UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Letícia Sayuri Nishimura

**Expressão e caracterização estrutural de chaperona Hsp70
mitocondrial de *Leishmania braziliensis***

São Carlos

2017

Letícia Sayuri Nishimura

**Expressão e caracterização estrutural de chaperona Hsp70
mitocondrial de *Leishmania braziliensis***

Dissertação de Mestrado 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

São Carlos

2017

Nome: Letícia Sayuri Nishimura

Título: Expressão e caracterização estrutural de chaperona Hsp70 mitocondrial de *Leishmania braziliensis*

Dissertação de Mestrado 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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Júlio C. Borges pela imensa empatia e paciência, além da oportunidade de orientação.

Agradeço aos colegas de laboratório pelos bons, em especial ao Dr. Paulo Roberto das Dores da Silva, por ensinar os primeiros passos do árduo caminho que é trabalhar com Hsp70.

Agradeço ao Pedro, companheiro de madrugadas sem fim nas “aventuras de ITC” e “odisseias de purificação”, por sua paciência e solicitude (principalmente por me levar lanches).

Agradeço, por fim, aos seguranças do instituto que sempre estiveram dispostos a ajudar nos diversos infortúnios que podem ocorrer, sobretudo durante a noite.

Resumo

As chaperonas moleculares da família Hsp70 desempenham funções cruciais nas células de todos os organismos vivos, de procariotos a eucariotos. Nestes, estão presentes em todos os compartimentos celulares e nas mitocôndrias é expressa uma isoforma própria (mtHsp70), que participa dos processos enovelamento e maturação de proteínas bem como de sua importação para a matriz mitocondrial. Diante da crescente demanda de pesquisa sobre doenças tropicais negligenciadas, foi tomado como objeto de estudo neste trabalho uma Hsp70 mitocondrial de *Leishmania braziliensis* (LbmtHsp70) com o intuito de caracterizá-la estrutural e funcionalmente em comparação à ortóloga humana com maior identidade: a mtHsp70 também chamada de mortalina, GRP75, HspA9 ou PBP74. A LbmtHsp70 foi purificada em sua forma enovelada, em sistema monodisperso apresentando dados hidrodinâmicos condizentes com a forma monomérica, foi testada sua estabilidade quanto à influência de nucleotídeos de adenosina (ATP e ADP) à sua estrutura e, por fim, foram feitos ensaios para avaliar sua atividade ATPásica e de energia de interação com nucleotídeos. De forma geral, a LbmtHsp70 é bastante similar à mortalina, como pode ser evidenciado pelos resultados obtidos com algumas particularidades.

Palavras-chave: mtHsp70, chaperona molecular, mitocôndria, *Leishmania braziliensis*

Abstract

The molecular chaperones from Hsp70 family perform critical cell roles in all organisms, from prokaryotes to eukaryotes. In the last ones, they are found in all cell compartments and a particular isoform is expressed in the mitochondria, where it carries out folding and maturation processes as well as the import of proteins to the mitochondrial matrix. In face of the growing demand for research about neglected tropical diseases, in this study a Hsp70 from *Leishmania braziliensis*'s mitochondria was taken as object of study for further structural and functional characterization in comparison to the human orthologous which presents the highest identity to LbmtHsp70: the mtHsp70 also known as mortalin, GRP75, HspA9 or PB74. LbmtHsp70 was obtained in folded state in monodisperse system with hydrodynamic data consistent to monomeric conformer, stability and adenosine nucleotides influence to its structure were analyzed, and were performed assays for ATPase activity and nucleotide interaction energy. In a general way LbmtHsp70 is very similar to mortalin as can be shown through the results, but with some peculiarities.

Keywords: mtHsp70, molecular chaperone, mitochondria, *Leishmania braziliensis*

Lista de Figuras

Figura 1: Representação dos estados de afinidade à proteína-cliente das Hsp70.

Figura 2: Ciclo de vida de Leishmania.

Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos da LbmtHsp70, mortalina e DnaK.

Figura 4: SDS-PAGE 12% com a expressão da LbmtHsp70

Figura 5: Espectros de dicroísmo circular da LbmtHsp70.

Figura 6: Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da LbmtHsp70.

Figura 7: Perfil hidrodinâmico da LbmtHsp70.

Figura 8: Curvas de espalhamento de raios-X da LbmtHsp70.

Figura 9: Modelo *ab initio* gerado pelo DAMAVER.

Figura 10: Modelos por homologia da LbmtHsp70 nas conformações aberta e fechada.

Figura 11: Análise de estabilidade em geladeira e mediante concentração.

Figura 12: Agregação da LbmtHsp70 em concentrações variadas e sob temperatura de 37 °C.

Figura 13: Espectros de dicroísmo circular da LbmtHsp70 e desenovelamento término na presença e ausência de nucleotídeos.

Figura 14: Interação da LbmtHsp70 com nucleotídeos.

Figura 15: Dados cinéticos da atividade ATPásica calculada por ajuste de Michaelis-Menten.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados estimados pelo Sednterp a partir da sequência primária.

Tabela 2: Valores obtidos para validação estrutural dos modelos.

Tabela 3: Dados hidrodinâmicos determinados para a LbmtHsp70.

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
aSEC	Cromatografia de exclusão molecular analítica (do inglês <i>Analytical Size Exclusion Chromatography</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Ultracentrifugação analítica (do inglês <i>Analytical Ultracentrifugation</i>)
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>Circular Dichroism</i>)
ClpB	<i>Caseinolytic peptidase B</i> , uma co-chaperona do sistema Hsp70
D_{max}	Distância máxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DnaK	Hsp70 de <i>Escherichia coli</i>
<i>f/f₀</i>	Razão friccional
GRpE	Co-chaperona do Sistema Hsp70
His-tag	Cauda de poli-Histidina
Hsp	Proteína de choque térmico (do inglês <i>Heat Shock Protein</i>)
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IPTG	isopropil-tio-β-galactosídeo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica (do inglês <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
<i>J protein</i>	Proteína com domínio J
k_{av}	Coeficiente de partição
k_{cat}	<i>turnover number</i>
K_M	Constante de Michaelis
LbHep1	Hsp70-escort protein 1 de <i>Leishmania braziliensis</i>
LbmtHsp70	Hsp70 mitocondrial de <i>Leishmania braziliensis</i>
MESG	2-amino-6-mercaptopurina-7-metilpurina-ribonucleosídeo
MM	Massa molecular
MM_{app}	Massa molecular aparente
mtHsp70	Hsp70 mitocondrial humana
NBD	Domínio ligante de nucleotídeo (do inglês <i>Nucleotide Binding Domain</i>)
NEF	Fator de troca de nucleotídeo (do inglês <i>Nucleotide Exchange Factor</i>)
nm	Nanômetros (10 ⁻⁹ metros)
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PBD	Domínio ligante de proteína-cliente (do inglês <i>Protein Binding Domain</i>)

PDB	do inglês <i>Protein Data Bank</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PNP	do inglês <i>Purine Nucleoside Phosphorylase</i>
q	Vetor de espalhamento de raios-X
R_g	Raio de giro
R_s	Raio de Stokes
s	Coeficiente de sedimentação
s⁰_{20,w}	s _{20,w} em diluição infinita
s_{20,w}	s corrigido para condições padrão de água a 20 °C
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (do inglês <i>Small Angle X-ray Scattering</i>)
SDS	Duodecil-sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Duodecyl-sulphate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida de SDS
T_m	Temperatura de desnaturação (do inglês <i>melting temperature</i>)
V_{max}	Velocidade máxima da reação
W106	Triptofano 106 da LbmtHsp70
W553	Triptofano 553 da LbmtHsp70

Lista de símbolos

Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ metros)
°C	Graus Celsius
<λ>	Centro de massa espectral
λ_{max}	Comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência
ΔH_{app}	Variação da entalpia de ligação aparente
ΔG_{app}	Energia de Gibbs aparente
ΔS_{app}	Variação da entropia de ligação aparente
[Θ]	Elipticidade molar residual média

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Chaperonas moleculares e seu papel na homeostase proteica	1
1.2	Sistema Hsp70	2
1.3	Leishmaniose	5
1.4	Objetivos.....	8
2	DESENVOLVIMENTO	9
2.1	Materiais e métodos	9
2.1.1	Expressão e purificação.....	9
2.1.2	Quantificação da concentração das proteínas	10
2.1.3	Dicroísmo circular	10
2.1.4	Fluorescência intrínseca	11
2.1.5	Cromatografia de exclusão molecular analítica	11
2.1.6	Ultracentrifugação analítica.....	12
2.1.7	Espalhamento de raios-X em baixo ângulo.....	12
2.1.8	Modelagem molecular por homologia	13
2.1.9	Atividade ATPásica.....	13
2.1.10	Calorimetria de titulação isotérmica	14
2.1.11	Ensaio de agregação	14
2.2	Resultados e discussão.....	15
2.2.1	LbmtHsp70 apresenta alta identidade com a mortalina	15
2.2.2	LbmtHsp70 é obtida na fração solúvel	17
2.2.3	LbmtHsp70 é produzida em estado enovelado	18
2.2.4	LbmtHsp70 é purificada em sistema monodisperso.....	20
2.2.5	A estabilidade da LbmtHsp70	25
2.2.6	Energias de interação com nucleotídeos	30
2.2.7	Atividade ATPásica.....	33
3	CONCLUSÃO	35
4	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Chaperonas moleculares e seu papel na homeostase proteica

Quase todos os processos biológicos demandam a ação de proteínas para catalisar reações, carrear ou encaminhar produtos, sinalização intra e intercelular, entre outros. Isso faz com que as proteínas constituam um sistema de suma importância para a manutenção e execução de atividades essenciais à vida. A grande abrangência desse sistema nas funções celulares reflete a diversidade e complexidade com a qual as proteínas adquiriram ao longo do processo evolutivo. Mais de 10 mil proteínas diferentes? são expressas em mamíferos e sintetizadas nos ribossomos como cadeias lineares que podem chegar a vários milhares de aminoácidos. Para que sejam funcionais, essas cadeias precisam atingir um estado de enovelamento chamado de “estado nativo”, que é a conformação tridimensional em que a proteína apresenta atividade (Hartl *et al.*, 2011). Anfinsen postulou que as proteínas possuem todas as informações necessárias em sua estrutura primária para o seu enovelamento correto (Anfinsen, 1973). Sabemos hoje, que devido ao ambiente celular repleto de outras moléculas, interações entre a proteína nascente e moléculas vizinhas, mutações genéticas, estresse celular, entre outros fatores, podem direcionar o seu enovelamento para conformações não funcionais ou agregados proteicos. Além disso barreiras cinéticas devem ser superadas, principalmente pelas proteínas flexíveis que têm uma maior tendência à desordem estrutural. Adicionalmente, intermediários parcialmente enovelados com sítios hidrofóbicos expostos tendem a “cair” em “armadilhas cinéticas” formando agregados amorfos ou fibras amiloides. Para contornar esses obstáculos e manter a homeostase celular, o proteoma tem evoluído classes de proteínas que auxiliam o processo de enovelamento direcionando esses intermediários para sua conformação nativa. Na impossibilidade de reparar ou direcionar para sistemas que o faça, essas proteínas auxiliares também direcionam as cadeias não funcionais, não enoveladas e agregados para serem processados pelo proteassoma. Essas proteínas responsáveis pelo controle de qualidade proteica, que acompanham do início ao fim suas proteínas-cliente, compõem o grupo de proteínas classificadas como chaperonas moleculares (Hartl *et al.*, 2011; Brandvold e Morimoto, 2015; Ostankovitch e Buchner, 2015; Wolynes, 2015; Balchin *et al.*, 2016).

Várias famílias de chaperonas moleculares guiam o processo de enovelamento, evitando ou revertendo conformações erradas ou agregação. Seus membros são frequentemente designados como proteínas de choque térmico (Hsp – *Heat-shock*

proteins) por terem expressão aumentada em condições de estresse térmico, entre outras condições nocivas à célula. As maiores famílias de chaperonas são classificadas pelo peso molecular: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 e sHsp). As chaperonas moleculares que atuam no enovelamento *de novo* são as chaperoninas (Hsp60) e os sistemas Hsp70 e Hsp90. Elas são capazes de reconhecer resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos por proteínas parcialmente enoveladas ou desenoveladas e promovem seu enovelamento através de mecanismo regulado por ligação ao ATP. A ligação às formas não nativas também previne agregação e favorece a reversão de enovelamentos incorretos (Borges e Ramos, 2005; Balchin *et al.*, 2016).

As funções das chaperonas moleculares distinguem-se de acordo com a ação sobre a proteína-cliente em três tipos: *enovelases*, *segurases* e *disagregases* (Mayer, 2010; Hartl *et al.*, 2011; Mokry *et al.*, 2015).

- *Enovelases* ou *foldases*: auxiliam enovelamento e reenovelamento. Exemplos: Hsp70 e Hsp90.
- *Segurases* ou *holders*: ligam-se à proteína-cliente, segurando-a para que outras chaperonas ajam ou para prevenir enovelamento incorreto, desenovelamento ou agregação. Exemplos: sHsp e Hsp40.
- *Disagregases*: são capazes de dissociar agregados. Exemplo: Hsp100.

1.2 Sistema Hsp70

As Hsp70 são altamente conservadas entre as espécies e encontram-se em praticamente todos os compartimentos de células eucarióticas. Possuem um papel central entre as chaperonas moleculares na homeostase proteica por receberem e encaminharem proteínas-cliente de e para outras famílias de chaperonas moleculares. Atuam ligando-se a proteína-cliente enovelada ou parcialmente enovelada e auxiliam seu enovelamento prevenindo sua agregação ou encaminhando-a para outras chaperonas; assistem também o transporte de proteínas através de membrana e encaminhamento para degradação pelo sistema proteassoma (Borges e Ramos, 2005; Mayer e Bukau, 2005; Daugaard *et al.*, 2007; Da Silva e Borges, 2011; Saibil, 2013). A isoforma mitocondrial (mtHsp70) atua no complexo de importação de proteínas à mitocôndria e auxiliam seu enovelamento. Além disso, têm expressão aumentada em condições de estresse celular e mantêm a homeostase proteica mitocondrial (Bohnert *et al.*, 2007; Biyani *et al.*, 2011).

As Hsp70 são constituídas de dois domínios: um na porção N-terminal com atividade ATPásica (NBD – *nucleotide binding domain*) e o outro na porção C-terminal que interage com as proteínas-cliente (PBD – *protein binding domain*) (Mayer e Bukau, 2005; Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). Tais domínios regulam-se mutuamente, o que é designado como alosteria heterotrópica bidirecional (Da Silva e Borges, 2011), levando a alterações conformacionais com menor ou maior afinidade pelas proteínas-cliente (Figura 1). O estado aberto é induzido pela ligação ao ATP e apresenta baixa afinidade pela proteína-cliente; o PBD e o NBD encontram-se acoplados e o PBD adota uma conformação aberta. A ligação de uma proteína-cliente ao PBD é mediada por uma co-chaperona e essa interação estimula a atividade ATPásica do NBD; como resultado o ATP ligado é hidrolisado a ADP. Tendo ADP ligado ao NBD, a chaperona apresenta a conformação fechada (PBD e NBD desacoplados, porém PBD fica “fechado” em torno da proteína-cliente) com alta afinidade por proteínas-cliente e a troca desse nucleotídeo (que pode ser mediada por co-chaperona) por ATP restaura o estado de baixa afinidade do PBD por proteínas-cliente favorecendo a dissociação desta e seu seguimento para o destino adequado. A transdução de sinal entre os domínios que promove a regulação entre os estados conformacionais não ocorre por uma mesma via. Importante, a via pela qual o NBD regula o PBD é independente da via de regulação no sentido oposto (Kityk *et al.*, 2015).

Essa família de chaperonas demonstra atividade ATPásica baixa em comparação com outras enzimas que desempenham a mesma atividade catalítica. Perturbações na interface de interação entre os domínios provocam seu desacoplamento, suspendendo a inibição da atividade ATPásica (Kityk *et al.*, 2015) (estado aberto possui os domínios acoplados e essa conformação promove inibição da atividade ATPásica). As *J proteins* são as principais co-chaperonas descritas até agora que atuam na seleção de proteínas-cliente para as Hsp70 e no estímulo da hidrólise do ATP pelas Hsp70 aumentando a sua afinidade pelas proteínas-cliente. A transição do estado fechado para o aberto é seguida da liberação da proteína-cliente. Para que isso ocorra, o ADP deve ser dissociado do NBD da Hsp70, no entanto, seu baixo coeficiente de dissociação permite que isso ocorra de forma relativamente lenta. Os fatores de troca de nucleotídeo (*nucleotide exchange factors* – NEFs) são co-chaperonas com alta afinidade pela conformação fechada das Hsp70 que facilitam a dissociação do ADP e, conseqüentemente, propiciam a transição do estado fechado para o aberto com a liberação da proteína-cliente (Doyle *et al.*, 2015). A regulação da atividade das Hsp70 é muito importante, pois sem ela a interação das Hsp70 com as

demais proteínas seria promíscua e permanente, não apresentando especificidade e efetividade.

Figura 1: Representação dos estados de afinidade à proteína-cliente das Hsp70 (NBD em branco e PBD em preto). As proteínas representadas são modelos do PDB, porém os complexos formados são meramente ilustrativos e não foram obtidos de modelos dos complexos reais. (1) *J protein* (vermelho, 3AGY.pdb) medeia a interação da Hsp70 (estado aberto, 4B9Q_A.pdb) com sua proteína-cliente (verde). (2) A *J protein* propicia alternância conformacional da Hsp70 por meio de estímulo da hidrólise do ATP, induzindo a Hsp70 ao seu estado fechado (2KHO.pdb) ligado ao ADP, que possui maior afinidade pela proteína-cliente. (3) O fator de troca de nucleotídeo (NEF – *nucleotide exchange factor*, em azul, 1DKG.pdb) liga-se ao estado fechado da Hsp70 ocasionando a liberação do ADP, a ligação do ATP (4) e mudança da conformação da Hsp70 para o estado aberto. (5) O estado ligado ao ATP possui baixa afinidade pelo NEF e pela proteína-cliente, que são então dissociados.

Fonte: adaptado de Kampinga & Craig (Kampinga e Craig, 2010) e Protein Data Bank Japan (Ito, 2016).

As *J proteins* além de atuarem como estimuladoras da atividade ATPásica também atuam como carreadores de proteínas-cliente, otimizando a especificidade das Hsp70. Já os NEFs atuam recuperando as Hsp70 aos seus estados abertos,

porém a uma taxa que mantém a efetividade do sistema chaperona. Ou seja, mantendo uma razão NEF/Hsp70 que não prejudique o tempo de interação entre a chaperona e proteína-cliente necessário para que ocorra a atividade chaperona (Kampinga e Craig, 2010). A dissociação da proteína-cliente possui importância maior na atividade chaperona do que a atividade ATPásica, pois sua manutenção é essencial para que a Hsp70 desempenhe sua função, enquanto que a variação na capacidade de hidrolisar o ATP não afeta sua funcionalidade de forma expressiva (Kityk *et al.*, 2015).

1.3 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma enfermidade endêmica de regiões tropicais causadas por parasitos intracelulares (protozoários da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*) transmitidos a humanos através da picada da fêmea do mosquito-palha. A doença é caracterizada por lesões ulcerosas que produzem extensas alterações morfofuncionais dos tecidos cutâneo, visceral e/ou muco cutâneo, dependendo da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro, sendo a forma visceral a mais grave e responsável por 20 a 30 mil mortes anualmente. São conhecidas mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de causar a doença e estima-se que cerca de 1,3 milhões de novos casos surgem por ano, dentre as 310 milhões de pessoas ao redor do mundo que se encontram em risco de infecção – principalmente as populações de baixa renda sem acesso a serviços e produtos de saúde e saneamento básico. Apesar de apresentar risco a milhões de pessoas e causar milhares de mortes anualmente, o desenvolvimento de novos tratamentos não atraem interesse comercial devido ao baixo poder socioeconômico das populações atingidas (maior parte em países em desenvolvimento) e às morbidade e mortalidade relativamente baixas em comparação a outras doenças. Por essa razão, a Leishmaniose integra o grupo de doenças tropicais negligenciadas que consta na agenda de desenvolvimento global da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO). O Brasil está entre os seis países com maior número de novos casos por ano de Leishmaniose visceral e tegumentar (lesões cutâneas e mucosas), causadas pelas espécies *L. chagasi* e *L. braziliensis*, respectivamente, sendo a última responsável por mais de 5 mil casos anualmente (Who, 2013).

A endemia em regiões tropicais não se dá ao acaso, pois apresentam temperatura, umidade e quantidade de matéria orgânica favoráveis à sobrevivência e à reprodução dos vetores: flebotomíneos, insetos hematófagos conhecidos

popularmente como mosquitos-palha. A fêmea do mosquito-palha ingere sangue de humanos e outros mamíferos para o desenvolvimento de seus ovos e é nesse ato que pode ser infectada pelos protozoários *Leishmania spp.* Ocorre desenvolvimento dos parasitos em seu sistema digestivo e, então, migração para o probóscide (estrutura alongada utilizada pelos hematófagos para sugar sangue), onde ficam disponíveis para serem inoculados nas próximas picadas (Cdc, 2013; Who, 2016). Durante seu ciclo de vida (Figura 2), os parasitos sofrem metamorfoses que os tornam resistentes às condições diversas as quais são expostos nos hospedeiros humano e mosquito-palha. No momento da picada da fêmea do mosquito-palha, são transmitidos em sua forma promastigota, cuja principal característica é o flagelo aparente.

No hospedeiro humano, os promastigotas são fagocitados por macrófagos ou outras células do sistema mononuclear fagocitário, dentro dos quais se diferenciam em amastigotas. Diminuição de pH, aumento de temperatura, menor oferta de nutrientes e ação enzimática nos fagolisossomos, desencadeiam a mudança para a forma amastigota, caracterizada pela internalização do flagelo e mudanças na superfície celular. Essas alterações no ambiente sinalizam para a ativação de mecanismos de resistência ao estresse celular, como o aumento da síntese *de novo* de chaperonas moleculares, que atuam na manutenção da homeostase proteica e favorecem os processos de adaptação e diferenciação do protozoário. Os amastigotas reproduzem-se por divisão binária dentro das células infectadas e eventualmente provocam a sua ruptura, sendo liberados para infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário. Esse processo causa a princípio uma inflamação local que pode ser contida pelo sistema imunológico ou evoluir para lesões ulcerosas na pele e vísceras. A fêmea do mosquito-palha ingere o sangue contendo macrófagos infectados por amastigotas que, em seu sistema digestivo, diferenciam-se em promastigotas procíclicos (não infeccioso) e reproduzem-se por divisão binária. Essa forma se diferencia em promastigota metacíclico (infeccioso), que migra para o probóscide, onde fica disponível para ser transmitido a um novo hospedeiro (Cdc, 2013; Seraphim *et al.*, 2014).

Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania*. (1) As formas promastigotas metacíclicas do protozoário infectam o hospedeiro mamífero através da picada do mosquito-palha, (2) são fagocitadas por células do sistema imunológico onde (3) se diferenciam em amastigotas dentro dos fagolisossomos, concomitantemente ao aumento de expressão de Hsp90 e Hsp70. (4) O mosquito-palha ingere o sangue contendo os macrófagos infectados por amastigotas e, neste hospedeiro, (5) o protozoário se diferencia em promastigota procíclico e metacíclico, reiniciando o ciclo.

Fonte: adaptado de (Seraphim *et al.*, 2014)

Os antimoniais pentavalentes são ainda os medicamentos de primeira escolha na maior parte do mundo, inclusive no Brasil, para tratamento de Leishmaniose e seu mecanismo de ação consiste em causar estresse oxidativo no parasito, levando à sua morte celular. No entanto, esse mecanismo é ineficiente em linhagens resistentes do parasito que são cada vez mais comuns. A resistência ao tratamento com antimônio é produzida pela superexpressão de proteínas que diminuem o estresse oxidativo, entre elas as chaperonas moleculares como Hsp70 e sua variedade mitocondrial (Brochu *et al.*, 2004; Biyani *et al.*, 2011). Outro tratamento popular da Leishmaniose utiliza a anfotericina B, que também provoca esse tipo de resistência nos parasitos, com aumento de expressão de Hsp70 e sua variedade mitocondrial, embora seu mecanismo de ação não opere por aumento de estresse oxidativo (Brotherton *et al.*, 2014). A relação entre a produção elevada de Hsp70 e sua variedade mitocondrial (LbmtHsp70) e o mecanismo de resistência aos fármacos pode ser explorada como alvo para novos tratamentos (Requena *et al.*, 2015). Com esse intuito, este trabalho tem como objetivo caracterizar, estrutural e funcionalmente, a Hsp70 mitocondrial de

L. braziliensis e avaliar seu potencial como alvo terapêutico no tratamento de Leishmaniose.

1.4 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo caracterizar estrutural e funcionalmente a LbmtHsp70 e compará-la com a isoforma humana, a mortalina, a fim de refletir sobre sua viabilidade como alvo terapêutico no tratamento das leishmanioses. As etapas atingidas para esse fim foram:

- Obter a LbmtHsp70 purificada.
- Adquirir informações sobre sua estrutura secundária e estrutura terciária local.
- Caracterizar sua estabilidade química e térmica.
- Obter informações sobre seu estado oligomérico e suas propriedades hidrodinâmicas teórica e experimental.
- Obter modelo estrutural em baixa resolução da LbmtHsp70.
- Avaliar sua funcionalidade e obter dados cinéticos e termodinâmicos de interação com nucleotídeos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 Expressão e purificação

Da mesma forma que a mortalina, a Lbmthsp70 recombinante foi co-expressa com a co-chaperona Hep1 de *L. braziliensis* (LbHep1), a fim de ser obtida na forma solúvel (Dores-Silva *et al.*, 2013; Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015). Ambos os DNAs codificantes das proteínas foram clonados previamente pelo grupo (Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015). O inserto de DNA correspondente à Lbmthsp70 (código de acesso GenBank XP_001566868) foi clonado no vetor de expressão pET28a, resultando no vetor pET28a::Lbmthsp70, fusionado a com sequência de histidina (His-tag). A clonagem da LbHep1 (código de acesso GenBank XM_001565523) gerou o vetor pET23a::LbHep1, sem cauda de histidina.

Os vetores descritos acima foram co-transformados em *Escherichia coli*, linhagem BL21(DE3). As células transformadas foram crescidas em meio LB contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, a 37 °C e agitação de 200 rpm. Ao atingir DO_{600} 0,7, a expressão foi induzida com a adição de 0,2 mmol.L^{-1} de isopropil-tio- β -galactosídeo (IPTG), por 18 horas e a 23 °C. Após a indução, as células foram separadas por centrifugação a 2600 x g, por 20 minutos, a 4°C. Os *pellets* formados foram ressuspensos em tampão 20 mmol.L^{-1} fosfato de sódio (pH 7,5), 100 mmol.L^{-1} NaCl e 20 mmol.L^{-1} imidazol, em seguida foram incubados com 5 U de DNase (Promega) e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ lisozima (Sigma), por 30 minutos no gelo. Os *pellets* foram então rompidos por sonicação e centrifugados a 20000 x g, a 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante foi então filtrado e injetado em coluna de afinidade ao níquel equilibrada com tampão 20 mmol.L^{-1} fosfato de sódio (pH 7,5), 100 mmol.L^{-1} NaCl e 20 mmol.L^{-1} imidazol. A eluição foi feita com mesmo tampão contendo 500 mmol.L^{-1} imidazol. O produto da eluição foi incubado por 4 horas com fosfatase alcalina (Promega) e, após, submetido à cromatografia de exclusão molecular preparativa (*size exclusion chromatography* - SEC) em coluna Superdex 200 pg 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada em tampão TKP (25 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 7,5, 50 mmol.L^{-1} NaCl, 5 mmol.L^{-1} fosfato de sódio, 5 mmol.L^{-1} KCl e 2 mmol.L^{-1} de β -mercaptoetanol), a 4 °C. Para os ensaios de atividade ATPásica, o tampão utilizado na SEC não continha fosfato (25 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 7,5, 50 mmol.L^{-1} NaCl, 5 mmol.L^{-1} KCl e 2 mmol.L^{-1} de β -mercaptoetanol).

2.1.2 Quantificação da concentração das proteínas

As concentrações das alíquotas recém purificadas ou concentradas foram medidas por espectrofotometria UV/visível segundo a lei de Beer-Lambert:

$$C = \frac{Abs}{l \times \epsilon} \quad (1)$$

onde C é a concentração (mol.L^{-1}), Abs é a absorbância a 280 nm, l é o passo ótico (cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$) particular de cada proteína (Tabela 1) (Pace *et al.*, 1995).

Ensaio em que o valor da concentração deve ser mais acurado envolveu quantificação pelo método de Edelhoch, que consiste em medir a absorbância das proteínas desnaturadas com solução de hidrocloreto de guanidina (6 mol.L^{-1}) (Edelhoch, 1967).

Tabela 1: Dados estimados pelo Sednterp a partir da sequência primária.

	ϵ em 280 nm ($\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$)		Massa Molar (Da)	Nº de aminoácidos
	Enovelada	Desenovelada		
LbmtHsp70	25900	24180	70903	653*
LbHep1	15470	15220	23295	220

* com His-tag

2.1.3 Dicroísmo circular

As medidas de dicroísmo circular (do inglês *circular dichroism* - CD) da LbmtHsp70 foram feitas em espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.) acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier PFD 425S, em tampão TKP pH 7,5, em concentrações entre 3,8 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e utilizando cubetas com passo ótico de 1 mm ou de 0,2 mm. Os espectros foram normalizados para a elipticidade molar residual média ($[\theta]$) empregando a equação:

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

onde, MRW é a massa média por resíduo, $[c]$ é a concentração de proteína em mol.L^{-1} , d é o passo ótico da cubeta e n é o número de resíduos de aminoácidos. A

deconvolução espectral para predição de estrutura secundária foi feita pelo programa DICHROWEB (Whitmore e Wallace, 2004) utilizando o pacote CDSSTRB.

2.1.4 Fluorescência intrínseca

A emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos foi medida em espectrofotômetros F-4500 (Hitachi) e RF-5301 PC (Shimadzu), excitação em comprimentos de onda de 280 e 295 nm, LbmtHsp70 em concentrações de 1,5 e 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, tampão TKP (pH 7,5) e cubeta com passo ótico de 10x2 mm, a temperatura ambiente. O desenovelamento químico foi feito com adição de 5 mol.L^{-1} de guanidina. A partir dos valores de emissão de fluorescência foram obtidos o comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência (λ_{max}) e o centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$), calculado a partir da equação:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (3)$$

onde, λ_i é cada comprimento de onda medido e F_i é a intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ_i , entre os comprimentos de onda de 320 a 380 nm, como descrito previamente (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015).

2.1.5 Cromatografia de exclusão molecular analítica

O Raio de Stokes (R_s) e a massa molecular aparente (MM_{app}) da LbmtHsp70 foram obtidos por meio de cromatografia de exclusão molecular analítica (do inglês *analytical size exclusion chromatography* - aSEC) em coluna Superdex 200 GL 10/30 (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada com tampão TKP (pH 7,5). A coluna foi previamente calibrada com uma mistura de proteínas padrão com R_s conhecido, contendo apoferritina (480 kDa, 67 Å), albumina de soro bovino (BSA) (67 kDa, 36 Å), anidrase carbônica (29 kDa, 24 Å) e ribonuclease A (13,7 kDa, 16 Å). Os tempos de retenção foram transformados no coeficiente de partição k_{av} , utilizando a equação:

$$k_{\text{av}} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (4)$$

onde, V_e é o volume de eluição, V_0 é o volume morto da coluna e V_t é o volume total da coluna. O gráfico de $-\text{Log } k_{\text{av}}$ versus R_s das proteínas padrão foi traçado a fim de obter o R_s da LbmHsp70 por ajuste linear. A razão friccional (f/f_0) foi estimada pela

razão entre o R_s experimental e o raio de uma esfera de mesma massa molecular (Lebowitz *et al.*, 2002).

2.1.6 Ultracentrifugação analítica

Os ensaios de ultracentrifugação analítica (do inglês *analytical ultracentrifugation* - AUC) foram feitos em ultracentrífuga analítica Beckman Optica XL-A, utilizando o método de velocidade de sedimentação, com concentrações de LbmtHsp70 entre 150 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em tampão TKP, a 7 °C e 30.000 rpm (rotor NA-60Ti). A absorbância em função do raio posicional da amostra foi registrada em 236 nm. Os dados foram analisados pelo programa SedFit (Lebowitz *et al.*, 2002; Schuck *et al.*, 2002) para determinação do coeficiente de sedimentação (s). Dados de V_{bar} , viscosidade e densidade do tampão foram estimados pelo programa Sednterp e utilizados para corrigir o s obtido para condições padrão de água a 20 °C ($s_{20,w}$). A partir dos valores de $s_{20,w}$ em função da concentração de proteína foi estimado o valor de $s_{20,w}^0$, que representa o $s_{20,w}$ em diluição infinita (Borges e Ramos, 2011).

2.1.7 Espalhamento de raios-X em baixo ângulo

Os ensaios de espalhamento de raios-X em baixo ângulo (do inglês *small-angle X-ray scattering* - SAXS) foram feitos (por um pesquisador do grupo) no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas-SP) em um monocromador de raios-X ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) da linha D02A-SAXS1. A distância entre o detector e a amostra foi de aproximadamente 1000 mm, com vetor de espalhamento correspondente de $0,015 < q < 0,35 \text{ \AA}^{-1}$, sendo q a magnitude do vetor de q definido por:

$$q = \sin\theta \frac{4\pi}{\lambda} \quad (5)$$

onde, 2θ é o ângulo de espalhamento.

As amostras (concentração de 0,6 mg.mL^{-1} em tampão TKP) foram colocadas em cubeta de mica de 1 mm para coleta das curvas de espalhamento. Amostras e tampões foram sujeitos a medidas de espalhamento de 100 segundos. As curvas $p(r)$ foram geradas pelo programa GNOM utilizando a curva de espalhamento experimental e foram usadas para gerar os modelos *ab initio* pelo programa DAMMIN (Svergun, 1999). A partir da média de vinte desses modelos foi construído um modelo *ab initio* final, pelo pacote DAMAVER (Petoukhov e Svergun, 2015), cujas

propriedades hidrodinâmicas foram simuladas pelo programa HydroPro (García De La Torre *et al.*, 2000) com forma de validação do modelo pela comparação com os dados experimentais.

2.1.8 Modelagem molecular por homologia

As estruturas primárias da LbmtHsp70 (GI:154341833), da mtHsp70 (GI:21264428) e da DnaK (GI:414145433) foram submetidas a predição de sequências de clivagem pelo Mitoprot (Claros e Vincens, 1996) e então foram alinhadas pelo Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). O modelo da LbmtHsp70 e a predição de estrutura secundária foram feitos pelo servidor online Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006; Bordoli *et al.*, 2009); na modelagem foram utilizados como estruturas de referência os modelos da DnaK em conformação aberta (Kityk *et al.*, 2012) (4B9Q_A.pdb) e em conformação fechada (Bertelsen *et al.*, 2009) (2KHO.pdb). A minimização de energia do modelo foi feita utilizando campo de força GROMOS96 implementado para o Swiss-PdbViewer 4.1.0. Os modelos da LbmtHsp70 foram então avaliados através de gráfico de Ramachandran (Lovell *et al.*, 2003), QMEAN (Benkert *et al.*, 2011), Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997) e PROCHECK (Laskowski, 2001).

2.1.9 Atividade ATPásica

Os dados de atividade ATPásica da LbmtHsp70 foram obtidos por espectrofotometria e com o uso do kit PiColorLock™ (Innova Biosciences) (Dores-Silva *et al.*, 2016). O método possibilita aferir a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado da hidrólise do ATP. LbmtHsp70 foi solubilizada em tampão TKP (sem íons fosfato) na presença de 2 mmol.L⁻¹ de cloreto de MgCl₂ e incubada com concentrações variadas de ATP (de 0 a 2 mmol.L⁻¹) e solução com verde malaquita, por 40 minutos e a 37 °C. A absorbância do corante verde malaquita muda na presença de Pi devido à formação de complexos de fosfomolibdato. A concentração de Pi liberado por minuto (μmol.L⁻¹.min⁻¹) foi plotada contra a concentração de ATP (μmol.L⁻¹) e parâmetros cinéticos foram calculados pelo ajuste de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} + [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

onde, V_0 é a taxa de reação, V_{max} é a velocidade máxima da reação atingida em concentrações saturantes do ATP substrato [S]. K_M , conhecida como constante de

Michaelis, é a concentração de substrato em que a taxa de reação é metade de $V_{\max}$. O k_{cat} foi calculado pela taxa do $V_{\max}$ com a concentração de proteína usado no experimento.

2.1.10 Calorimetria de titulação isotérmica

Ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (do inglês *Isothermal titration calorimetry* – ITC) foram feitos para analisar a interação da LbmtHsp70 com ATP e ADP (Dores-Silva *et al.*, 2016). Foi utilizado microcalorímetro iTC200 (GE Healthcare Life Sciences). Quinze alíquotas de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ATP ou ADP diluídas em TKP contendo MgCl_2 2 mmol.L^{-1} foram injetadas em $203,8 \mu\text{L}$ de LbmtHsp70 diluída em mesmo tampão, a temperatura de 20°C . Foram obtidos os parâmetros de constante de associação (K_A), variação de entalpia aparente (ΔH_{ap}) e coeficiente estequiométrico (n) (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). A constante de dissociação (K_D) foi calculada como inverso de K_A . A variação de energia de Gibbs aparente (ΔG_{ap}) foi calculada pela equação:

$$\Delta G_{\text{ap}} = -RT \ln K_A \quad (7)$$

onde, R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta. A variação de entropia aparente (ΔS_{ap}) foi estimada por:

$$\Delta G_{\text{ap}} = \Delta H_{\text{ap}} - T \Delta S_{\text{ap}} \quad (8)$$

2.1.11 Ensaio de agregação

A agregação da LbmtHsp70 diluída em TKP e sob temperatura de 37°C foi medida por absorbância a 340 nm em intervalos de 10 segundos por cerca de 1 hora. O efeito de agregação em função da concentração também foi analisado em amostras contando concentrações variáveis da LbmtHsp70 (2 a $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Dores-Silva *et al.*, 2016).

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 LbmtHsp70 apresenta alta identidade com a mortalina

O alinhamento entre as sequências de aminoácidos da LbmtHsp70, mortalina e da DnaK de *E. coli* evidencia alto grau de identidade, sendo de 61% entre LbmtHsp70 e mortalina e de 56% entre LbmtHsp70 e DnaK (Figura 3). O alinhamento com a Hsp70-1A (Hsp70 citoplasmática induzível de humano) também foi feito (não mostrado), onde constatou-se identidade de 46% com a LbmtHsp70.

Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos da LbmtHsp70, mortalina e DnaK. Os triptofanos (W) conservados aparecem destacados em amarelo; o W553 exclusivo da LbmtHsp70 aparece destacado em laranja. Em magenta, a sequência *linker* que apresenta alta conservação. Em azul, os resíduos de interação com *J proteins*. Em verde, resíduos de interação com a co-chaperona GrpE (NEF). Circulados em vermelho, os resíduos que afetam a transdução de sinal no sentido PBD → NBD. Circulado em azul, o principal resíduo envolvido no sinal NBD → PBD. A estrutura secundária prevista para a sequência da LbmtHsp70 é mostrada em paralelo ao alinhamento, sendo as folhas-beta representadas pelas setas, as hélices-alfa pelos cilindros e a estrutura randômica pelos segmentos.

Fonte: autoria própria.

A interação das Hsp70 com proteínas-clientes é promíscua e de baixa afinidade, sendo a especificidade da interação geralmente dirigida por uma co-chaperona. Isto é, para que a Hsp70 se ligue efetivamente a uma proteína-cliente é necessário que ocorra mudança conformacional para o estado fechado, que possui maior afinidade pela proteína-cliente.

Essa mudança é provocada pela hidrólise do ATP, cuja taxa de reação é estimulada por co-chaperonas como as *J proteins*. Além disso, as co-chaperonas também atuam como carreadoras de proteínas-cliente, o que torna a Hsp70 mais próxima de um proteína-cliente específica no momento em que o estímulo da hidrólise do ATP ocorre. Outras co-chaperonas (como os NEFs), atuam na recuperação da Hsp70 ao seu estado aberto, influenciando o *turnover* do processo (Kampinga e Craig, 2010). Dessa forma, o desempenho das Hsp70 para ligar e processar proteína-cliente é diretamente influenciado pela interação com co-chaperonas e isto pode ser utilizado estrategicamente no desenvolvimento de fármacos que visam modular a atividade das Hsp70.

Os resíduos presentes na interface de interação entre DnaK e co-chaperona GrpE, localizados no NBD, afetam a capacidade da chaperona em hidrolisar ATP e processar proteínas-cliente. Ou seja, o comprometimento da interação com co-chaperona afeta diretamente a atividade da chaperona. Esses resíduos descritos como interface de interação entre DnaK e suas co-chaperonas apresentam-se conservados na LbmtHsp70 e mortalina (Figura 3). No entanto, esses resíduos não necessariamente são cruciais para interação da mortalina e LbmtHsp70 com suas respectivas co-chaperonas. Ainda deve ser definido se há ou não interação cruzada entre co-chaperonas e chaperonas humanas e de *L. braziliensis* e como ela ocorre. A coevolução das co-chaperonas e respectivas Hsp70 dentro de uma espécie criam nuances que direcionam a especificidade de interação entre as proteínas e afetam a efetividade da chaperona, apesar da conservação estrutural (Veyel *et al.*, 2014).

A interface de interação com co-chaperonas também integra a região de interação entre os domínios. O resíduo D481 (circulado em azul, Figura 3) está envolvido em uma rede de ligações de hidrogênio que estabilizam o acoplamento entre os domínios. Mutação desse resíduo para alanina prejudica a regulação no sentido NBD → PBD, pois a chaperona não se dissocia da proteína-cliente na presença de ATP, apesar de apresentar atividade ATPásica aumentada. Por outro lado, a regulação no sentido PBD → NBD (resíduos circulados em vermelho, Figura 3) não afeta dissociação de proteína-cliente, mas afeta a atividade ATPásica (Kityk *et al.*, 2015). O sentido de regulação entre os domínios se dá de forma independente, ou seja, não envolvem os mesmos resíduos. Além disso, seus efeitos na atividade chaperona também são distintos, sendo mais expressivo o efeito deletério causado por perturbações na transdução de sinal no sentido NBD → PBD, envolvido com a regulação de dissociação das proteínas-cliente (Kityk *et al.*, 2015).

A co-chaperona Hep1 tem sido descrita como fundamental para a solubilização da mortalina e também influencia sua atividade ATPásica (Blamowska *et al.*, 2012; Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). Tal interação ocorre no sítio NBD (Zhai *et al.*, 2008) e, como descrito para a Ssc1 (Hsp70 mitocondrial de levedura), é necessária a presença do *linker* VLLL associado a este domínio para que a Hep1 se ligue à chaperona (Blamowska *et al.*, 2010). O inserto de quatro aminoácidos presente apenas na sequência da DnaK no alinhamento (resíduos 210-213: VDGE, Figura 3) não está presente também na sequência da Ssc1 (não mostrada); este inserto tem relação com a regulação do *linker* e também é associado à solubilidade da proteína e sua capacidade em ligar-se à Hep1, uma vez que quando expresso em mutante da Ssc1, esta torna-se solúvel e não liga-se à Hep1 (Blamowska *et al.*, 2010). A sequência do *linker* é conservada entre mortalina, DnaK e Ssc1, sendo um pouco diferente para a LbmtHsp70; porém essa diferença pode não ser significativa. A ausência do inserto VDGE na LbmtHsp70 em comparação com a DnaK também indica modulação do *linker* para interação com a co-chaperona e sua solubilidade como descrito para a Ssc1.

Dessa forma, a LbmtHsp70 apresenta várias semelhanças estruturais com as demais Hsp70 que refletem em seu funcionamento na interação com co-chaperonas. A princípio, essas semelhanças podem não favorecer o argumento de que a Lbmtsp70 é um alvo interessante para o desenvolvimento de tratamentos contra a Leishmaniose, porém não é possível fazer tal afirmação com base apenas em alinhamento e comparação estrutural tendo em vista que a relação estrutura-atividade das Hsp70 não é ainda totalmente elucidada.

2.2.2 LbmtHsp70 é obtida na fração solúvel

A LbmtHsp70 recombinante foi obtida nas frações solúveis e separada da LbHep1 na cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 4). A co-expressão com a LbHep1 foi necessária para que a LbmtHsp70 fosse obtida em sua forma solúvel, do contrário tende a formar agregados e permanecer na fração insolúvel do lisado bacteriano (Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015). Após separação da LbHep1, a LbmtHsp70 passou por diluições nas cromatografias o que provavelmente favoreceu a manutenção de sua solubilidade mesmo na ausência da co-chaperona. A identidade estrutural com a mortalina também se reflete nos baixos níveis de rendimento da LbmtHsp70 (Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015), resultando em pequena quantidade de proteína disponível para ensaios, por purificação.

Figura 4: SDS-PAGE 12% com a expressão da LbmtHsp70. A banda na altura de 66 kDa corresponde à LbmtHsp70 e surge apenas após a indução com IPTG. A banda na altura de 25 kDa é correspondente à LbHep, que diminui consideravelmente após a afinidade. Frações: 1- não induzido, 2- induzido, 3- sobrenadante do lisado, 4- insolúvel do lisado, 5- afinidade, 6- gel filtração.

Fonte: autoria própria.

2.2.3 LbmtHsp70 é produzida em estado enovelado

Quanto à estrutura secundária, o espectro de CD da LbmtHsp70 revela que a proteína produzida está enovelada (Figura 5-A) e sua deconvolução pelo Dichroweb (CDSSTRB) indica predição de estrutura secundária contendo 32% de hélices-alfa, 21% de folhas-beta, 18% de *turns* e 29% de *coils*. Tanto o espectro de CD como as quantidades relativas de estrutura secundária estão de acordo com proteínas Hsp70 (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015).

O desenovelamento térmico por CD (Figura 5-B) evidencia que a proteína foi produzida em seu estado enovelado, apresentando duas transições no processo de desnaturação térmica sem se desenovelar por completo (não atinge o zero de elipticidade molar) como também foi observado para a mortalina (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015).

Nos ensaios de fluorescência foram obtidos espectros de emissão dos triptofanos que apresentaram valores médios de $\lambda_{\text{max}} = 339 \pm 1$ nm, em excitação em 295 nm, e $\lambda_{\text{max}} = 340 \pm 2$ nm em 280 nm (Figura 6-A). Os $\langle \lambda \rangle$ obtidos para excitação em 295 e 280 nm foram de $346,7 \pm 0,5$ nm e $345,7 \pm 0,7$ nm, respectivamente. As emissões normalizadas das excitações em 295 e 280 nm mostram que há contribuição de emissão de tirosinas, pois em aproximadamente 305 nm a curva de excitação em 280 nm apresenta maior intensidade (inserto da Figura 6-A). Os espectros de emissão de fluorescência da LbmtHsp70 submetida a desenovelamento químico por guanidina (excitação de 295 nm) (Figura 6-B) apresentaram supressão da fluorescência emitida

e *red-shift* de aproximadamente 13 nm para o $\lambda_{\max}$ e de 4 nm para o $\langle\lambda\rangle$ (inserto da Figura 6-B), sugerindo aumento da exposição dos triptofanos ao solvente. Estes dados em conjunto indicam que a LbmtHsp70 foi produzida de forma enovelada e com assinaturas espectrais compatíveis com outras Hsp70 (Borges & Ramos, 2006; Dores-Silva et al., 2015).

Figura 5: Espectros de dicroísmo circular da LbmtHsp70. **A**: espectro proteína em concentração de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ obtido em cubeta circular de 0,2 mm. **B**: Desenovelamento térmico da LbmtHsp70. Ajuste sigmoidal: Double Boltzmann.

Fonte: autoria própria.

Figura 6: Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da LbmtHsp70. **A**: em comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm. No box, os mesmos espectros normalizados são apresentados. Medidas obtidas pelo fluorímetro F-4500 (Hitachi). **B**: Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da LbmtHsp70 em excitação de 295 nm. Linha tracejada mostra a emissão da proteína parcialmente desnaturada pelo efeito da guanidina. No box, os espectros normalizados, onde observa-se o *red-shift*. Os dados de desnaturação por fluorescência foram obtidos em fluorímetro RF-5301PC (Shimadzu).

Fonte: autoria própria.

2.2.4 LbmtHsp70 é purificada em sistema monodisperso

Na aSEC, foi obtido pico único em volume de eluição de $13,0 \pm 0,2$ mL, a partir do qual foram calculados o $R_s = 39 \pm 2$ Å, o $f/f_0 = 1,44$ e a $MM_{ap} = 79 \pm 7$ kDa (Figura 7-A).

Figura 7: Perfil hidrodinâmico da LbmtHsp70. **A:** Perfil de eluição por aSEC; padrões moleculares: 1-apoferritina (480 kDa, 67 Å), 2-gama-globulina (160 kDa, 48 Å), 3-albumina de soro bovino (BSA) (67 kDa, 36 Å), 4-anidrase carbônica (29 kDa, 24 Å) e 5-citocromo C (12 kDa, 14 Å). Box: ajuste linear dos valores de R_s versus o $-\log K_{av}^{1/2}$; o ponto em vermelho indica a LbmtHsp70. **B:** Distribuição da LbmtHsp70 no ensaio de sedimentação em concentrações variadas. A região onde as curvas se concentram determinam o coeficiente de sedimentação ($s_{20,w}^0$), que é a relação entre o tamanho da partícula e sua velocidade de migração.

Fonte: **A:** Autoria própria. **B:** (Dores-Silva *et al.*, 2016).

Os ensaios de AUC geraram dados determinantes na caracterização estrutural da LbmtHsp70, uma vez que a técnica é padrão ouro para determinação parâmetros hidrodinâmicos. A partir da velocidade de sedimentação da partícula, a técnica possibilita estimar com alta precisão a $MM = 67 \pm 1$ kDa, o $s_{20,w}^0 = 4,3 \pm 0,1$ S e o $f/f_0 = 1,43 \pm 0,02$. Para os cálculos foram utilizados dados de densidade ($\rho = 1,0$) e viscosidade do tampão ($\eta = 0,01428$) e $V_{bar} = 0,72415$ calculados pelo Sednterp. Os valores obtidos corroboram os resultados por aSEC e são análogos aos resultados da mortalina (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015), porém indicam uma forma mais alongada à LbmtHsp70, uma vez que esta apresenta $f/f_0 = 1,43$ contra 1,36 da mortalina e $s_{20,w}^0$ menor (LbmtHsp70: 4,3 S; mortalina: 4,8 S). O gráfico da velocidade de sedimentação ainda fornece informações sobre a monodispersidade da LbmtHsp70, pois nele são observados picos de absorvância da LbmtHsp70 em concentrações diferentes, porém com mesmo valor de $s_{20,w}$. Se outras formas

oligoméricas ou agregados estivessem presentes na amostra, haveria outros picos com valores de $s_{20,w}$ distintos (Figura 7-B).

A partir da curva de intensidade de SAXS (Figura 8-A) foi feito o ajuste de Guinier, através do qual foram estimados o $R_g = 37 \pm 2 \text{ \AA}$ e a $MM = 76 \pm 2 \text{ kDa}$. Segundo o gráfico de $p(r)$ (Figura 8-B) calculado a partir da curva de SAXS, a LbmtHsp70 apresenta forma alongada com $D_{\max} = 120 \pm 10 \text{ \AA}$. Além disso, os dados sobre a forma da partícula foram usados para gerar modelos *ab initio* pelo programa DAMMIN, a partir dos quais foi gerado um modelo médio (Figura 9) pelo programa DAMAVER.

Figura 8: Espalhamento de raios-X da LbmtHsp70. **A:** Intensidade do espalhamento gerado pela amostra em função de q . **B:** Função $p(r)$ a partir da qual obtém-se o $D_{\max}$ ($120 \pm 10 \text{ \AA}$) e a forma da partícula. O deslocamento do centro de massa da curva para a esquerda em relação à metade da $D_{\max}$ é sugestivo de que a partícula é levemente alongada.

Fonte: autoria própria.

Figura 9: Modelo *ab initio* gerado pelo DAMAVER.

Fonte: autoria própria.

Devido à inexistência de estrutura completa da mortalina humana resolvida por cristalografia de raios-X ou NMR, as estruturas da DnaK em estado aberto e fechado foram utilizadas na modelagem por homologia da LbmtHsp70. Nos modelos (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**) é possível observar a o W106 no NBD e o W553, na extremidade do PBD.

Figura 10: Modelos por homologia da LbmtHsp70 nas conformações aberta e fechada. LbmtHsp70 em conformação aberta (**A**) e fechada (**B**). Os domínios NBD e PBD são apresentados em branco e preto, respectivamente; a alça que conecta a PBD ao NBD está em magenta. Em destaque, os triptofanos da LbmtHsp70 na extremidade do PBD em amarelo (W553) e o localizado no NBD em vermelho (W106). **C**: Arquitetura dos domínios da LbmtHsp70 baseado nos modelos sem a His-tag. Figura gerada pelo Pymol.

Fonte: autoria própria.

Os modelos por homologia produzidos foram validados por gráfico de Ramachandran, Verify3D, QMEAN e PROCHECK (Tabela 2). O Verify 3D compara o modelo 3D com sua estrutura 1D, faz uma análise de resíduos baseada em sua localização e ambiente e compara com resultados de estruturas consideradas padrão de qualidade. Os valores obtidos para os modelos produzidos foram razoáveis (> 80% com score $\geq 0,2$ na relação 3D/1D) (Eisenberg *et al.*, 1997).

Tabela 2 - Valores obtidos para validação estrutural dos modelos.

	Verify3D*	<i>G-factor</i> (PROCHECK%)	Ramachandran		<i>z-score</i> (QMEAN)\$
			PROCHECK% [£]	RAMPAGE% [£]	
2KHO.pdb (fechado)	91%	-0,54	91%	95%	-0,07
LbmtHsp70 - modelo fechado	87%	-0,12	87%	93%	-2,54
4B9Q.pdb (aberto)	97%	0,17	91%	98%	-0,28
LbmtHsp70 - modelo aberto	93%	0,09	89%	97%	0,22

* servidor da UCLA

%servidor da EMBL-EBI

[£]resíduos em regiões favoráveis

#servidor de Cambridge

\$servidor de Swiss-Model

Pelo PROCHECK foram calculados o *G-factor* e o gráfico de Ramachandran. O *G-factor* avalia o quão comum/incomum uma dada propriedade estereoquímica é. Seus cálculos baseiam-se nos valores de torção calculados para o gráfico de Ramachandran e toma como padrão de qualidade 163 estruturas não homólogas entre si. Valores baixos para *G-factor* indicam conformações pouco possíveis de ocorrer (Laskowski, 2001). Os valores de *G-factor* para as estruturas de conformação aberta foram aceitáveis, em contrapartida, os valores das estruturas de conformação fechada ficaram abaixo do esperado. O modelo de conformação fechada produzido, no entanto, apresentou melhor índice do que o a estrutura utilizada como molde (2KHO.pdb). Em análise mais detalhada, o 2KHO.pdb apresentou mais erros estruturais, com destaque para os ângulos ω (-0,82) e comprimentos de ligação da cadeia principal (-1,45). Esses erros foram provavelmente corrigidos com a minimização de energia aplicada no modelo de conformação fechada produzido, que apresentou o valor mais baixo para ω (-0,59).

Os gráficos de Ramachandran avaliam os ângulos de torção dos resíduos entre as ligações N-C α (ângulos Phi, ϕ) e entre as ligações C α -C (ângulos Psi, ψ) e os distribuem em três principais regiões: favorável, permitida e não permitida, onde se distinguem regiões para estruturas em hélice-alfa, hélice-alfa orientada à esquerda e folhas-beta (Laskowski, 2001; Lovell *et al.*, 2003). Os modelos foram processados pelos programas RAMPAGE e PROCHECK para obtenção dos gráficos de Ramachandran. A diferença observada entre seus valores deve-se principalmente aos aminoácidos que são contabilizados. RAMPAGE apresenta um valor de resíduos localizados em regiões favoráveis que leva em consideração as glicinas e as prolinas,

enquanto que o PROCHECK considera apenas os resíduos não-glicina e não-prolina. Devido a isso, o valor ideal para um bom modelo é variável entre os dois programas. Para o RAMPAGE, os resíduos localizados em regiões favoráveis devem ser cerca de 98% e para o PROCHECK acima de 90%. Segundo os gráficos de Ramachandran, os modelos produzidos apresentaram qualidade abaixo do esperado, no entanto essa qualidade reflete a pouca qualidade das estruturas que serviram de molde, principalmente a 2KHO.pdb. A baixa qualidade relativa desse modelo deve-se à estratégia utilizada para sua obtenção, cujo intuito não foi o de obter alta resolução em nível atômico, mas sim o de definir a conformação fechada híbrida a partir de estruturas já resolvidas do NBD e do PBD (Bertelsen *et al.*, 2009).

O QMEAN é o valor médio de *z-score* de seis descritores estruturais: quatro deles ângulos de torção, solvatação e interações que não formam ligações, os outros dois descritores analisam a coerência entre os valores calculados e previstos de estrutura secundária e acessibilidade ao solvente. Valores de QMEAN tendendo a zero ou maiores que zero indicam boa qualidade do modelo, enquanto que valores menores que zero indicam modelos de má qualidade.

O modelo do estado aberto apresentou um QMEAN com *z-score* de 0,22, que é um bom score, enquanto o modelo do estado fechado apresentou *z-score* de -2,54, onde o pior valor de descritor estrutural apresentado foi dos ângulos de torção. Os modelos foram usados para simulação de comportamento hidrodinâmico da proteína monodispersa pelo HydroPro, onde foi observada aproximação com os dados experimentais. Portanto o formato global da proteína influencia mais a análise do que a qualidade estereoquímica de cada modelo testado.

Os modelos gerados, incluindo o *ab initio*, foram submetidos à predição hidrodinâmica pelo programa HydroPro, onde foi utilizado o $V_{\text{bar}} = 0,72415$ calculado pelo Sednterp. Os dados obtidos por aSEC, AUC, SAXS foram comparados com a predição hidrodinâmica dos modelos pelo HydroPro (Tabela 33).

Tabela 3 - Dados hidrodinâmicos.

	Sednterp®		Experimental			HydroPro		
	Monômero	Dímero	aSEC	AUC\$	SAXS	Modelo aberto	Modelo fechado	Modelo <i>ab initio</i>
MM (kDa)	71&	142&	79 ± 7	67 ± 1	76 ± 2	-	-	-
s ⁰ _{20,w} (S)	6,0	10,0	-	4,3 ± 0,1	-	4,4	4,2	4,2
R _s (Å)	27	34	39 ± 2	-	-	37	40	40
f/f ₀	-	-	1,44 ± 0,05*	1,43 ± 0,02	-	1,37	1,48	1,48
R _g (Å)	-	-	-	-	37 ± 2 [#]	37	39	35
D _{max} (Å)	-	-	-	-	120 ± 10	121	150	142

® predição para monômero esférico, a 20°C

& considerando a His-tag

\$ calculados pelo SedFit, a partir da velocidade de sedimentação

* calculado a partir do R_s estimado pelo Sednterp

calculado a partir do ajuste de Guinier

Os dados hidrodinâmicos indicam que a proteína purificada apresenta forma alongada e foi obtida em sua forma monomérica, com todas as características esperadas para uma Hsp70 mitocondrial (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). O modelo *ab initio* apresentou valores hidrodinâmicos mais próximos aos do modelo por homologia na conformação fechada, indicando possível deslocamento para essa conformação da apoproteína nas condições testadas (Borges *et al.*, 2016)

2.2.5 A estabilidade da LbmtHsp70

Como já mencionado anteriormente, a LbmtHsp70 apresenta propensão à agregação, bem como outras Hsp70. Devido a isso, é co-expressa com a co-chaperona LbHep1 para que seja obtida na fração solúvel. Como observado com a mortalina (Dores-Silva *et al.*, 2013), a agregação a LbmtHsp70 também ocorre em função da temperatura e concentração da proteína e, consequentemente, sua funcionalidade. O ensaio de estabilidade foi conduzido em três caminhos:

- 1- Estabilidade da proteína estocada em geladeira e efeito de concentração.
- 2- Agregação sob temperatura constante (37 °C), em função do tempo e concentração.
- 3- Estabilidade térmica mediante ligação com nucleotídeos.

O primeiro ensaio foi feito a fim de avaliar a possibilidade de uso da proteína em médio e longo prazo e após concentração refrigerada (Figura 11). O armazenamento em geladeira apresentou pouca alteração nos espectros de CD, sendo as alterações mais significativas a partir de 48 horas, onde observa-se um

deslocamento mais pronunciado na altura de 220 nm (Figura 11-A). Além disso, o ponto isodicroico (ponto de cruzamento dos espectros) não ocorre no zero do eixo y indicando que existem alterações espectrais não decorrentes de diferenças na concentração nas amostras de proteínas testas. Essas informações em conjunto sugerem alteração da estrutura secundária da LbmtHsp70 em função do tempo, mesmo quando refrigerada.

O armazenamento em geladeira também produziu pequena alteração no perfil de eluição da LbmtHsp70 (Figura 11-B), deslocando sensivelmente o pico da curva para a esquerda já a partir de 24 horas. A partir disso pode-se interpretar que as amostras com maior tempo de estoque migraram mais rapidamente pela coluna. Porém, esse resultado não apresenta o perfil que seria esperado para formação de agregados, pois nesse caso apresentaria um pico de agregado ou picos de oligômeros antes do volume de eluição previsto (a partir de 8 mL, que é o V_0 da coluna), como ocorre com a mortalina após algumas horas de purificada, mesmo quando estocada a 4 °C (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). Essa pequena variação pode ser explicada pela possível mudança estrutural ou conformacional da LbmtHsp70, porém ainda se mantendo solúvel e monodispersa.

Figura 11: Análise de estabilidade em geladeira e mediante concentração. **A:** Espectros de dicroísmo circular (CD) da LbmtHsp70 em concentração de $9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ após várias horas estocada em geladeira (4 °C). Miniatura: espectro de CD antes e depois de concentração para 5 mg.mL^{-1} ($\sim 70 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **B:** Curvas de eluição analítica da LbmtHsp70 após várias horas estocada em geladeira (mesma solução de padrões utilizada anteriormente). Miniatura: Curva de eluição da LbmtHsp70 antes e após concentração.

Fonte: Autoria própria.

Já a concentração da proteína para $\sim 70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (5 mg.mL^{-1}) a 4°C , partindo de alíquotas frescas com concentrações iniciais variando entre $7 - 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, não apresentou sinais de alteração estrutural nos espectros de CD ou deslocamento do pico de eluição (Figura 11-inserito). No entanto, quando submetida a diálise overnight, a LbmtHsp70 apresentou alterações significativas nos espectros de CD no que diz respeito à forma do espectro na faixa de comprimento de onda entre 210 a 220 nm, sugerindo alterações na de estrutura secundária (dado não mostrado). O perfil de eluição por cromatografia analítica também se mostrou alterado nessas condições, apresentando pico mais alargado à direita e um pico adicional entre 16 e 18 mL, indicando presença de partículas menores que podem ser produtos de degradação (dado não apresentado).

O fato das alterações em estrutura secundária e monodispersidade em função do tempo serem mínimas e também serem diferentes da mortalina, pode criar a expectativa de que a LbmtHsp70 seja mais estável que a mortalina e, portanto, suporte um tempo maior de estoque e mantenha sua funcionalidade. Entretanto, isso não foi observado nos ensaios que utilizaram a proteína armazenada. Tal como a mortalina, a LbmtHsp70 deve ser usada o mais prontamente possível após o processo de purificação, pois mesmo apresentando essas pequenas alterações sua funcionalidade ficou comprometida em poucas horas. E, da mesma forma que a mortalina, esse é o “calcanhar de Aquiles” do estudo com a LbmtHsp70, causando uma grande limitação à execução de ensaios e obtenção de resultados.

O ensaio de agregação evidenciou que a LbmtHsp70 apresenta perfis de agregação dependentes de concentração e temperatura (Figura 12). A absorbância em 340 nm propicia a detecção de formação de agregados; estes espalham a luz incidida, que é medida indiretamente como absorbância. A temperatura de 37°C é interessante por se tratar da temperatura fisiológica média. Este ensaio tem então como perspectiva avaliar a estabilidade da LbmtHsp70 em temperatura encontrada no hospedeiro humano. Observou-se que com o aumento da concentração a LbmtHsp70 apresenta uma maior tendência a formar agregados sob essas condições.

Figura 12: Agregação da LbmtHsp70 em concentrações variadas e sob temperatura de 37 °C.

Fonte: Adaptado de (Dores-Silva *et al.*, 2016)

Como dito anteriormente, o estresse causado ao parasito no hospedeiro acarreta aumento de expressão de chaperonas, entre elas a LbmtHsp70. Parece então contraditório, pelo menos a princípio, que a proteína forme corpos insolúveis em condições cruciais para a adaptação do parasito. No entanto, a LbHep1 favorece a solubilização da LbmtHsp70 *in vitro* mesmo em concentrações subestequiométricas, como demonstrado anteriormente (Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível inferir que mesmo apresentando tendências para agregar com aumento de concentração e temperatura, a LbmtHsp70 pode ter sua funcionalidade preservada graças à solubilização pela LbHep1.

Tendo como modelo a interação da mortalina com os nucleotídeos (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015), os ensaios para verificar alterações estruturais na LbmtHsp70 na presença de ATP e ADP foram feitos também em tampão contendo Mg^{2+} . Foram feitos ensaios de fluorescência com adição de ATP ou ADP, ambos em concentração de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, na presença de 2 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$ e $1,5$ a $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de LbmtHsp70, como descrito para a mortalina (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015), no intuito de investigar alterações no ambiente do W106 para os estados aberto e fechado da proteína, cujo equilíbrio conformacional é deslocado de acordo com o nucleotídeo adicionado. No entanto, não foi observada supressão da intensidade de fluorescência nem alteração significativa nos valores de λ_{max} e $\langle \lambda \rangle$ nas amostras contendo ATP ou ADP (dados não mostrados).

A adição de nucleotídeos (ATP e ADP) na ausência ou não de cofator $MgCl_2$, apresentou alterações muito sutis nos espectros de CD da LbmtHsp70 no que diz

respeito à intensidade do sinal entre 205 e 225 nm, mas não na forma dos espectros nem no ponto isodicroico (Figura 13-A). Entende-se, a partir disso, que os nucleotídeos não operam alterações significativas a nível de estrutura secundária, mesmo sabendo que direcionam drásticas mudanças conformacionais que impactam na estrutura terciária (Figura 1).

Já em relação à estabilidade térmica, a adição dos nucleotídeos contribuiu significativamente para alterações nos espectros de desenovelamento térmico obtidos via CD (Figura 13-B). Consequentemente, os valores estimados para as temperaturas de transição (T_m) também foram influenciados pela ligação aos nucleotídeos. Esses termogramas não apresentaram boa resolução das transições, portanto foi necessário fazer um ajuste matemático (Jelesarov, 2004) que gerou o gráfico da fração desenovelada em função da temperatura, e então possibilitou o ajuste sigmoidal (Double Boltzmann) para a obtenção das temperaturas de transição (Figura 13-C). De modo geral, o perfil de desenovelamento térmico da LbmtHsp70 assemelha-se ao da mortalina (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015), apresentando duas transições e atingindo um platô. Curiosamente, apesar da elevada temperatura testada, tanto a LbmtHsp70 quanto a mortalina não apresentam desenovelamento completo (não alcançou o zero da intensidade). Ainda em comparação à mortalina, a primeira transição da LbmtHsp70 se deu praticamente na mesma temperatura, $\sim 40^\circ\text{C}$. A segunda transição da LbmtHsp70 ($\sim 62^\circ\text{C}$), no entanto, ocorreu em temperatura inferior à da mortalina ($\sim 73^\circ\text{C}$). As duas transições talvez possam ser respectivas a cada um dos domínios (PBD e NBD) de ambas proteínas, mas isso não pode ser afirmado com os presentes dados e nem seguramente sugerido, uma vez que a Hsp70-1A apresenta três transições mesmo tendo dois domínios como a LbmtHsp70 e a mortalina (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015).

A adição dos nucleotídeos altera a primeira transição e elevam a T_m para $44 \pm 1^\circ\text{C}$ (ATP) e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ (ADP), proporcionando uma maior estabilidade térmica à proteína. O mesmo fenômeno é também observado para a mortalina, apenas na primeira transição (Dores-Silva *et al.*, 2016).

Figura 13: Espectros de dicroísmo circular da LbmtHsp70 e desenovelamento térmico na presença e ausência de nucleotídeos. **A:** Espectros de dicroísmo circular da LbmtHsp70 em condições variadas quanto à adição de ATP, ADP e $MgCl_2$. **B:** Desenovelamento térmico na presença de nucleotídeos e Mg^{2+} . **C:** Ajuste da fração desenovelada. Ajuste sigmoidal: Double Boltzmann.

Fonte: autoria própria.

Considerando que o ambiente fisiológico possui ATP e ADP disponíveis, é pertinente sugerir que nessas condições a LbmtHsp70 terá estabilidade térmica maior para a primeira transição, inclusive em temperaturas que caracterizam estado febril. É interessante relacionar essas observações e especular as possibilidades *in vivo* já que essa proteína está envolvida no processo adaptativo e de proteção do parasito, que desencadeia um processo infeccioso que provoca febre, entre outros mecanismos de defesa que o hospedeiro possui.

2.2.6 Energias de interação com nucleotídeos

As interações entre LbmtHsp70 e ADP/ATP foram investigadas por meio de titulações calorimétricas dos nucleotídeos na proteína preparada em TKP, a 20 °C. As energias de interação com o ADP foram dirigidas pela entalpia e entropia, como pode ser visto na Figura 14-B. A semelhança entre o ΔG_{app} da LbmtHsp70 (-8,7 kcal.mol⁻¹)

e o da mortalina ($-7,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$) indica afinidade similar pelo ADP. Apesar dessa semelhança, as variações de entalpia e entropia foram diferentes entre as duas proteínas, sendo a ΔH_{app} da LbmtHsp70 aproximadamente duas vezes maior do que a apresentada pela mortalina e a ΔS_{app} quase duas vezes menor (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). A variação de energia dessas duas variáveis ($\Delta H_{\text{app}} = -6,4 \pm 0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = +7,8 \pm 0,1 \text{ cal.mol}^{-1}$) indica que a ligação ao ADP é possivelmente guiada por interações moleculares com liberação de energia (entalpia negativa), como formação de ligações, e aumento da desordem do meio (entropia positiva) decorrente da liberação de moléculas de água de solvatação e de alteração conformacional da proteína.

A interação com o ATP apresenta um perfil termodinâmico diferente, com picos iniciais endotérmicos (Figura 14-A), indicando absorção de energia pelo sistema durante a interação da LbmtHsp70 com o nucleotídeo ($\Delta H_{\text{app}} = +3,7 \pm 0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$), que pode ser causada por rompimento de interações fracas ocasionado pela mudança conformacional da proteína na presença do ATP. Essa assinatura termodinâmica diverge das observadas para as Hsp70 descritas até então e para a mortalina, que apresentam curva exotérmica na interação com o ATP. Dessa forma, a interação com o ligante é predominantemente guiada pela entropia ($\Delta S_{\text{app}} = +41 \pm 1 \text{ cal.mol}^{-1}$) que apresentou valor cerca de duas vezes maior do que o observado para a mortalina (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015). A despeito dessas diferenças, o ΔG_{app} obtido ($-8,2 \pm 0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$) é similar ao observado na interação da mortalina com ATP, indicando afinidades semelhantes de ambas proteínas em relação a esse nucleotídeo (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015).

As constantes de dissociação (K_D) da LbmtHsp70 para os dois nucleotídeos (ADP: $0,30 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, ATP: $0,50 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) apresentaram valores próximos, indicando, portanto, afinidade semelhante para ambos. Em comparação à mortalina, que apresenta $K_{D_ADP} = 2,2 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $K_{D_ATP} = 0,50 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015), pode-se afirmar que a LbmtHsp70 apresenta maior afinidade por esses ligantes.

Figura 14: Interação da LbmtHsp70 com nucleotídeos. **A:** Curva de interação da LbmtHsp70 com ATP, apresentando perfil endotérmico. **B:** Curva de interação da LbmtHsp70 com ADP, onde observa-se um perfil exotérmico. **C:** Os valores das energias de interação sugerem diferentes contribuições para que a ligação de cada nucleotídeo com a LbmtHsp70 ocorra. A curva endotérmica obtida no ensaio de interação com ATP reflete variação de entalpia aparente com valor positivo; dessa forma, a ligação do ATP à proteína é guiada pela variação da entropia. Já a interação com o ADP é dirigida tanto pela entalpia quanto pela entropia.

Fonte: Dados publicados em (Dores-Silva *et al.*, 2016).

Apesar do coeficiente estequiométrico da interação entre LbmtHsp70 e ATP ser próximo a 0,5 quando o esperado para o modelo de ligação em um único sítio era de valor próximo a 1, como o apresentado na interação com ADP, os valores das energias envolvidas na interação com o ATP produzem resultados coerentes com o esperado para as Hsp70 e em comparação à mortalina. O baixo valor do coeficiente estequiométrico desse ensaio pode ser devido à agregação da LbmtHsp70, resultando em quantidade de proteína funcional inferior à estimada. Tal fenômeno também é observado em ensaios com a mortalina (Dores-Silva *et al.*, 2013; Dores-Silva, Beloti, *et al.*, 2015; Dores-Silva *et al.*, 2016).

2.2.7 Atividade ATPásica

As Hsp70 possuem atividade ATPásica baixa e no caso da LbmtHsp70 isso é evidenciado pelos baixos valores de $V_{\max} = 0,42 \pm 0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} = 0,183 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ (Figura 15), isto é, apenas pequena quantidade de fosfato inorgânico é formada por unidade de tempo. Enquanto as Hsp70 apresentam dados cinéticos na ordem de minutos, as enzimas em geral apresentam atividade em segundos (Berg Jm, 2002). Além disso, o baixo valor de $K_M = 30 \pm 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sugere maior afinidade da LbmtHsp70 pelo substrato nucleotídeo em comparação à mortalina ($K_M = 190 \pm 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Dores-Silva, Barbosa, *et al.*, 2015).

Figura 15: Dados cinéticos da atividade ATPásica calculada por ajuste de Michaelis Menten.

Fonte: Dado publicado em (Dores-Silva *et al.*, 2016).

Como demonstrado recentemente por nosso grupo de pesquisa, a LbHep1 contribui também para o incremento da atividade ATPásica em cerca de 300% além de promover a solubilização da LbmtHsp70 (Dores-Silva *et al.*, 2016). Isso também corrobora a importância das co-chaperonas para modular a atividade das Hsp70. A importância dessa regulação no que diz respeito à atividade ATPásica é de suma importância, tendo em vista que as alterações conformacionais que definem os estados de afinidade às proteínas-cliente são mediadas pela interação com os nucleotídeos.

3 CONCLUSÃO

A LbmtHsp70, bem como as demais Hsp70, integra um grupo de proteínas extremamente relevante para o funcionamento adequado de todas as células, desde organismos unicelulares simples a formas de vidas pluricelulares complexas. As chaperonas moleculares evoluíram de forma a desempenharem funções indispensáveis à vida, ainda assim intrigantes e com mecanismos não totalmente elucidados até hoje. As chaperonas moleculares tem papel na adaptação e transformação de protozoários causadores de *Leishmaniose*, com destaque para as Hsp70. Apesar de sua importância, as Hsp70, sobretudo as mitocondriais, ainda não são bem descritas pois oferecem diversos desafios para sua produção e aplicação em ensaios.

Como demonstrado neste trabalho, a LbmtHsp70, bem como as demais Hsp70, apresenta uma estrutura formada de dois domínios principais conectados por um *linker*, resultando em uma estrutura dinâmica e flexível. Essa flexibilidade resulta em baixa resistência a temperaturas e na tendência em se agregar. Esses empecilhos ocasionam uma série de dificuldades em manejar a proteína de forma a mantê-la funcional para obtenção de dados que possam vir a elucidar seu funcionamento e sua estrutura.

Como regra geral, todas as Hsp70 têm suas funções celulares moduladas por co-chaperonas e essas interações também podem ser interessantes para entender melhor seu funcionamento ou para desenvolver tratamentos. Neste trabalho a co-chaperona LbHep1 foi utilizada para obtenção da LbmtHsp70 em fração solúvel e possibilitar seu estudo. Dessa forma a LbmtHsp70 pôde ser purificada em forma enovelada, apresentando estrutura coerente com o modelo teórico e funcional.

Sua alta identidade com a mortalina influencia suas características estruturais e funcionais. Devido a isso, em vários ensaios foram obtidos resultados semelhantes aos da mortalina. O ensaio de agregação demonstrou que a LbmtHsp70 apresenta tendência a formar agregados em função da concentração, tal como observado para a mortalina. A atividade ATPásica também apresentou resultados muito próximos aos da mortalina e demais Hsp70. Diferenças também foram notadas. A primeira delas sendo a menor tendência à formação de agregados sob refrigeração. Isso não significa, porém, que a LbmtHsp70 seja mais estável que a mortalina. Na verdade, ela se mostrou igualmente “rebelde” quando empregada em ensaios funcionais tais como ITC e atividade ATPásica, apresentando agregação em temperaturas mais elevadas.

A segunda diferença é acerca das interações da LbmtHsp70 com os nucleotídeos de adenosina: a interação com o ATP é guiada pela entropia enquanto que a com o ADP é guiada tanto pela entropia quanto pela entalpia. Dessa forma, a assinatura termodinâmica da LbmtHsp70 é bastante diferente das demais Hsp70.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a LbmtHsp70 produzida apresenta todas as características de uma Hsp70, tendo como referência mais próxima a mortalina. Ainda assim, apresenta algumas particularidades que podem ser melhor elucidadas no futuro.

4 REFERÊNCIAS

ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223-30, Jul 1973. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4124164> >.

ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, Jan 15 2006. ISSN 1367-4803 (Print) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301204> >.

BALCHIN, D.; HAYER-HARTL, M.; HARTL, F. U. In vivo aspects of protein folding and quality control. **Science**, v. 353, n. 6294, p. aac4354, Jul 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27365453> >.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-50, Feb 2011. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134891> >.

BERG JM, T. J., STRYER L. The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. In: (Ed.). **Biochemistry**. 5th. New York: W H Freeman, 2002.

BERTELSEN, E. B. et al. Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 21, p. 8471-6, May 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439666> >.

BIYANI, N. et al. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of Leishmania donovani. **Mol Biochem Parasitol**, v. 179, n. 2, p. 91-9, Oct 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21736901> >.

BLAMOWSKA, M.; NEUPERT, W.; HELL, K. Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone. **J Cell Biol**, v. 199, n. 1, p. 125-35, Oct 2012. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007651> >.

BLAMOWSKA, M. et al. ATPase domain and interdomain linker play a key role in aggregation of mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1. **J Biol Chem**, v. 285, n. 7, p. 4423-31, Feb 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007714> >.

BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. **FEBS Lett**, v. 581, n. 15, p. 2802-10, Jun 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376437> >.

BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2009. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131951> >.

BORGES, J.; SERAPHIM, T. D.-S., PR; BARBOSA, L. **A review of multi-domain and flexible molecular chaperones studies by small-angle X-ray scattering**. Biophysical Reviews: Springer 2016.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 3, p. 257-61, Apr 2005. ISSN 0929-8665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777275> >.

_____. 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, Aug 1 2006. ISSN 0003-9861 (Print)
0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806043> >.

_____. Analysis of molecular targets of Mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 9, p. 1276-85, 2011. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366535> >.

BRANDVOLD, K. R.; MORIMOTO, R. I. The Chemical Biology of Molecular Chaperones--Implications for Modulation of Proteostasis. **J Mol Biol**, v. 427, n. 18, p. 2931-47, Sep 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003923> >.

BROCHU, C.; HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 294-303, Autumn 2004. ISSN 1355-8145 (Print)
1355-8145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544167> >.

BROTHERTON, M. C. et al. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in Leishmania infantum. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 4, n. 2, p. 126-32, Aug 2014. ISSN 2211-3207 (Electronic)
2211-3207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057462> >.

CDC. Leishmaniasis. 2013. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> >. Acesso em: 29 de novembro.

CLAROS, M. G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **Eur J Biochem**, v. 241, n. 3, p. 779-86, Nov 1996. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944766> >.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotrophic allosteric mechanism. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 2, p. 132-42, Feb 2011. ISSN 1875-5305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121894> >.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Lett**, v. 581, n. 19, p. 3702-10, Jul 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17544402> >.

DORES-SILVA, P. R. et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0117170, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25615450> >.

_____. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein - Hep1 - of Leishmania braziliensis. **Int J Biol Macromol**, v. 79, p. 903-12, Aug 2015. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26071939> >.

_____. 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, May 2013. ISSN 1879-0003 (Electronic)
0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462535> >.

_____. Structural and functional studies of the Leishmania braziliensis mitochondrial Hsp70: Similarities and dissimilarities to human orthologues. **Arch Biochem Biophys**, v. 613, p. 43-52, Nov 2016. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27840097> >.

DOYLE, S. M. et al. Interplay between E. coli DnaK, ClpB and GrpE during protein disaggregation. **J Mol Biol**, v. 427, n. 2, p. 312-27, Jan 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451597> >.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-54, Jul 1967. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6049437> >.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol**, v. 277, p. 396-404, 1997. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379925> >.

GARCÍA DE LA TORRE, J.; HUERTAS, M. L.; CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. **Biophys J**, v. 78, n. 2, p. 719-30, Feb 2000. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653785> >.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-32, Jul 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776078> >.

ITO, J.-I. Heat shock protein Hsc70/Hsp110 complex. 2016. Disponível em: < http://pdj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A3C7N >. Acesso em: 29 de novembro.

JELESAROV, I. **Thermodynamics and Kinetics of Protein Folding**. BOSSHARD, H. R. 2004.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 579-92, Aug 2010. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651708> >.

KITYK, R. et al. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. **Mol Cell**, v. 48, n. 6, p. 863-74, Dec 2012. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123194> >.

_____. Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. **Nat Commun**, v. 6, p. 8308, 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26383706> >.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 1, p. 221-2, Jan 2001. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125097> >.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Sci**, v. 11, n. 9, p. 2067-79, Sep 2002. ISSN 0961-8368 (Print) 0961-8368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12192063> >.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437-50, Feb 2003. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557186> >.

MAYER, M. P. Gymnastics of molecular chaperones. **Mol Cell**, v. 39, n. 3, p. 321-31, Aug 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705236> >.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 6, p. 670-84, Mar 2005. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770419> >.

MOKRY, D. Z.; ABRAHÃO, J.; RAMOS, C. H. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 1273-92, Aug 2015. ISSN 1678-2690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312418> >.

OSTANKOVITCH, M.; BUCHNER, J. The network of molecular chaperones: insights in the cellular proteostasis machinery. **J Mol Biol**, v. 427, n. 18, p. 2899-903, Sep 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26363891> >.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Sci**, v. 4, n. 11, p. 2411-23, Nov 1995. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8563639> >.

PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 71, n. Pt 5, p. 1051-8, May 2015. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945570> >.

REQUENA, J. M.; MONTALVO, A. M.; FRAGA, J. Molecular Chaperones of Leishmania: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 301326, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26167482> >.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 10, p. 630-42, Oct 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026055> >.

SCHUCK, P. et al. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. **Biophys J**, v. 82, n. 2, p. 1096-111, Feb 2002. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806949> >.

SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania Parasites. In: HOURY, W. A. (Ed.). **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**,. 1: Springer, 2014. p.445 - 481.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 539, 2011. ISSN 1744-4292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988835> >.

SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys J**, v. 76, n. 6, p. 2879-86, Jun 1999. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354416> >.

VEYEL, D. et al. In vitro characterization of bacterial and chloroplast Hsp70 systems reveals an evolutionary optimization of the co-chaperones for their Hsp70 partner. **Biochem J**, v. 460, n. 1, p. 13-24, May 2014. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564700> >.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W668-73, Jul 2004. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215473> >.

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases**. WHO Library. France: WHO. 2013.

_____. Leishmaniasis. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en/> >. Acesso em: 29 e novembro.

WOLYNES, P. G. Evolution, energy landscapes and the paradoxes of protein folding. **Biochimie**, v. 119, p. 218-30, Dec 2015. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530262> >.

ZHAI, P. et al. The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 38, p. 26098-106, Sep 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632665> >.