própria.

Como via de simplificar a análise dos dados dispostos na Tabela 10, foram organizados os valores de variação da temperatura (T_m) entre a forma APO das proteínas e as formas ligadas a nucleotídeos, na ausência e presença de íons magnésio bivalentes (Mg²⁺) (Figura 19).

Figura 19. Variação da T_m das proteínas em função da condição experimentalada por DSC. Foram avaliadas as proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM*, *PfHsp90M*, *HsHsp90 β* e *HsHsp90 β _N* quando incubadas com os nucleotídeos ATP e ADP, na ausência e presença de Mg^{2+} . As transições referentes a desnaturação térmica foram classificadas em T1 (transição 1) e T2 (transição 2) de acordo com os valores de T_m obtidos.

Fonte: Autoria própria.

Quando analisado o perfil de desenovelamento térmico de *PfHsp90* nota-se que há duas transições claras, bem como para a *PfHsp90NM* (Figura 18A e 18B), e transição única para *PfHsp90M*, desta forma, cada uma das transições pode ser atribuída a um domínio da proteína. A segunda transição de *PfHsp90* e *PfHsp90NM* com T_m de $54,1 \pm 0,3$ °C e $52,3 \pm 0,3$ °C, respectivamente, são referentes ao domínio M, visto que a *PfHsp90M* exibe transição única com valor de $T_m = 55,6 \pm 0,6$ °C. Nota-se, que o domínio M isoladamente apresenta maior estabilidade térmica do que a proteína completa, que por sua vez, é mais estável do que construção NM, o fato provavelmente está relacionado ao aumento da liberdade conformacional e flexibilidade fornecida pelo *linker* entre os domínios N e M, resultando em desestabilização da estrutura proteica.

Neste sentido, a primeira transição de *PfHsp90* foi atribuída ao domínio N, pois exibe $T_m = 40,1 \pm 0,5$ °C, assim como para a *PfHsp90NM* com $T_m = 42,2 \pm 0,3$ °C. O domínio N de *PfHsp90* apresenta estabilidade térmica substancialmente inferior a de outras Hsp90, por exemplo, a *LbHsp90N*, que exibe 64% de identidade com o domínio N de *PfHsp90*, apresenta T_m de 45,5 °C (Silva *et al.*, 2013), e a *HsHsp90 β _N*, com 74% de identidade, exibe T_m de 48,1

$\pm 0,3$ °C, além da GgHsp90 α _N com T_m de 48,0 °C (Garnier *et al.*, 2002). Adicionalmente, o perfil da PfHsp90 sugere que o domínio C tenha estabilidade térmica igual ou similar ao domínio M, pois observou-se um aumento substancial na ΔH de desnaturação da 2ª transição na condição APO (Figura 18D).

Os ensaios indicam que as proteínas interagem com nucleotídeos de adenosina. Observou-se para as proteínas PfHsp90, PfHsp90NM, HsHsp90 β que na presença de nucleotídeos há estabilização da primeira transição, referente justamente ao domínio N em que é reportado o sítio de interação (Prodromou *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 2002; Shopf *et al.*, 2017).

Adicionalmente é observada maior estabilização do domínio N na condição em que as proteínas foram incubadas com ADP e Mg²⁺ (Figura 19), o resultado corrobora com o fato de que o ADP mantém a Hsp90 no estado inativo, com maior rigidez conformacional na região de “lid” e proximidades, em contraposição ao ATP que se liga para formação da Hsp90 ativa, com ocorrência de alterações conformacionais. Neste sentido, alguns estudos sugerem que o ADP se liga com maior afinidade a Hsp90 do que o ATP e análogos (Kawaguchi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Além disso, o íon magnésio é essencial para a formação do complexo proteína:nucleotídeo:Mg²⁺ e desempenha papel importante no fortalecimento da interação entre proteína e nucleotídeo (Garnier *et al.*, 2002; McLaughlin *et al.*, 2004).

2.2.9 Estimulação da atividade ATPásica de PfHsp90 pela PfAha4

As Ahas, como co-chaperonas da Hsp90, têm participação na ativação e modulação de estados conformacionais da chaperona, e, portanto, são fundamentais para manutenção do ciclo funcional. O efeito da PfAha4 sobre a atividade ATPásica de PfHsp90 foi avaliado por meio de ensaios enzimáticos. Concentrações crescentes de PfAha4 foram incubadas com PfHsp90 em condição saturante de ATP, e observou-se um estímulo da atividade ATPásica basal em torno de 4 vezes (percentual de estímulo de $V_{\text{máx}} = 396 \pm 6$ %), a curva de atividade enzimática foi ajustada pelo modelo de Michaelis-Menten, pois não apresentou perfil sigmoidal que é característico de mecanismos cooperativos (Figura 20A). A curva de estimulação, empregando escala logarítmica para a concentração da co-chaperona, foi ajustada pelo modelo Dose-Resposta e obtido o valor de EC₅₀ de $2,2 \pm 0,5$ $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 20B). Também foram realizados experimentos de controle, confirmando que a proteína PfAha4 não exibe atividade ATPásica, e a PfHsp90 apresenta K_m de $0,086 \pm 0,004$ mmol.L⁻¹ e k_{cat} de $0,48 \pm 0,02$ min⁻¹ (Figura 20C), que estão de acordo com dados já publicados pelo grupo para a PfHsp90 (Silva *et al.*, 2018).

Entretanto, quando incubadas ambas as proteínas com aumento crescente de substrato, a *PfHsp90* apresenta K_m de $0,090 \pm 0,003 \text{ mmol.L}^{-1}$ e k_{cat} de $2,01 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ (Figura 20D), este resultado está de acordo com os experimentos de controle realizados, pois na presença de *PfAha4*, há manutenção da K_m e aumento de aproximadamente 4 vezes no valor de k_{cat} da *PfHsp90*

Figura 20. Estimulação da atividade ATPásica de *PfHsp90* por *PfAha4*. (A) Curva de estimulação em concentração fixa de ATP (1 mmol.L^{-1}) e de dímero de *PfHsp90* ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o gráfico exibe concentração de Aha4 em função do percentual relativo de atividade ATPásica empregando ajuste Michaelis-Menten. (B) Concentração de *PfAha4* em função da atividade ATPásica relativa, para obtenção da EC_{50} empregando ajuste DoseResp. (C) Atividade ATPásica controle de *PfHsp90* a $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e de *PfAha4* a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. (D) Curva de estimulação em concentração fixa de *PfAha4* ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e de monômero de *PfHsp90* ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o gráfico exibe concentração de substrato (ATP) em função da taxa de liberação de Pi empregando ajuste Michaelis-Menten.

Fonte: Autoria própria.

Deve-se mencionar que a dimerização do C-terminal é importante para a ocorrência da dimerização no N-terminal e expressão da atividade ATPásica, sendo assim, a proteína completa é requerida para desempenhar função biológica (Prodromou *et al.*, 2000).

A atividade ATPásica de proteínas ortólogas exibem diferentes taxas de conversão associadas à ligeiras diferenças no ciclo de ação. Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_M são comumente utilizados para comparar diferentes enzimas. Portanto, a eficiência catalítica é avaliada por meio da constante de especificidade (k_{cat}/K_M), e quanto maior esta constante maior é a capacidade de conversão de substrato em produto pela enzima. Os valores do número de renovação (k_{cat}) determinados para *LbHsp90* (Silva *et al.*, 2013) e para *PfHsp90* foram 0,32 e 0,48 min^{-1} , respectivamente, e as constantes de especificidade (k_{cat}/K_M) corresponderam a 0,7 e 5,6 $\text{L.mmol}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados demonstraram, portanto, que a *PfHsp90* é cerca de 8 vezes mais eficiente na conversão de substrato em produto do que a *LbHsp90*, na ausência de co-chaperona.

2.2.10 Análise termodinâmica da interação entre *PfAha4* e as construções de *PfHsp90*

A caracterização termodinâmica da interação molecular entre a *PfAha4* e a *PfHsp90* foi realizada por meio da técnica de ITC. A *PfAha4* foi titulada nas construções *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, os ensaios foram realizados em triplicatas ou mais. Os isotermogramas empregando as temperaturas de 20, 25 e 30 °C para cada uma das construções foram exemplificados na Figura 21. De maneira geral, os dados sugerem a estequiometria de 1:1 (uma molécula de Aha4 interage com um monômero de Hsp90NM ou Hsp90M, e a interação exibe perfil exotérmico com ΔH_{app} a 25 °C de -6,0 kcal.mol^{-1} e -8,7 kcal.mol^{-1} para *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos diretos e indiretos foram calculados pelas equações citadas na seção 2.1.12, estão dispostos na Tabela 11.

Figura 21. Interação de *PfAha4* com as construções de *PfHsp90* por ITC. Isotermogramas e ajustes dos dados das interações da *PfAha4* com: (A) a construção *PfHsp90NM*, e (B) *PfHsp90M*. Para ambos os casos, foram empregadas as temperaturas de 20, 25 e 30 °C, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Figura 22. Variação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH_{app} , $T\Delta S_{app}$ e ΔG_{app}) em função da temperatura. (A) *PfHsp90NM* e (B) *PfHsp90M*. E determinação de $\Delta C_{p,app} = -110 \pm 30 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $-120 \pm 40 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ para as construções NM e M, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11. Parâmetros termodinâmicos da interação de *PfAha4* com *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*.

<i>PfHsp90NM</i> [#] e <i>PfAha4</i>			
Parâmetros	20 °C	25 °C	30 °C
N	0,95 ± 0,05	0,94 ± 0,07	0,92 ± 0,09
Kd (μmol.L ⁻¹)	1,8 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2
ΔH_{app} (kcal.mol ⁻¹)	-5,5 ± 0,3	-6,0 ± 0,2	-6,6 ± 0,1
ΔS_{app} (cal.mol ⁻¹ K ⁻¹)	7,5 ± 1,1	5,6 ± 0,7	3,9 ± 0,4
ΔG_{app} (kcal.mol ⁻¹)	-7,71 ± 0,05	-7,67 ± 0,06	-7,75 ± 0,03
<i>PfHsp90M</i> [#] e <i>PfAha4</i>			
Parâmetros	20 °C	25 °C	30 °C
N	0,86 ± 0,09	0,94 ± 0,06	0,89 ± 0,06
Kd (μmol.L ⁻¹)	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2
ΔH_{app} (kcal.mol ⁻¹)	-8,3 ± 0,1	-8,7 ± 0,3	-9,5 ± 0,3
ΔS_{app} (cal.mol ⁻¹ K ⁻¹)	-2,0 ± 0,6	-3,2 ± 0,9	-5,8 ± 1,0
ΔG_{app} (kcal.mol ⁻¹)	-7,67 ± 0,05	-7,75 ± 0,06	-7,72 ± 0,05

[#] Consideradas como monômeros

Fonte: Autoria própria.

Figura 23. Assinatura termodinâmica da interação entre *PfHsp90* e construções, com a *PfAha4*, em 25 °C.

Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros termodinâmicos da interação entre a proteína *PfHsp90* e a co-chaperona *PfAha4*, foram previamente determinados por outro integrante do grupo, empregando as mesmas condições (Minari, 2018). A 25 °C a K_D foi de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, indicando que há maior afinidade da *PfAha4* pela proteína completa e funcional, na forma de dímero. O valor de ΔG_{app} foi de $-8,00 \pm 0,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H_{app} = -14,0 \pm 0,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $\Delta S_{app} = -20 \pm 2 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ e $\Delta C_{p,app} = -290 \pm 90 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

A estequiometria da interação com a proteína completa é de 2:1, ou seja, duas moléculas de Aha4 interagem com um dímero de Hsp90 (Minari, 2018, p. 80). Neste caso, mediante os dados observados na Tabela 11, a estequiometria é 1:1 (uma molécula de Aha4 interage com um monômero de Hsp90NM ou Hsp90M). Mediante análise da assinatura termodinâmica (Figura 23), nota-se que para ambos os casos a interação é dirigida entalpicamente ($\Delta H_{app} < 0$), contudo a *PfHsp90M* apresenta um custo entrópico ($\Delta S_{app} < 0$), e a *PfHsp90NM* é dirigida entropicamente também, pois tem interação favorecida pela entropia ($\Delta S_{app} > 0$) em todas as temperaturas testadas. A proteína completa apresenta maior ΔH_{app} , indicando que há maior liberação de calor quando o complexo real *PfHsp90:PfAha4* é formado (Minari, 2018). É esperado que sejam adicionadas diminuições nos graus de liberdade com a ligação de Aha4, visto que, a Hsp90 inicialmente pode experimentar diversos estados conformacionais e por advento da interação a estrutura fica restrita a menor número de conformações, como observado para a Hsp90M. Entretanto, a Hsp90NM tem variação positiva da entropia, possivelmente relacionada ao fato de que esta estrutura apresenta dois domínios conectados por um *linker* alongado, conferindo flexibilidade e autonomia entre as regiões, e quando observados os

valores de K_D e ΔH_{app} nota-se que a interação está localizada com maior afinidade no domínio M, isto implica em maior liberdade conformacional do domínio N.

Segundo a literatura, a interação ocorre pelo contato dos domínios N e C de Aha1, com os domínios N e M de Hsp90 por meio de interações fracas. Existe um motivo estrutural RKXXK, sendo R um resíduo de arginina, K de lisina e X de um aminoácido qualquer, presente no domínio N de Aha1 que parece estar relacionado ao mecanismo de estimulação da Hsp90, em levedura este motivo tem a função de liberar Arg380 de interações intermoleculares no domínio M da Hsp90 e direcioná-lo para o N de Aha1, como resultado a função catalítica da co-chaperona é executada (Meyer *et al.*, 2004; Horvat *et al.*, 2014). Como já citado na seção de Introdução, a Aha4 é uma proteína de *P. falciparum* referente ao domínio canônico C-terminal, portanto não apresenta o motivo estrutural e não obedece o mecanismo mencionado, a não ser pela localização da interação no domínio M da Hsp90 que ocorre pelo contato do domínio C-terminal canônico, e não do domínio N-terminal canônico, da Aha1, que é a forma canônica e não existente neste parasito.

Houve um aumento do valor da K_D juntamente com a temperatura para ambas as construções, e o ΔG_{app} permaneceu constante, em torno de $7,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para todos os casos apresentados, este resultado indica que há compensação entalpia-entropia mediante alterações térmicas. A partir dos valores de ΔH_{app} nas três temperaturas pode-se calcular o $\Delta C_{p,app}$, sendo $\Delta C_{p,app} = -110 \pm 30 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $-120 \pm 40 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ para as construções NM e M, respectivamente (Figura 22), a variação da capacidade calorífica fornece informações sobre a natureza das interações que conduzem a formação do complexo, neste caso, o valor negativo indica que há dessolvatação de moléculas de água superficiais, em decorrência da ligação, sugerindo que a interação ocorra majoritariamente por contatos hidrofóbicos, de maneira contrária ao observado para a interação de Aha1 com Hsp90 de outros organismos, que envolve interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (Meyer *et al.*, 2004; Velazquez-Campoy *et al.*, 2004; Seraphim *et al.*, 2013).

3. CONCLUSÕES

A clonagem de *PfHsp90NM* foi realizada com êxito, os testes de verificação confirmaram a identidade do vetor de expressão pET28a::*PfHsp90NM*.

As proteínas *PfHsp90*, *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* foram produzidas e obtidas com grau de pureza adequado, homogêneas em solução e com rendimento satisfatório.

As proteínas foram obtidas estruturadas, a *PfHsp90NM* possui maior conteúdo de hélice α do que a *PfHsp90M*, indicando que o domínio N é mais rico neste tipo de estrutura.

Os triptofanos estão parcialmente expostos ao solvente em *PfHsp90NM* e *PfHsp90M*, todavia, devido à localização dos triptofanos no C-terminal, *PfHsp90* exibe maior valor de $\lambda_{\text{máx}}$ do que as construções, indicando maior exposição dos triptofanos ao solvente.

O perfil de eluição das proteínas por aSEC em conjunto com o resultado do experimento de *crosslinking* químico e SAXS, sugerem que *PfHsp90NM* e *PfHsp90M* permanecem no estado monomérico em solução e mostram que a *PfHsp90* tende a se organizar majoritariamente como dímero; neste caso há um equilíbrio entre as espécies monômero e dímero, portanto a oligomerização é um processo concentração-dependente. Para todas as proteínas em estudo foi observada uma tendência com relação à forma, quanto maior o número de domínios mais alongada e flexível é a estrutura. A partir das curvas de SAXS foram obtidos os envelopes, da proteína e construções em solução, empregando o modelo *ab initio*.

Em termos de estabilidade química foram observados dois estágios de desenovelamento para todas as proteínas. A *PfHsp90M*, referente a um único domínio, apresentou transições discretas, entretanto a *PfHsp90NM* e *PfHsp90* exibiram perda estrutural mais pronunciada, possivelmente relacionada ao efeito de cooperatividade entre os domínios.

A partir da estabilidade térmica foi possível notar que o domínio N da *PfHsp90* é menos estável do que o domínio M, e também menos estável do que o domínio N de proteínas ortólogas. A *PfHsp90* e *PfHsp90NM* demonstraram afinidade por nucleotídeos adenosina, sendo que ambas tiveram o domínio N estabilizado quando ligadas a ATP e ADP.

A proteína *PfHsp90* foi obtida funcional com baixa atividade ATPásica, e teve sua atividade estimulada em cerca de 4 vezes por *PfAha4*.

A estequiometria da interação de *PfAha4* com *PfHsp90NM* ou *PfHsp90M* foi de 1:1, e a constante de afinidade de baixa concentração micromolar, o mecanismo de interação foi dirigido entalpicamente em ambos os casos, com custo entrópico para a *PfHsp90M*. O cerne da associação ocorre entre *PfAha4* e o domínio M de *PfHsp90* por meio de interações hidrofóbicas com liberação de moléculas de água.

REFERÊNCIAS

- BARROTT, J. J.; HAYSTEAD, T. A. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. **Febs j**, v. 280, n. 6, p. 1381-96, Mar 2013.
- BATISTA, F. A. et al. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **Febs j**, v. 282, n. 2, p. 388-406, Jan 2015a.
- BATISTA, F. A. et al. From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/Hsp90 Network. **Curr Protein Pept Sci**, Mai 2015b.
- BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, 2003. p.5142-7.
- BORGES, J. C. et al. Phosphate closes the solution structure of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch Biochem Biophys**, v. 452, n. 2, p. 156-64, Ago 2006.
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Arch Biochem Biophys**, v. 452, n. 1, p. 46-54, Ago 2006.
- BORGES, J. C. et al. A review of multi-domain and flexible molecular chaperones studies by small-angle X-ray scattering. **Biophys. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 107-120, 2016.
- BOZAYKUT, P.; OZER, N. K.; KARADEMIR, B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 77, p. 195-209, Dez 2014.
- BUCHNER, J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 4, p. 136-41, Abr 1999.
- CHUA, C. S. et al. Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 233-45, Jan 2012.
- CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure of the ATP-binding domain of *Plasmodium falciparum* Hsp90. **Proteins**, v. 78, n. 13, p. 2738-44, Out 2010.
- COTO, A. L. S. et al. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* SGT co-chaperone indicate that it shares structural features with HIP and can interact with both Hsp90 and Hsp70 with similar affinities. **Int J Biol Macromol**, v. 118, n. Pt A, p. 693-706, Out 2018.
- CUNNINGHAM, C. N.; KRUKENBERG, K. A.; AGARD, D. A. Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. **J Biol Chem**, v. 283, n. 30, p. 21170-8, Jul 2008.
- DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: an essential mortalin co-chaperone. **Int J Biol Macromol**, v. 56, p. 140-8, Mai 2013.

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, Jan 2015.

DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* mitochondrial Hsp70: Similarities and dissimilarities to human orthologues. **Arch Biochem Biophys**, v. 613, p. 43-52, Jan 1 2017.

EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophys J**, v. 66, n. 2 Pt 1, p. 482-501, Fev 1994.

FIORAMONTE, M. et al. Analysis of secondary structure in proteins by chemical cross-linking coupled to MS. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2746-52, Ago 2012.

FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101-109, Dez 2009.

FISHER, G. J. et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v. 379, n. 6563, p. 335-9, Jan 1996.

FREY, S. et al. The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. **J Biol Chem**, v. 282, n. 49, p. 35612-20, Dez 2007.

FRISHMAN, D.; ARGOS, P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. **Proteins**, v. 23, n. 4, p. 566-79, Dez 1995.

GARG, G.; KHANDELWAL, A.; BLAGG, B. S. Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. **Adv Cancer Res**, v. 129, p. 51-88, 2016.

GARNIER, C. et al. Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. **J Biol Chem**, v. 277, n. 14, p. 12208-14, Abr 2002.

GETHING, P. W. et al. Mapping *Plasmodium falciparum* Mortality in Africa between 1990 and 2015. **N Engl J Med**, v. 375, n. 25, p. 2435-2445, Dez 22 2016.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **J Biomol Tech**, v. 21, n. 4, p. 167-93, Dez 2010.

GOMES, A. P. et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, Set 2011.

HARRIS, S. F.; SHIAU, A. K.; AGARD, D. A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. **Structure**, v. 12, n. 6, p. 1087-97, Jun 2004.

HAINZL, O. et al. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 34, p. 22559-67, Ago 2009.

HELLENKAMP, B. et al. Multidomain structure and correlated dynamics determined by self-consistent FRET networks. **Nat Methods**, v. 14, n. 2, p. 174-180, Fev 2017.

- HESSLING, M.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 3, p. 287-93, Mar 2009.
- HORVAT, N. K. et al. A mutation in the catalytic loop of Hsp90 specifically impairs ATPase stimulation by Aha1p, but not Hch1p. **J Mol Biol**, v. 426, n. 12, p. 2379-92, Jun 2014.
- KAWAGUCHI, K.; SAITO, H.; NAGAO, H. Decomposition analysis of free energy profile for Hsp90-ADP association. Out 2015.
- KONAREV, P. V. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **J App Crystallogr**, v. 36, p. 1277-1282, 2003.
- KRUKENBERG, K. A. et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. **Q Rev Biophys**, v. 44, n. 2, p. 229-55, Mai 2011.
- LAKOWICS, J.R. Protein Fluorescence. In: (Ed.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer, Boston, MA, 2006
- LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 5, p. 560-6, Oct 2001.
- LI, J.; BUCHNER, J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. **Biomed J**, v. 36, n. 3, p. 106-17, Jun 2013.
- LI, J. et al. Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 3, p. 326-31, Mar 2013b.
- LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-35, Mar 2012.
- LUO, W. et al. Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. **Mol Neurodegener**, v. 5, p. 24, Jun 2010.
- Malaria, U.S. Armed Forces 2016. **MSMR**, v. 24, n. 1, p. 2-7, Jan 2017.
- MAYER, M. P.; LE BRETON, L. Hsp90: breaking the symmetry. **Mol Cell**, v. 58, n. 1, p. 8-20, Abr 2015.
- MCCLELLAN, A. J. et al. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 121-35, Out 5 2007.
- MCLAUGHLIN, S. H.; SMITH, H. W.; JACKSON, S. E. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. **J Mol Biol**, v. 315, n. 4, p. 787-98, Jan 2002.
- MCLAUGHLIN, S. H. et al. Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform. **J Mol Biol**, v. 344, n. 3, p. 813-26, Nov 2004
- MEYER, P. et al. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. **Mol Cell**, v. 11, n. 3, p. 647-58, Mar 2003.

MEYER, Y. P.; PRODROMOU, C.; LIAO, C.; HU, B.; ROE, S.M.; VLASIC, I.; PANARETOU, B.; PIPER P.W.; PEARL, L.H. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO J**, v. 23, n. 6, p. 1402-10, Mar 2004.

MICKLER, M. et al. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 3, p. 281-6, Mar 2009.

MINARI, K.; BORGES, J. C. **Estudos funcionais comparativos de Hsp90 de diferentes organismos**. 2018. 102p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de São Carlos.

MOLLAPOUR, M.; NECKERS, L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 648-55, Mar 2012.

MYERS, J. K. Chemical Denaturation. **Molecular Life Sciences**. Springer, New York, NY, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2014. 1298p.

NEMOTO, T. et al. Mechanism of Dimer Formation of the 90-kDa Heat-Shock Protein. **Eur. J. Biochem**, v. 233, p. 1-8, 1995.

ORTEGA, A.; AMORÓS, D.; GARCÍA DE LA TORRE, J. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. **Biophys J**, v. 101, n. 4, p. 892-8, Ago 2011.

PAVITHRA, S. R.; KUMAR, R.; TATU, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **PLoS Comput Biol**, v. 3, n. 9, p. 1701-15, Set 2007.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17050, Ago 2017.

PICARD, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 10, p. 1640-8, Out 2002.

PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods**, v. 19, n. 2, p. 213-21, Out 1999.

PIHLAJAMAA, T. et al. Structure of *Plasmodium falciparum* TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. **Biochem J**, v. 450, n. 3, p. 469-76, Mar 2013.

POSFAI, D. et al. Identification of Hsp90 inhibitors with anti-*Plasmodium* activity. **Antimicrob Agents Chemother**, Jan 2018.

POWERS, M. V.; WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. **FEBS Lett**, v. 581, n. 19, p. 3758-69, Jul 2007.

PRODROMOU, C. et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65-75, Jul 1997.

RAMOS, C. H.; FERREIRA, S. T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 3, p. 213-22, Abr 2005.

RATZKE, C. et al. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 37, p. 16101-6, Set 2010.

RATZKE, C.; B., H.; T., H. Four-colour FRET reveals directionality in the Hsp90 multicomponent machinery. **Nature Communications**, v. 5, p. 4192, Jun, 2014.

RICHTER, K. et al. Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 33689-96, Set 2001.

RICHTER, K.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 44905-10, Nov 2002.

RICHTER, K.; SOROKA, J.; SKALNIAK, L.; LESKOVAR, A.; HESSLING, M.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. **J Biol Chem**, v. 283, n. 26, p. 17757-65, Jun 2008.

RUTHERFORD, S. L.; LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. **Nature**, v. 396, n. 6709, p. 336-42, Nov 1998.

SCHEIBEL, T. et al. ATP-binding properties of human Hsp90. **J Biol Chem**, v. 272, n. 30, p. 18608-13, Jul 1997.

SCHEUFLER, C. et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 199-210, Abr 2000.

SCHOPF, F. H.; BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 345-360, Jun 2017.

SERAPHIM, T. V. et al. Low resolution structural studies indicate that the activator of Hsp90 ATPase 1 (Aha1) of *Leishmania braziliensis* has an elongated shape which allows its interaction with both N- and M-domains of Hsp90. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. **Estudo estrutural da co-chaperona Aha1 (Activator of Hsp90 ATPase 1) *Leishmania braziliensis* e da sua ação sobre o ciclo funcional da Hsp90**. 2015. 90p. (Tese de Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SERAPHIM, T. V. et al. The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function. **Arch Biochem Biophys**, v. 565, p. 57-67, Jan 2015.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The interaction networks of Hsp70 and Hsp90 in the *Plasmodium* and *Leishmania* parasites. In: (Ed.). **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**: Springer New York, 2014.

SERAPHIM, T. V. et al. Insights on the structural dynamics of *Leishmania braziliensis* Hsp90 molecular chaperone by small angle X-ray scattering. **Int J Biol Macromol**, v. 97, p. 503-512, Abr 2017.

- SHIAU, A. K. et al. Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 329-40, Out 2006.
- SMITH, H. L.; LI, W.; CHEETHAM, M. E. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 40, p. 142-52, Abr 2015.
- SILVA, N. S. M. et al. Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in Plasmodium falciparum genome. **Int J Biol Macromol**, v. 108, p. 193-204, Mar 2018.
- SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 1, p. 351-61, Jan 2013.
- SINGH, M.; SHAH, V.; TATU, U. A novel C-terminal homologue of Aha1 co-chaperone binds to heat shock protein 90 and stimulates its ATPase activity in Entamoeba histolytica. **J Mol Biol**, v. 426, n. 8, p. 1786-98, Abr 2014.
- STEBBINS, C. E. et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 239-50, Abr 1997.
- STRAVOPODIS, D. J.; MARGARITIS, L. H.; VOUTSINAS, G. E. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 29, p. 3122-38, 2007.
- SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, Jan 1992.
- TSUTSUMI, S. et al. Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 8, p. 2937-42, Fev 2012.
- VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; LEAVITT, S. A.; FREIRE, E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. **Methods Mol Biol**, v. 261, p. 35-54, 2004.
- WANG, X. et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 803-15, Nov 2006.
- WAYNE, N.; BOLON, D. N. Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. **J Biol Chem**, v. 282, n. 48, p. 35386-95, Nov 2007.
- WEIKL, T.; ABELMANN, K.; BUCHNER, J. An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. **J Mol Biol**, v. 293, n. 3, p. 685-91, Out 1999.
- WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. **J Biol Chem**, v. 257, n. 24, p. 14949-59, Dez 25 1982.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, Mai 2008.

WHO | World malaria report 2017. World Health Organization, Nov 2017.

WOODFORD, M. R. et al. The FNIP co-chaperones decelerate the Hsp90 chaperone cycle and enhance drug binding. **Nat Commun**, v. 7, p. 12037, Jun 2016.

YOUNG, J. C.; MOAREFI, I.; HARTL, F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **J Cell Biol**, v. 154, n. 2, p. 267-73, Jul 2001.

ZHANG, H. et al. A dynamic view of ATP-coupled functioning cycle of Hsp90 N-terminal domain. **Sci Rep**, v. 5, p. 9542, Abr, 2015.

ZHAO, R. et al. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 715-27, Mar 2005.