Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Mestrado acadêmico em Ciências com ênfase em Química Orgânica e Biológica

Dissertação de Mestrado:

Obtenção da co-chaperona mitocondrial hDjC20 humana

Candidato: Arthur Alexandre Pereira

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Borges

São Carlos

2019

Arthur Alexandre Pereira

Obtenção da co-chaperona mitocondrial hDjC20 humana

Dissertação apresentado no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Borges.

São Carlos

2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Clovis e Lucinda que à sua maneira mesmo não compreendendo aquilo que eu faço, tem me apoiado e entendido nas minhas decisões. Ao meu irmão Moisés, que sempre e sempre tem se preocupado comigo, até mais do que eu mesmo. Ao meu irmão Gerson (in memoriam), que sempre pensou o melhor de mim, mais do que realmente eu sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Espiritualidade**, que tem me guiado e me sustentado no meu caminho até o presente momento.

Agradeço o professor **Júlio Cesar Borges** que a mais de dois anos atrás depositou sua confiança em mim e desde então vem com muita paciência contribuindo na minha formação pessoal e profissional. Sempre indicando o melhor caminho e ensinando o que é “rigor científico.

Agradeço as agências de fomento para realização deste trabalho. À **CNPq**, pela bolsa concedida, a **CAPES** e **FAPESP** pelo auxílio financeiro a pesquisa realizada.

Devo agradecer também a toda infraestrutura oferecida pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

Agradeço a todos colegas do LBBP aos antigos e aos novos, pois nesse período foram os meus principais companheiros no dia a dia, bem como me ajudaram em todas as etapas da realização deste trabalho.

Um agradecimento em especial, aos meus colegas dos quais começamos juntos, **Leonardo Yoshida** e **Marcela Torricillas**, onde ambos tiveram uma paciência enorme comigo e sempre me ajudaram, desde o início com as disciplinas e até o momento que escrevo essas linhas. Devo lembrar também do companheiro de laboratório **Laudimir Silva**, onde seus conselhos e parceria foram além das questões acadêmicas, mas sim para a toda a vida, é alguém que posso chamar de amigo.

Agradeço aos meus colegas de casa Juliana, Bruna e Diego pelo companheirismo e apoio desta etapa de minha vida.

Agradeço a minha família, que tem me apoiado sempre nas minhas decisões apesar de estar sempre distante deles.

“O amor cura”

Gerson Pereira.

RESUMO

A estrutura nativa de uma proteína é essencial para o correto funcionamento e em ambiente celular, essa estrutura é adquirida durante um processo denominado de enovelamento proteico. Contudo, falhas durante o enovelamento da proteína podem ocorrer, levando a formação de agregados, que apresentam relação com o surgimento de algumas doenças. Para contornar esse problema a evolução desenvolveu uma maquinaria celular para auxiliar as proteínas nascentes ou mal enoveladas a adquirirem a estrutura nativa. As chaperonas moleculares são um grupo de proteínas que estão envolvidas em diversos processos, como no enovelamento de proteínas nascentes ou mal enoveladas, na prevenção da agregação proteica, no encaminhamento de proteínas agregadas para o processo de degradação, entre outros. As Hsp70, uma das principais famílias de chaperonas moleculares, têm participação em vários desses processos celulares e necessitam de auxílio de cofatores e co-chaperonas para a realização do seu ciclo funcional. A elucidação do mecanismo e a interação dos fatores presentes se fazem necessário para o entendimento do seu ciclo funcional. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma co-chaperona das Hsp70, de origem humana, pertencente à família das *J-proteins*, conhecida por atuar na mitocôndria. A proteína recombinante hDjC20 humana (hDjC20) foi expressa sem o peptídeo sinal de encaminhamento para a mitocôndria, purificada e submetida a caracterização biofísica inicial utilizando as técnicas de dicroísmo circular (CD), fluorescência intrínseca do triptofano, cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os resultados indicam que a hDjC20 recombinante foi obtida com um alto grau de pureza, enovelada e monomérica em solução. Testes de desnaturação química e térmica indicam que a hDjC20, que tem um domínio *zinc-finger*, que se apresenta provavelmente ligada ao zinco que contribui para a estabilidade estrutural da proteína. Testes de fluorescência e CD indicam que a presença de EDTA causa uma redução da estabilidade química da proteína em solução se comparado com a amostra pura.

ABSTRACT

The native structure of a protein is essential for proper cellular functioning, this structure is acquired during a process known folding. However, failure during protein folding may occur, leading to the formation of protein aggregates, which are related to the onset of some diseases. To order to overcome this problem, the cellular machinery has developed a way to lead nascent or badly folded proteins to acquire their native structure. Molecular chaperones are a group of proteins that are involved in several processes, such as in the folding of nascent or badly folded proteins, in the prevention of protein aggregation, in the routing of aggregated proteins to the degradation process, among others. Hsp70, being one of the main families of molecular chaperones, participate in several of these cellular processes and require the help of cofactors and co-chaperones to perform their functional cycle. The elucidation of the mechanism and the interaction of the present factors are necessary for the understanding of its functional cycle. The objective of this study was to obtain a human-origin Hsp70 co-chaperone from the J-protein family, known to act in mitochondria. The recombinant human protein hDjC20 was expressed without the mitochondrial signaling peptide, purified and subjected to initial biophysical characterization using circular dichroism (CD), tryptophan intrinsic fluorescence, size exclusion chromatography (aSEC) and differential scanning calorimetry (DSC). The results indicate that recombinant hDjC20 was obtained with a high purity, folded and monomeric solution. Chemical and thermal denaturation tests indicate that hDjC20, which has a zinc-finger domain, is probably linked to zinc which contributes to the structural stability of the protein. Fluorescence and CD tests may indicate the presence of EDTA causes a reduction in the chemical stability of the protein in solution compared to the pure sample.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Níveis estruturais de uma proteína.....	2
Figura 2: Estrutura da Hsp70.	4
Figura 3: Modelo de funcionamento da maquinaria da Hsp70 baseado em estudos de renolamento in vitro de proteínas desnaturadas.....	6
Figura 4: Estrutura secundária representando o domínio J.	7
Figura 5: Representação das regiões e domínios das <i>J-proteins</i>	8
Figura 6: Sequência e estrutura cristalográfica da hDjC20.	14
Figura 7: Cromatograma de eluição da 2ª afinidade ao Ni ²⁺	23
Figura 8: Cromatograma de eluição da proteína na coluna de cromatografia de exclusão molecular..	24
Figura 9: Produção e purificação da hDjC20 recombinante.	25
Figura 10: Espectro de CD da hDjC20 em uma concentração de 5 µmol.L ⁻¹ da proteína na ausência e na presença de EDTA (5 mmol.L ⁻¹).	26
Figura 11: Perfil de fluorescência da hDjC20 quando excitada em 295 nm.	28
Figura 12: Cromatografia de exclusão molecular analítica da hDjC20	29
Figura 13: Experimento de desnaturação térmica da hDjC20 analisada por CD.....	32
Figura 14: Experimento de desenovelamento térmico da hDjC20 analisada por DSC.....	33
Figura 15: Desnaturação química monitorado por CD.	35
Figura 16: Desnaturação química usando ureia como agente desnaturante monitorado por fluorescência intrínseca do triptofano.	37
Figura 17: Centro de massa espectral <λ> da hDjC20.....	38
Figura 18: Integral da intensidade de fluorescência pela concentração de agente desnaturante.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a: Localização das <i>J-proteins</i> presentes em humanos (GeneCards - Human Genes).....	11
Tabela 1b: Localização das proteínas de domínio J presente no ser humano (GeneCards - Human Genes).....	12
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das proteínas estudadas.....	16
Tabela 3: Proporção de estrutura secundária da hDjC20.	27
Tabela 4: Valores de máximo de fluorescência e centro de massa espectral variando a concentração de proteína.	28
Tabela 5: Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas padrão.	30
Tabela 6: Propriedades estruturais e hidrodinâmicos da hDjC20 em comparação com dados teóricos.	31
Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos da hDjC20 obtidos a partir de DC e DSC.	34
Tabela 8: Parâmetros de estabilidade da hDjC20.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aSEC: Cromatografia de exclusão por tamanho analítica, do inglês *analytical size exclusion chromatography*.

atm: Atmosfera (unidade de pressão).

BSA: Albumina de soro bovino, do inglês *bovine serum albumin*.

CD: Dicroísmo circular, do inglês *circular dichroism*.

C_m : Concentração de agente desnaturante necessário para que 50% das espécies estejam desenoveladas.

cm: Centímetro (10^{-2} metros).

Da: Dalton, unidade de massa atômica.

DLN: Domínio de ligação a nucleotídeos.

DLP: Domínio de ligação a proteínas.

DnaJ: Primeira proteína a ser identificada a sequência que corresponde ao domínio J.

DO_{600nm}: Densidade óptica em 600 nm.

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*.

f/f_0 : Razão friccional. Razão entre o coeficiente friccional experimental obtido de uma proteína e o coeficiente friccional teórico de uma esfera perfeita de mesma massa e volume da proteína.

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

Hsp40: Proteína de choque térmico de 40 kDa.

Hsp60: Proteína de choque térmico de 60 kDa.

Hsp70: Proteína de choque térmico de 70 kDa.

Hsp90: Proteína de choque térmico de 90 kDa.

HPD: motivo estrutural composto pelos aminoácidos histidina, prolina e aspartato.

IPTG: Isopropyl- β -D-tiogalactopiranosídeo.

***J-protein*:** Proteína que possui o domínio J, sendo uma Hsp de 40 kDa.

K_{av} : coeficiente de partição.

kDa: Quilodalton (10^3 daltons).

L: Litro - Unidade de volume.

mL: Mililitro (10^{-3} litros).

MM: Massa molecular.

mm: Milímetro (10^{-3} metros).

MM_{app}: Massa Molecular aparente.

mmol: Milimol (10^{-3} mol).

NEF: Fator de Troca de Nucleotídeo, do inglês *nucleotide exchange factor*.

nm: Nanômetro (10^{-9} metros).

PDB: Banco de Dados de Proteínas, do inglês *Protein Data Bank*.

pH: Potencial hidrogeniônico.

Rg: Raio de giro, em Å.

rpm: Rotações por minuto.

Rs: Raio de Stokes, em Å.

R₀: Raio de Stokes teórico considerando a proteína como uma esfera.

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 dodecyl sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*.

T_m: Temperatura média de transição onde 50% das espécies estão desenoveladas e 50% enoveladas.

U.A.: Unidades arbitrárias.

Å: Ångstron - Unidade de medida.

°C: Graus Celsius - Unidade de Temperatura.

µg: Micrograma (10^{-6} grama).

µL: Microlitro (10^{-6} litros).

µm: Micrometro (10^{-6} metros).

μmol: Micromol (10^{-6} mol).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura de proteínas.....	1
1.2. Chaperonas moleculares.....	3
1.3. A família da Hsp70	3
1.3.1 O ciclo funcional da Hsp70.....	5
1.4. As J-proteins.....	6
1.5. A presença de chaperonas na mitocôndria	9
1.6. hDjC20 aspectos estruturais	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Seleção e obtenção do vetor.....	16
3.2. Transformação, expressão e purificação da J-protein mitocondrial	16
3.3. Lise celular e purificação da hDjC20	17
3.4. Quantificação da proteína.....	18
3.4.1 Preparo da proteína para análise biofísica	18
3.5. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular.....	18
3.5.1 Análise da estrutura secundária.....	18
3.5.2 Desnaturação térmica monitorada por CD	19
3.5.3 Desnaturação química monitorada por CD	19
3.5.4 Fluorescência intrínseca do triptofano	20
3.5.5 Cromatografia de exclusão por tamanho analítica	20
3.5.6 Calorimetria de varredura diferencial.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1. Purificação da hDjC20	23
4.2. Estudo da estrutura secundária, terciária e estado oligomérico da hDjC20.	26
4.2.1 Análise de estrutura secundária por dicroísmo circular.	26
4.2.2 Fluorescência intrínseca do triptofano	27
4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular analítica	29
4.3. Estudo de estabilidade térmica e química da hDjC20.....	31
4.3.1 Estabilidade térmica da hDjC20 analisado por CD e DSC.	31
4.3.2 Desnaturação química monitorada por dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano ³⁴	
5. CONCLUSÕES.....	42

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	44
-----------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Estrutura de proteínas*

Proteínas são macromoléculas complexas estruturalmente, onde sua composição é formada por 20 tipos de aminoácidos. Esses aminoácidos apresentam diferentes combinações de sequência e quantidades em uma proteína, o que garante uma grande diversidade estrutural e funcional das proteínas (ALBERTS et al., 2010).

Os aminoácidos apresentam propriedades químicas distintas e uma cadeia lateral que os difere entre si. Essas cadeias laterais garantem características únicas a esses aminoácidos podendo apresentar caráter polar ou apolar, carregados negativamente ou positivamente, bem como ser uma cadeia que ocupe grande volume em comparação aos outros aminoácidos. Os aminoácidos são ligados entre si por uma ligação peptídica, que consiste na reação entre o grupo carboxílico de um aminoácido com o grupo amino de um segundo aminoácido, resultando em uma ligação covalente e a liberação de uma molécula de água (VOET; VOET, 2013).

As proteínas, por serem macromoléculas, apresentam um conjunto de forças que atuam sobre sua estrutura. A combinação dessas forças com a característica da sequência de aminoácidos presentes em cada região da proteína (característica de caráter polar ou apolar, e tamanho por exemplo), garante aos aminoácidos uma estrutura tridimensional particular, essa estrutura é termodinamicamente a mais estável, ou seja, é aquela que apresenta um menor estado de energia livre. A sequência de aminoácidos ligados entre si, constituem a estrutura primária de uma proteína, sendo que cada sequência é específica, e a informação para a correta estrutura de cada proteína está presente na sequência de nucleotídeos do DNA (NELSON; COX, 2013).

Guiados principalmente por ligações de hidrogênio, ocorre a interação entre os aminoácidos vizinhos e a formação das estruturas secundárias das proteínas, sendo elas as hélice- α , folha- β e voltas. As diferentes interações entre as estruturas secundárias, guiadas por atrações de Van der Waals e atrações eletrostáticas, garantem a formação das estruturas terciárias das proteínas. As estruturas quaternárias envolvem a interação entre duas ou mais cadeias polipeptídicas com estruturas terciárias. Geralmente as proteínas apresentam sua função biológica adequada quando se encontram com estrutura terciária ou estrutura

quaternária como apresentado na Figura 1 (NELSON; COX, 2013; VOET; VOET; PRATT, 2012).

Figura 1: Níveis estruturais de uma proteína.

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2013).

1.2. Chaperonas moleculares

Na década de 1960 em um estudo com glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*, Ritossa e colaboradores concluíram que quando uma célula sofria um processo de estresse, tanto químico como térmico, levava a célula a sintetizar proteínas específicas em grande quantidade (RITOSSA, 1962). Anos mais tarde, essas proteínas foram batizadas como “proteínas de choque térmico” ou Hsp (do inglês “*heat shock proteins*”). As Hsp podem ser agrupadas em cinco famílias: *small* Hsp, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com suas massas moleculares (BORGES; RAMOS, 2005). As chaperonas moleculares são uma classe de proteínas que apresenta a função de guiar a conformação de outras proteínas para seu correto enovelamento impedindo sua agregação, ou de interações não produtiva (MAYER; BUKAU, 2005).

As proteínas recém-sintetizadas pelos ribossomos necessitam, muitas vezes, de auxílio para o correto enovelamento e aquisição de sua estrutura nativa. Nesses casos onde não são possíveis que as proteínas adquiram uma conformação funcional de forma independente, as chaperonas moleculares interagem com essas proteínas, auxiliando-as no enovelamento ou mesmo impedindo a agregação, até que a proteína cliente seja encaminhada ao seu correto destino (LAUFEN et al., 1999; SZABO et al., 1994).

1.3. A família da Hsp70

As Hsp70 e suas co-chaperonas estão envolvidas em muitos processos celulares e dentre as funções das Hsp70, podemos destacar: 1) assistência ao enovelamento correto de proteínas nascentes ou mal enoveladas, 2) transporte de proteínas através de membranas, 3) prevenção da agregação de proteínas por diferentes tipos de estresse e recuperação de agregados, 4) entrega de proteínas mal enoveladas para o sistema ubiquitina-proteassoma para degradação ou pela autofagia mediada por lisossomos e 5) interação com proteínas sinalizadoras intracelulares e receptores acoplados a proteína G (DA SILVA; BORGES, 2011).

Sabe-se também que as Hsp70 tem participação na atividade de proteínas regulatórias, como por exemplo, fatores de transcrição, quinases e receptores nucleares (BORGES; RAMOS, 2005).

As Hsp70 apresentam massa molecular de aproximadamente 70 kDa, e possui um domínio de ligação de nucleotídeos adenosina (DLN - com 45 kDa) que apresenta fraca atividade ATPásica. As Hsp70 apresentam também, um domínio de ligação de proteínas-

cliente (DLP - 25 kDa) cuja função é se ligar a sequência de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. O DLN e DLP são unidos por um *linker* hidrofóbico.

O DLN funciona como uma “concha” exibindo no seu interior um sítio de ligação para ATP e ADP. Já o DLP possui maior afinidade por proteínas-cliente quando o DLN está ligado com ADP, entretanto ocorre uma baixa afinidade do DLP por proteínas-cliente quando estiver ligado ao DLN uma molécula de ATP (BATISTA et al., 2015a).

O DLP possui um subdomínio composto por folha- β pregueada que é a região onde se liga a proteína cliente, e um subdomínio formado por uma grande hélice- α que funciona como uma “tampa” que impede a saída da proteína cliente (Figura 2).

Figura 2: Estrutura da Hsp70. À esquerda domínio DLN responsável pela ligação com o nucleotídeo. À direita, o domínio de ligação de proteínas e ATP/ADP.

Fonte: Adaptado de (LAUFEN et al., 1999; MAYER; BUKAU, 2005).

O ciclo funcional das Hsp70 é regulado por diversos cofatores (Silva & Borges, 2011). O fator de troca de nucleotídeo (NEF, do inglês “*nucleotide exchange factor*”) é responsável por acelerar a troca de nucleotídeos de ADP por ATP. Por outro lado, a atividade ATPásica das Hsp70 é estimulada por proteínas que possuem o domínio J (*J-proteins*), chamadas também de Hsp40 (MAYER; BUKAU, 2005). Ambas serão melhor descritas abaixo.

1.3.1 O ciclo funcional da Hsp70

A Figura 3 sumariza o ciclo funcional das Hsp70. As *J-proteins* ligam-se à proteína clientes através do seu domínio de ligação ao peptídeo e posteriormente interage com a Hsp70 através da região do seu domínio J. Num segundo momento, a proteína conduzida pela *J-protein* interage com uma região aberta da Hsp70, nesta etapa ocorre ainda a hidrólise de ATP, que causa uma mudança conformacional na Hsp70 havendo o fechamento da tampa helicoidal sobre a fenda.

O NEF se liga à Hsp70 causando a dissociação do ADP devido à distorção do seu domínio de ligação e possibilita, desta forma, a entrada de uma nova molécula de ATP. Assim, devido à redução da afinidade do DLP pela proteína cliente, esta pode ser liberada em sua forma enovelada, reiniciando assim o ciclo. Caso ocorra um enovelamento inadequado ou ineficiente da proteína cliente ela poderia entrar novamente no ciclo para obter sua conformação correta, como apresentado na Figura 3.

Portanto, pode-se concluir que a importância da *J-protein* neste ciclo se deve ao fato dela aumentar a velocidade de interação entre proteína cliente e a Hsp70 (LAUFEN et al., 1999; SZABO et al., 1994).

A ligação inicial da proteína cliente desenovelada pela *J-protein* serve para impedir a sua agregação e para "entregá-la" à Hsp70, além de estimular a atividade chaperona e atividade ATPásica da Hsp70. A dissociação da proteína cliente permite que tenha a oportunidade de adquirir seu correto enovelamento (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

Entretanto, caso haja um excesso de concentração de NEF, pode ocasionar a liberação prematura de proteínas com enovelamento incorreto, portanto ambos os cofatores, *J-protein* e NEF, estão em quantidades subestequiométricas em relação as Hsp70. Em estudos laboratoriais com as concentrações de *J-proteins* ficou evidenciado que em concentrações de 10-20 vezes mais baixas do que as Hsp70 são mais eficientes para o estímulo do enovelamento da proteína cliente (GÄSSLER et al., 2001; NOLLEN et al., 2000).

Figura 3: Modelo de funcionamento da maquinaria da Hsp70 baseado em estudos de renolamento in vitro de proteínas desnaturadas. 1) a *J-protein* liga-se à proteína cliente por meio de interação às regiões hidrofóbicas e 2) interage com o DLN da Hsp70 através do seu domínio J. 3) a proteína cliente interage com o local de ligação do peptídeo “aberto” do DLP da Hsp70 e a hidrólise de ATP é estimulada pelo domínio J, causando uma mudança conformacional na Hsp70 fechando a tampa helicoidal estabilizando a interação com a proteína cliente, e a *J-protein* deixa o complexo. 4) O NEF, que tem uma maior afinidade por Hsp70 na presença de ADP do que Hsp70 na presença de ATP, liga-se ao DLN da Hsp70. 5) O ADP dissocia-se através da distorção do DLN. 6) O ATP liga-se a Hsp70. 7) A proteína cliente é liberada devido à sua baixa afinidade pelo Hsp70 na presença de ATP.

Fonte: Adaptado de (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

Em humanos existem apenas 13 tipos Hsp70s e 13 NEFs de 4 diferentes classes, mas existem 41 tipos de *J-proteins*. Além disso, diferente das Hsp70, as *J-proteins* mostram uma grande variação na sequência de aminoácidos bem como uma divergência estrutural significativa, mostrando que desempenham um papel importante nas múltiplas funções da maquinaria celular (RADONS, 2016).

1.4. As *J-proteins*

As *J-proteins* também conhecida como Hsp40, são uma família de co-chaperonas que contêm uma região de 70 aminoácidos conservados denominado de domínio J, onde podemos observar o tripeptídeo HPD (His-Pro-Asp) num loop entre as duas hélices α principais (Figura

4). O motivo HPD é essencial para a função de domínio J, pois ele intermedia a interação com o DLN da Hsp70. O domínio J tem o papel crucial de estimular a atividade ATPásica da Hsp70, onde na maior parte dos casos, o domínio J das *J-protein* está localizado no N-terminal dessas moléculas (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

Figura 4: Estrutura secundária representando o domínio J. Pertencente a DnaJ de *E. coli* (PDB 1XBL).

Fonte: Adaptado de (MAYER; BUKAU, 2005).

Historicamente, as *J-proteins* foram divididas em três classes (I, II e III, ou A, B e C) sendo que essa classificação é dada a partir de sua sequência de aminoácidos, sem relação com sua função bioquímica. Essas *J-proteins* estão envolvidas nos processos de enovelamento de proteínas, uma vez que se ligam em regiões hidrofóbicas impedindo a agregação. Do ponto de vista estrutural, as *J-proteins* são caracterizadas pela presença de um domínio (o domínio J) que é responsável pela estimulação da atividade ATPásica da Hsp70.

As proteínas de “Classe I” foi designada como as proteínas de domínio J com base nos motivos/domínios presentes em DnaJ de *E. coli*. Essas proteínas têm um domínio J no N-terminal (que tem como função conhecida promover a interação com a Hsp70 e estimular a atividade ATPásica), seguido por uma região rica em glicina e fenilalanina que é flexível e desordenada, (funcionando como um espaçador entre o domínio J e outras regiões da proteína), 1 domínio “*zinc finger*” composto por 4 motivos CXXC e um domínio C-terminal. A extremidade C-terminal apresenta um domínio de dimerização, e sua função é aumentar a afinidade com a proteína cliente (CHEETHAM; CAPLAN, 1998; KAMPINGA et al., 2018).

As proteínas classificadas como membros da “Classe II” possuem um domínio J no N-terminal com uma região rica em glicina e fenilalanina, mas essas não possuem o domínio “*zinc finger*” apresentado pelas proteínas de “Classe I”.

Se a *J-protein* apresenta o domínio J, mas não tem uma estrutura que se enquadre na classificação Classe I ou II, é denominada de “Classe III”. A Figura 5 mostra uma representação esquemática das *J-proteins* (HENNESSY et al., 2000; OHTSUKA; HATA, 2000; SONG et al., 2014).

Figura 5: Representação das regiões e domínios das *J-proteins*. Sendo "J-Domain" o domínio J; "G/F" a região rica em glicina e fenilalanina; e "Zn²⁺" a região de repetição de zinc finger.

Fonte: Adaptado de (SONG et al., 2014).

Esta classificação não tem relação com a função bioquímica ou mecanismo de ação dos membros de cada grupo, havendo grande diversidade estrutural e funcional mesmo entre membros de cada grupo. Inclusive, o domínio J, tem sua importância minimizada por esta forma de classificação. Apesar desta classificação ser útil para fins de nomenclatura, não devem ser consideradas informativas quanto à funcionalidade da proteína (CAJO et al., 2006; GOFFIN; GEORGOPOULOS, 1998; GREENE; MASKOS; LANDRY, 1998; HAGEMAN; KAMPINGA, 2009; KOTA et al., 2009; LU; CYR, 1998).

Em alguns casos somente a presença de um domínio J pode ser suficiente para algumas funções celulares. Se essa *J-protein* estiver localizada num local próximo a Hsp70 e a proteína cliente, a mesma direciona a proteína cliente para a interação com a Hsp70.

As interações entre a proteína cliente, *J-protein* e Hsp70 podem ocorrer de formas diferentes. Uma delas é a interação entre a proteína cliente e a Hsp70, e posteriormente a chegada da *J-protein* ocasionando o fechamento da tampa helicoidal sobre a fenda da Hsp70.

Outra possibilidade é a chegada da *J-protein* próximo à proteína cliente desenovelada (sem haver ligação entre elas) e ambas se ligam aos seus respectivos sítios na Hsp70. Outra

forma de interação seria onde a *J-protein* interage com a proteína cliente entregando-a para a Hsp70 (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

A importância fundamental da *J-protein* vai além do enovelamento de proteínas recém-sintetizadas, é muito comum sua presença no processo onde as proteínas cliente são recicladas, aumentando assim a funcionalidade e a vida útil dessas proteínas. Bem como os casos onde as *J-proteins* previnem a agregação de proteínas e encaminham as mesmas para a degradação (KITKY; KOPP; MAYER, 2018).

1.5. A presença de chaperonas na mitocôndria

A Hsp70 mitocondrial, que é conhecida como mortalina em mamíferos, está envolvida em processos de senescência e câncer, além de outras funções importantes. Dentre estas funções, pode-se destacar a importação de proteínas sintetizadas no citosol para a matriz mitocondrial, interação com constituintes mitocondriais e degradação de proteínas dentro da mitocôndria. Adicionalmente, a mortalina está envolvida em funções extra mitocondriais, tais como: interações com a proteína p53, fatores de crescimento e proteínas do retículo endoplasmático, importação de proteínas sintetizadas no citosol para a mitocôndria (DORES-SILVA, 2015).

Dependendo da sua localização e parceiros, a mortalina está relacionada com as seguintes atividades: 1) controle da proliferação celular, 2) tráfego intracelular, 3) inativação da proteína de supressão tumoral p53 e 4) inibição do apoptose (WADHWA et al., 2003).

Existem evidências que mostram que toda a maquinaria da mortalina/*J-protein* desempenha um papel importante na replicação e manutenção do DNA mitocondrial (TÝČ; KLINGBEIL; LUKEŠ, 2015). Essas chaperonas desempenham múltiplas funções e compartilham propriedades com enzimas envolvidas nos estágios iniciais de replicação do DNA mitocondrial. A mitocôndria é um centro de inúmeros processos metabólicos essenciais de uma célula eucariótica e retém genes que codificam subunidades de complexos de cadeias respiratórias e proteínas ribossômicas (CHACINSKA et al., 2009).

A Tabela 1 lista as *J-proteins* humanas e qual a localização celular destas proteínas. Até o momento, foram identificadas 6 *J-proteins* presentes na mitocôndria (com destaque em negrito na tabela), sendo uma de classe A e 5 de classe C.

Dentre as *J-proteins* mitocondriais, a DjA3 que tem funções conhecidas como o encaminhamento de proteínas-cliente para enovelamento, a DjC5 que está envolvida em

processos de exocitose, a DjC19 que participa em processos de importação de proteínas para o ambiente mitocondrial, a DjC29 que está relacionada a processos de degradação de proteínas, a DjC11 que ainda possui funções desconhecidas e a hDjC20 com funções conhecidas na biossíntese de complexos Fe-S e é alvo de estudo deste trabalho.

Tabela 1a: Localização das *J-proteins* presentes em humanos (GeneCards - Human Genes).

<i>DNAJ-</i>	<i>número de aminoácidos</i>	<i>Tamanho (kDa)</i>	<i>Principal localização na célula</i>
<i>A1</i>	397	45	Citosol, citoesqueleto e extracelular
<i>A2</i>	412	46	Citosol e extracelular
<i>A3</i>	480	52	Citosol, mitocôndria e núcleo
<i>A4</i>	397	45	Citosol
<i>B1</i>	340	38	Citosol, núcleo e extracelular
<i>B2</i>	324	36	Citosol, núcleo e reticulo endoplasmático
<i>B3</i>	145	17	Desconhecida
<i>B4</i>	337	38	Citosol e extracelular
<i>B5</i>	348	39	Citosol
<i>B6</i>	326	36	Citosol e núcleo
<i>B7</i>	309	35	Citosol e núcleo*
<i>B8</i>	232	26	Citosol e núcleo
<i>B9</i>	223	26	Extracelular, núcleo e reticulo endoplasmático
<i>B11</i>	358	41	Reticulo endoplasmático
<i>B12</i>	375	42	Reticulo endoplasmático*
<i>B13</i>	316	36	Citoesqueleto
<i>B14</i>	379	43	Citosol e reticulo endoplasmático*
<i>C1</i>	554	64	Reticulo endoplasmático
<i>C2</i>	621	72	Citosol e núcleo
<i>C3</i>	504	58	Extracelular, lisossomo e reticulo endoplasmático
<i>C4</i>	241	28	Membrana plasmática*
<i>C5</i>	198	22	Extracelular, lisossomo, membrana plasmática e mitocôndria

* Encontrada em baixas concentrações.

Tabela 1b: Localização das proteínas de domínio J presente no ser humano (GeneCards - Human Genes).

<i>DNAJ-</i>	<i>Quantidade de aminoácidos</i>	<i>Tamanho (kDa)</i>	<i>Principal localização na célula</i>
<i>C6</i>	913	100	Citosol
<i>C7</i>	494	56	Citosol, extracelular e núcleo
<i>C8</i>	253	30	Citosol e núcleo
<i>C9</i>	260	30	Citosol, extracelular, membrana plasmática e núcleo
<i>C10</i>	793	91	Reticulo endoplasmático
<i>C11</i>	559	63	Extracelular e mitocôndria
<i>C12</i>	198	23	Núcleo*
<i>C13</i>	2243	254	Citosol, endossoma, extracelular, lisossomo e membrana plasmática
<i>C14</i>	702	79	Extracelular
<i>C15</i>	150	16	Mitocôndria*
<i>C16</i>	782	91	Citosol e reticulo endoplasmático*
<i>C17</i>	304	35	Núcleo
<i>C18</i>	358	42	Citosol
<i>C19</i>	116	12	Mitocôndria
<i>C20</i>	235	27	Citosol, mitocôndria e núcleo
<i>C21</i>	531	62	Núcleo
<i>C22</i>	341	38	Membrana plasmática*
<i>C23</i>	760	88	Citosol e reticulo endoplasmático
<i>C24</i>	148	17	Citosol
<i>C25</i>	360	42	Desconhecida
<i>C26</i>	1311	143	Citosol e aparato de Golgi
<i>C27</i>	273	31	Citosol e núcleo*
<i>C28</i>	388	46	Aparato de Golgi
<i>C29</i>	4579	521	Mitocôndria e núcleo
<i>C30</i>	226	26	Citosol e mitocôndria*

Fonte: Adaptado de (KAMPINGA; CRAIG, 2010; WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2017)

1.6. *hDjC20 aspectos estruturais*

As *J-protein* de classe C apresenta um número de aminoácidos variados. A co-chaperona hDjC20, é classificada como uma *J-protein* de classe C, ou seja, apresenta o domínio J conservado em relação as outras proteínas desta família localizado não necessariamente no N-terminal da proteína. A hDjC20 apresenta em sua constituição 235 resíduos de aminoácidos, entretanto, outras proteínas de classe C podem apresentar mais de 2000 resíduos de aminoácidos (como exemplo DjC13 com 2243 resíduos de aminoácidos e a DjC29 com 4579 resíduos de aminoácidos) (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

A hDjC20 apresenta em sua estrutura primária (Figura 6A) três domínios importantes: 1) domínio N-terminal: nesse domínio existe uma região de encaminhamento para a mitocôndria e a presença do “*zinc finger*”, 2) domínio J que é característico das *J-proteins* e 3) domínio C-terminal que está conectado ao domínio J por uma região de *linker* curta (BITTO et al., 2008).

No N-terminal da proteína, existe a presença de 4 cisteínas (Figura 6A), elas formam um motivo estrutural denominado de “*zinc finger*”, esse motivo é capaz de ligar íons de zinco. Na estrutura cristalográfica conhecida (PDB: 3BVO), esses íons de zinco estão exatamente na região de dimerização da hDjC20 (Figura 6C).

Em estudos anteriores com a hDjC20 foi proposto que esta proteína participa da formação do complexo Fe-S, além disso foi obtido pela primeira vez sua estrutura cristalográfica que revelou que nessas circunstância a proteína se apresenta como um dímero majoritariamente composto por hélice- α (BITTO et al., 2008).

Note na Figura 6B indicada abaixo, que os dois triptofanos estão localizados em uma região parcialmente desestruturada da proteína. De acordo com estudos cristalográficos, próximo a esses dois resíduos existe uma região responsável pela dimerização da proteína e pela formação do complexo Fe-S. Pode-se observar também a região correspondente ao domínio J desta proteína e em destaque, a região onde está presente o motivo estrutural HPD.

Figura 6: Sequência e estrutura cristalográfica da hDjC20. A): Sequência de aminoácidos da hDjC20 (código GenBank GI:50301234). A região em magenta corresponde ao peptídeo de encaminhamento da proteína à mitocôndria, em vermelho estão os resíduos de triptofano, em azul está o domínio J e em amarelo o motivo estrutural HPD. B): Estrutura dimérica da hDjC20 (imagem adaptada da estrutura PDB 3BVO). Em vermelho estão os resíduos de triptofano, em azul está o domínio J e em amarelo o motivo estrutural HPD. C) Íons de zinco (em azul) na região de dimerização da proteína.

Fonte: Adaptado de (BITTO et al., 2008; NCBI, 2015). Código de identificação no GenBank GI:50301234. Estrutura cristalográfica código PDB:3BVO

Considerando a importância da Mortalina e das *J-proteins* mitocondriais, este estudo objetivou a caracterização da hDjC20 e futuros estudos de interação entre as proteínas em ensaios *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

O presente trabalho teve por objetivo produção de forma enovelada da *J-protein* hDjC20 humana.

2.2. *Objetivos específicos*

- 1) Expressar de forma heteróloga a proteína hDjC20 e definir um processo de purificação adequado para a proteína.
- 2) Definir o conteúdo de estrutura secundária da hDjC20.
- 3) Análise da estrutura terciária da hDjC20.
- 4) Análise da estabilidade térmica e química da hDjC20.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção e obtenção do vetor

A seleção da *J-protein* mitocondrial foi feita a partir do site Human Gene database (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2017) com o auxílio do banco de dados GenBank do NCBI (NCBI, 2015). Para a construção do plasmídeo em pET28a, foi desconsiderado a região de pares de base que codificam os aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal de encaminhamento para a mitocôndria da hDjC20 e adicionado a região que corresponde a cauda de poli-histidina. O plasmídeo contendo o fragmento de DNA codante da *J-protein* hDjC20, foi obtido junto a empresa Epoch Life Science.

A tabela 2 indica alguns parâmetros importantes para o estudo biofísico da proteína recombinante hDjC20. Esses parâmetros, obtidos a partir da sequência primária da proteína, auxilia para a quantificação e massa molecular da proteína.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das proteínas estudadas.

<i>Parâmetro</i>	<i>Proteína</i>	
	His- hDjC20	hDjC20
<i>Nº GenBank*</i>	GI:50301234	
<i>Nº aminoácidos</i>	226	206
<i>MM (kDa)</i>	26,2	24,5
<i>ϵ_{280nm} (mol.L⁻¹.cm⁻¹)</i>	21430	
<i>ϵ_{280nm} (mol.L⁻¹.cm⁻¹) por Edelhoch</i>	20340	
<i>Triptofano (W)</i>	2	
<i>Fenilalanina (Y)</i>	7	
<i>Cisteína (C)</i>	5	

* código de identificação no GenBank da proteína sem a His-tag e com o peptídeo sinal de encaminhamento para a mitocôndria.

3.2. Transformação, expressão e purificação da *J-protein* mitocondrial

Para a transformação foi utilizada a cepa competente de *E. coli* BL21(DE3) e o plasmídeo de interesse (pET28a::DnaJC20). Para isto, foi usado o processo de choque térmico, onde foi incubado o vetor plasmidial com as bactérias competentes por 30 min no gelo, posteriormente foi submetido a 42 °C por 90 seg, e novamente por 3 min no gelo. Ao meio reacional foi adicionado 1 mL de meio de cultura LB (*Lysogeny Broth*) e incubado por 50 min, 37 °C à 200 rpm. Em seguida foi centrifugado por 5 min, a 3000 rpm à 25 °C. O pellet formado no tubo foi espalhado sobre uma placa de cultura (contendo meio LB, de canamicina na concentração de 30 µg.mL⁻¹ e ágar) e incubada

por 16 h à 37 °C. As células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo de interesse, foram então cultivadas em meio LB contendo canamicina (30 µg.mL⁻¹) até a cultura bacteriana atingir uma DO_{600nm} entre 0,6-0,8 UA. Em sequência a temperatura foi reduzida para 30 °C e a indução para a expressão de proteínas foi iniciada pela adição de IPTG, concentração final de 0,2 mmol.L⁻¹, por um período de 4 h.

3.3. *Lise celular e purificação da hDjC20*

Posteriormente a indução, foi realizado uma centrifugação de 8000 rpm, por 20 min, em 4 °C, o pellet obtido contendo a hDjC20 foi ressuspenso em tampão de lise (30 mL por litro de indução - contendo 25 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl, pH 7,5 e KCl 150 mmol.L⁻¹). Foi adicionada 7 U de DNase (Promega) e 30 µg.mL⁻¹ de lisozima (Sigma), homogeneizada a mistura e por um período de 30 min deixada no gelo, as células foram lisadas por sonicação e centrifugadas a 18000 rpm, 4 °C por 20 min, o sobrenadante foi filtrado por membranas de polipropileno (Millipore) com poros de 0,45 µm. A proteína obtida após a filtração foi purificada por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ usando uma coluna *HiTrap Chelating HP* (GE Healthcare LifeSciences) que foi previamente equilibrada com o tampão de lise, onde para a eluição das proteínas foi utilizado o mesmo tampão acrescido de 500 mmol.L⁻¹ de imidazol (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Para a clivagem da cauda de poli-histidina, a His- hDjC20 foi incubada em diálise com trombina (Sigma tamanho 37,4 kDa) a 4 °C por 16 h com 10 U de trombina para cada 1 mg de proteína. Onde o tampão usado nessa diálise, é o tampão de lise sem a presença de imidazol. Em seguida a proteína foi novamente submetida a cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ onde nesta etapa, a fração de interesse foi aquela que não apresentou interação com a resina.

Em seguida foi purificada por cromatografia de exclusão preparativa realizada em coluna HiLoad Superdex 16/60 (GE Healthcare LifeSciences) utilizando o equipamento AKTA prime plus (GE Healthcare LifeSciences). Para o equilíbrio da coluna cromatográfica e eluição da proteína foi utilizado o seguinte tampão: 25 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mmol.L⁻¹ de NaCl, 5 mmol.L⁻¹ de KCl e 2 mmol.L⁻¹ de β-mercaptoetanol.

3.4. *Quantificação da proteína*

A proteína foi quantificada pelo método de Pace usando espectrofotometria no ultravioleta e os cálculos foram realizados utilizando o coeficiente de extinção molar obtido através do programa Sednterp (<http://sednterp.unh.edu/>) e quantificado fazendo uso da regra de Beer-Lambert (PACE et al., 1995):

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

onde C é a concentração molar (mol.L^{-1}), Abs é a absorbância em 280 nm, l é o caminho ótico (cm), e ϵ é o coeficiente de extinção molar da proteína (Tabela 2).

Para fins de comparação dentre os métodos de quantificação, a proteína também foi quantificada pelo método de Edelhock, neste método, a solução contendo a proteína é incubada por 30 min com um quarto de volume do seguinte tampão: 6 mol.L^{-1} de cloridrato de guanidina, 20 mmol.L^{-1} de fosfato em pH 6,5 (EDELHOCH, 1967).

3.4.1 *Preparo da proteína para análise biofísica*

Após a purificação da hDjC20, em alguns dos testes biofísicos realizados a proteína foi submetida em duas condições experimentais:

- 1) **Amostra pura:** a proteína se encontra recém purificada, onde de acordo com a literatura existe a possibilidade de que íons de Zn^{2+} tivesse alguma contribuição na estrutura da proteína. Para estes testes, foi utilizado o mesmo tampão de purificação da proteína.
- 2) **Na presença de EDTA:** a proteína depois de purificada foi dialisada sucessivamente em um tampão contendo 5 mmol.L^{-1} de EDTA. Pois o EDTA é um composto que quela íons zinco.

3.5. *Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular*

Para as análises por dicroísmo circular (CD), foi utilizado um espectropolarímetro Jasco J-815 com um sistema Peltier PFD 425S acoplado para controle de temperatura.

3.5.1 *Análise da estrutura secundária*

Para os testes de análise de estrutura secundária, os espectros de CD foram obtidos com 40 acumulativas, com o tempo de resposta de 1 seg, com velocidade de escaneamento de 50 nm.min^{-1} e em cubeta retangular de 0,1 cm de caminho óptico, com a concentração da proteína de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Foi estimada a estrutura secundária da

proteína utilizando o programa *CDNN Deconvolution* (GERALD BOHM, [s.d.]). E os espectros foram convertidos em elipticidade molar residual ($[\theta]$) de acordo com a equação:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MM}{c \cdot l \cdot n} \quad (\text{Equação 2})$$

sendo $[\theta]$ a elipticidade molar residual média ($\text{graus} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), MM a massa molecular da proteína em kDa, C é a concentração da proteína em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, l o caminho ótico em cm e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

3.5.2 Desnaturação térmica monitorada por CD

Para os experimentos de desnaturação térmica da hDjC20 foi usado a concentração da proteína de $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, onde foi monitorado pontualmente nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm e coletado os dados na faixa entre 20-90 °C.

Foi verificado a perda da estrutura secundária com uma taxa de aquecimento de $1 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, com estabilização da temperatura por 10 seg, sendo que a velocidade de escaneamento foi de $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.5.3 Desnaturação química monitorada por CD

Posteriormente foram realizados estudos de desnaturação química da hDjC20, onde foi verificado a perda da estrutura secundária de hélice- α da proteína usando o comprimento de onda de 222 nm monitorado por CD com a adição de cloridrato de guanidina e um segundo experimento adicionando ureia. Nesse experimento a proteína, em concentração de $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, foi incubada com cloridrato de guanidina por 30 min em diferentes concentrações ($0\text{-}3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), quando usado ureia como agente desnaturante as concentrações foram de $0\text{-}6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Posteriormente ao período de incubação, a proteína foi analisada por CD.

Os agentes desnaturantes foram ambos preparados no mesmo dia do ensaio. Onde, quando usado ureia como agente desnaturante, a concentração molar foi determinada por refratometria de acordo com a equação (WARREN; GORDON, 1966):

$$(117,66 \cdot \Delta N) + (29,753 \cdot (\Delta N)^2) + (185,56 \cdot (\Delta N)^3) \quad (\text{Equação 3})$$

onde ΔN é a diferença do índice de refração do tampão e o índice de refração da solução de ureia.

Para o cálculo da concentração molar de cloridrato de guanidina, também foi determinada por refratometria, de acordo com a equação (PACE et al., 1995):

$$(57,147.\Delta N) + (38,68.(\Delta N)^2) - (91,60.(\Delta N)^3) \quad (\text{Equação 4})$$

onde ΔN é a diferença do índice de refração do tampão e o índice de refração da solução de cloridrato de guanidina.

3.5.4 Fluorescência intrínseca do triptofano

Usando o leitor de placas VarioskanTM LUX (Thermo Scientific) foi analisado a estabilidade e possíveis mudanças conformacionais da proteína através da fluorescência intrínseca do triptofano. Para isto, foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 295 nm e os espectros de emissão de fluorescência foram coletados entre 313-420 nm e o modelo da placa utilizada nos experimentos foi a *Greiner U-Botton 96-well Microolon* (LAKOWICZ, 2006).

Para os experimentos de desenovelamento químico, foi utilizado o mesmo leitor de placas e o modelo de placa do experimento de fluorescência anterior, e a concentração da proteína hDjC20 foi de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Foram utilizados os agentes desnaturantes ureia e cloridrato de guanidina para esses experimentos. Os espectros obtidos foram tratados para o centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$) e ajustados pela função de Boltzmann, de acordo com a equação:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (\text{Equação 5})$$

sendo $\langle \lambda \rangle$ o centro de massa espectral em nm, F_i a intensidade de fluorescência obtida, e λ_i os respectivos comprimentos de onda.

3.5.5 Cromatografia de exclusão por tamanho analítica

Foi utilizado a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC) para a determinação da massa molecular aparente (MM_{ap}) e obtenção do raio de Stokes (R_s) da proteína hDjC20. OS experimentos foram conduzidos como descrito em (SERAPHIM et al., 2013; SILVA; SERAPHIM; BORGES, 2013). Sucintamente, usando a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), acoplada a um ÄKTA Pure (Ge Heathcare Life Sciences), foi injetado um padrão contendo a seguintes proteínas como mistura: Apoferritina (480 kDa – R_s 67 Å), γ -globulina (160 kDa – R_s 48 Å), 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), sendo que a partir do perfil de eluição dessas proteínas, que são proteínas globulares, foi possível criar uma curva de calibração e calcular os parâmetros hidrodinâmicos da proteína de interesse. Foi injetado 100 µL de proteína em diferentes concentrações (10 - 122 µmol.L⁻¹) e em fluxo constante de 0,5 mL.min⁻¹. Usando o volume de retenção, se obteve o coeficiente de partição (k_{av}) de acordo com a equação:

$$k_{av} = \frac{v_e - v_0}{v_t - v_0} \quad (\text{Equação 6})$$

onde k_{av} é o coeficiente de partição, v_0 volume morto da coluna, v_e é o volume de eluição da proteína e v_t o volume total da coluna.

A partir da curva de calibração foi construído um gráfico de logMM x K_{av} das proteínas padrão utilizadas, e a equação da reta obtida deste gráfico foi utilizado para obter a MM_{ap} da proteína estudada.

Para calcular o R_s da proteína de interesse, se utiliza do ajuste linear dos valores de R_s das proteínas padrão já conhecidas *versus* $-\text{Log}K_{av}^{1/2}$, de acordo com a equação:

$$R_s = a(-\log k_{av}^{1/2}) + b \quad (\text{Equação 7})$$

onde R_s é o raio de Stokes, a coeficiente angular e b coeficiente linear.

Usando o valor de R_s experimental obtido da proteína, foi comparado com o valor do R_s teórico (R_{sph}) calculado para uma esfera de mesma MM usando o *software Sednterp*. A razão do R_s experimental pelo teórico rende a razão friccional (f/f_0) onde se permite avaliar o formato da proteína de interesse (WALTER STANFFORD, [s.d.]).

3.5.6 Calorimetria de varredura diferencial

Para os experimentos de desdobramento térmico e obtenção de parâmetros termodinâmicos, uma das técnicas utilizadas foi a calorimetria de varredura diferencial (DSC), onde a hDjC20 foi preparada em 2 condições diferentes (de acordo com tópico 3.5.3). O tampão usado no experimento não continha β-mercaptoetanol devido este reagente ser redutor e um possível interferente nos ensaios de DSC.

Os experimentos de DSC foram realizados de acordo com (BATISTA et al., 2015b; VELOSO-SILVA et al., 2019) e utilizando o equipamento Nano DSC (TA Instruments) presente no grupo NEQUIMED-IQSC, no intervalo de monitoramento de

20-90 °C, com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min e com pressão controlada de 3 atm, onde a concentração de hDjC20 utilizada neste experimento foi de 2,0 mg.ml⁻¹. Por fim, os dados (que foram obtidos em triplicata experimental e replicata biológica) foram subtraídos de seus respectivos brancos e tratados no software *Launch NanoAnalyze (TA Instruments)*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Purificação da hDjC20

Conforme descrito da sessão Materiais e métodos, a hDjC20 recombinante foi expressa em *E. coli* e depois purificada em dois passos cromatográficos. A Figura 7 representa o perfil cromatográfico referente a purificação de afinidade ao níquel. Após a clivagem da cauda de poli-histidina com trombina uma nova cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} foi realizada. Na 2ª afinidade ao níquel, observou-se que a fração da hDjC20 que teve sua cauda de poli-histidina clivada, eluiu entre 5-15 mL, pois passou direto pela fase estacionária sem interação. E que após adicionarmos um tampão com imidazol, houve a eluição da fração não clivada de hDjC20 (23-30 mL).

Figura 7: Cromatograma de eluição da 2ª afinidade ao Ni^{2+} . Observa-se que durante a eluição da proteína (0-23 mL) não houve interação com a coluna. Quando usado um tampão com imidazol, observa-se a eluição da fração de hDjC20 que interagiu com a coluna (23-35 mL)

Fonte: Autoria própria.

Na cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, observa-se 2 picos no cromatograma (Figura 8), o primeiro em aproximadamente 40 mL que corresponde ao

volume morto da coluna e o segundo referente a proteína, que eluiu em um volume da aproximadamente 85 mL.

Figura 8: Cromatograma de eluição da proteína na coluna de cromatografia de exclusão molecular. Observa-se uma fração que saiu com o volume morto da coluna (40-50 mL) essa fração foi descartada. A fração eluída entre 80-95 mL foi usada na continuidade dos experimentos.

Fonte: Autoria própria

Conforme observado por SDS-PAGE 15% demonstrado na Figura 9, a proteína foi obtida com alto grau de pureza (gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*). A hDjC20 foi expressa majoritariamente na fração solúvel com uma MM estimada de 25 kDa (canaleta 3, Figura 9), como predito a partir da sequência de aminoácidos indicado pela Tabela 2.

Figura 9: Produção e purificação da hDjC20 recombinante. SDS-PAGE contendo: (M) marcador molecular, (1) células não induzidas, (2) após as 4 horas de indução com IPTG, (3) filtrado após a lise celular, (4) purificação por coluna de afinidade em Ni^{2+} e (5) cromatografia de exclusão molecular preparativa com a cauda de poli-histidina clivada.

Fonte: Autoria própria.

A proteína hDjC20 foi quantificada por 2 métodos diferentes, o método de Pace e o método de Edelhoch, este segundo tem por vantagem em relação ao primeiro que o tampão utilizado para a quantificação expõe resíduos de aminoácidos que absorvem com comprimento de onda de 280 nm, garantindo que todos os aminoácidos da proteína estão absorvendo energia de forma equivalente (EDELHOCH, 1967; PACE et al., 1995).

Usando ambas as técnicas de quantificação, notou-se uma diferença inferior a 2% nos valores de concentração da proteína, indicando, portanto, que o método de Pace foi eficiente para excitação de todos os aminoácidos aromáticos. Desta forma após várias constatações deste fato, passou-se a utilizar o método de Pace para a quantificação.

Após o último passo cromatográfico, a hDjC20 apresentou um rendimento de aproximadamente 15 mg por litro de meio de cultura de indução. Onde que com

sucessivas purificações, foi observado que quando a lise celular e os passos cromatográficos eram realizados com uma menor quantidade de indução (250 mL) o rendimento final de proteína era maior (dados não mostrados).

4.2. Estudo da estrutura secundária, terciária e estado oligomérico da hDjC20.

4.2.1 Análise de estrutura secundária por dicroísmo circular.

O espectro de CD da hDjC20 representado na Figura 10, demonstrou que a proteína nas 2 condições experimentais, foi obtida de forma estruturada, tendo a hélice- α com estrutura secundária majoritária, conforme deconvolução do espectro de CD. Experimentos de CD na presença de EDTA (5 mmol.L⁻¹), não resultaram em alterações no espectro de CD, indicando que os íons Zn²⁺ ligados ao motivo *zinc finger* não alterou a estrutura secundária da proteína.

Figura 10: Espectro de CD da hDjC20 em uma concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da proteína na ausência e na presença de EDTA (5 mmol.L⁻¹).

Fonte: Autoria própria

Conforme indicado na Tabela 3, a hDjC20 apresentou alta quantidade de estrutura em hélice- α (58% aproximadamente), resquícios de folha- β (7%

aproximadamente), baixa quantidade de voltas (13% aproximadamente) e uma parcela de aminoácidos desprovida de estrutura secundária, sem estrutura definida (22% aproximadamente), sendo esses valores obtidos a partir do *software CDNN Deconvolution* (GERALD BOHM, [s.d.]).

Quando comparado aos valores teóricos da estrutura PDB 3BVO, obtidos pelo programa *Stride*, pode-se observar uma boa correlação entre os dados experimentais e os calculados para a estrutura em alta resolução.

Tabela 3: Proporção de estrutura secundária da hDjC20. Observa-se que as porcentagens de cada tipo de estrutura secundária obtida para a proteína em solução, são bem próximos aos obtidos da estrutura cristalográfica.

*dados obtidos a partir da estrutura PDB 3BVO pelo método Stride (DMITRIJ FRISHMAN; PATRICK ARGOS, [s.d.]).

<i>Parâmetro</i>	<i>hDjC20</i>	<i>Estrutura PDB 3BVO*</i>
<i>Hélice-α</i>	58%	60%
<i>Folha-β</i>	7%	0%
<i>Voltas</i>	13%	25%
<i>Estrutura randômica</i>	22%	15%

Fonte: Autoria própria

4.2.2 *Fluorescência intrínseca do triptofano*

A proteína hDjC20 apresenta em sua composição 2 resíduos de triptofano, portanto estudos de fluorescência podem indicar possíveis alterações locais na estrutura tridimensional da proteína próxima a região em que cada triptofano está presente.

Quando uma proteína esta enovelada, parte dos resíduos de triptofano que se encontram no cerne hidrofóbico da proteína emitem uma fluorescência abaixo dos 330 nm. Enquanto que para uma proteína desenovelada, os resíduos de triptofano que estão totalmente expostos ao solvente, emitem uma fluorescência entre 340-350 nm. Portanto o $\lambda_{\text{máx}}$ indica o máximo de fluorescência dos aminoácidos e o $\langle \lambda \rangle$ indica o perfil de emissão da proteína como um todo, ficando mais fácil de visualizar o deslocamento da emissão para comprimento de onda menos energéticos (LAKOWICZ, 2006).

Testes de espectroscopia de emissão de fluorescência realizados com excitação em 295 nm em diferentes concentrações da proteína, indica que a mesma não possui

mudança estrutural na região onde se encontra o triptofano, visto que tanto o $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$ não houve mudança significativa em seus valores (Figura 11 e Tabela 4), e que eles se encontram parcialmente exposto ao solvente, pois possui um $\lambda_{\text{máx}}$ de 337 ± 1 nm e $\langle\lambda\rangle$ $349,6 \pm 0,2$ nm (Tabela 4).

Figura 11: Perfil de fluorescência da hDjC20 quando excitada em 295 nm. Observa-se que a proteína não apresenta deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ com alterações em sua concentração.

Fonte: Autoria própria

Tabela 4: Valores de máximo de fluorescência e centro de massa espectral variando a concentração de proteína.

$[DjC20] (\mu\text{mol.L}^{-1})$	$\lambda_{\text{máx}} (\text{nm})$	$\langle\lambda\rangle (\text{nm})$
8	338	349,4
16	338	349,5
32	336	349,6
64	336	349,7
144	336	349,8
Média	337 ± 1	$349,6 \pm 0,2$

Fonte: Autoria própria

4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular analítica

O formato e a presença de estrutura quaternária da hDjC20 em diferentes concentrações de proteínas foi avaliada por aSEC. Como pode ser visto na Figura 12, que representa o perfil cromatográfico com absorbância normalizada, o perfil de eluição da proteína é idêntico indicando ausência de efeito concentração dependente.

Figura 12: Cromatografia de exclusão molecular analítica da hDjC20. A) Perfil de eluição da hDjC20 em comparação as proteínas padrões. B) Estimativa do MM_{ap} da hDjC20. O gráfico mostra os K_{av} das proteínas globulares em função da massa molecular. C) Estimativa do R_s da hDjC20. O gráfico mostra os R_s das proteínas globulares em função do coeficiente de partição K_{av} .

Fonte: Autoria própria

Para os cálculos de MM_{app} e raio de Stokes experimental da proteína hDjC20 o perfil de eluição foi comparado ao perfil de eluição de proteínas globulares de raios de Stokes e MM conhecidos (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas padrão.

<i>Padrão de proteínas</i>	<i>Massa molecular (kDa)</i>	<i>R_s (Å)</i>
Apoferitina	480	67
γ-globulina	160	48
BSA	67	36
Anidrase carbônica	30	24
Citocromo C	12,3	14

Fonte: Valores obtidos das estruturas cristalográficas (dados não mostrados).

Os resultados obtidos para a hDjC20 indicaram uma MM_{ap} de 32 ± 1 kDa e uma f/f_0 de $1,29 \pm 0,01$, note na Tabela 6 que a MM predita para essa proteína é de 24,5 kDa, sugerindo dessa forma que a hDjC20 seja um monômero alongado em solução. Os valores preditos de MM e R₀ foram obtidos através do uso do *software Sednterp* (WALTER STANFFORD, [s.d.]).

Quando analisado tanto na presença de EDTA quanto na amostra pura, a hDjC20 manteve os parâmetros de MM_{app} e formato, portanto os cromatogramas de eluição nessas condições (com EDTA) não foram apresentados.

Entretanto, existem estudos que apontam a hDjC20 pode se comportar como dímero em ambiente celular (BITTO et al., 2008). Todavia, nos testes realizados durante este trabalho em replicatas experimentais e de diferentes lotes de purificação, a hDjC20 se comportou exclusivamente de forma monomérica (Figura 12 e Tabela 6).

Tabela 6: Propriedades estruturais e hidrodinâmicas da hDjC20 em comparação com dados teóricos. Observa-se que a proteína se comporta como um monômero alongado em solução.

Propriedade	Preditos para uma esfera			Determinação experimental
	Monômero*	Dímero*	Hydropro**	aSEC
MM (kDa)	24,5	48,9	24,9	32 ± 1
R_s (Å)	20	29	26,2	25 ± 1
f/f_0	-	-	-	$1,29 \pm 0,01$

*dados obtidos a partir da sequência de aminoácidos da construção da proteína usada no experimento, desconsiderando o peptídeo de encaminhamento para a mitocôndria através do software protparam.

**dados obtidos a partir da subunidade A da estrutura PDB 3BVO, considerando a proteína como monômero.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que utilizando a técnica aSEC a proteína estudada se apresentou como um monômero em solução independente da concentração ou condição de preparo da amostra (nativa ou com EDTA) e em todos os casos, com uma forma alongada (f/f_0 de $1,29 \pm 0,01$).

4.3. Estudo de estabilidade térmica e química da hDjC20

4.3.1 Estabilidade térmica da hDjC20 analisado por CD e DSC.

Foi analisado a perda de estrutura secundária no comprimento de onda de 222 e 208 nm, observa-se que a hDjC20 em sua estrutura nativa apresentou T_m de 58 ± 2 °C e na presença de EDTA registrou-se uma T_m de 54 ± 2 °C (Figura 13 e Tabela 7). Para os dados em questão, mostra que a hDjC20 em sua estrutura nativa apresenta maior estabilidade térmica quando comparado com a mesma proteína na presença de EDTA, indicando, portanto, que o EDTA causa perturbação na proteína. Como mostrado na Figura 6, o íon de zinco encontra-se numa região próxima ao sítio de dimerização da proteína, desta forma, provavelmente o EDTA age como um agente quelante competindo com a proteína pelo íon de zinco, visto que os íons se encontram numa região parcialmente desenovelada.

Figura 13: Experimento de desnaturação térmica da hDjC20 analisada por CD. Ambos os espectros com a hDjC20 em concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Pannel A: hDjC20 na condição nativa. Pannel B: hDjC20 na presença de EDTA.

Fonte: Autoria própria

Figura 14: Experimento de desenovelamento térmico da hDjC20 analisada por DSC. Ambos os espectros com a hDjC20 em concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Painei A: hDjC20 na condição nativa. Painei B: hDjC20 na presença de EDTA.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos da hDjC20 obtidos a partir de DC e DSC.

<i>DjC20</i>	<i>CD</i>	<i>DSC</i>	
	$T_m (^{\circ}C)_{222\text{ nm}}$	$T_m (^{\circ}C)$	$\Delta H (\text{kJ.mol}^{-1})$
<i>Nativa</i>	58 ± 2	$59,9 \pm 0,1$	350 ± 20
<i>Com EDTA</i>	54 ± 2	$56,2 \pm 0,1$	440 ± 20

Fonte: Autoria própria

Dados de DSC mostram que a proteína apresenta uma T_m menor na presença de EDTA se comparado ao seu estado nativo. Desta forma nota-se que o zinco tem algum efeito de estabilização na estrutura terciária da proteína (Figura 14 e Tabela 7).

Interessante notar que, para parâmetros de estabilidade térmica, o zinco tem influência na estrutura terciária e para estabilidade de estruturas secundária.

4.3.2 Desnaturação química monitorada por dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano

Os ensaios de estabilidade química da hDj20 foram realizados com o objetivo de entender se diferentes condições de tampão causavam o mesmo efeito de alteração na estabilidade como demonstrado em experimentos de desenovelamento térmico.

A hDjC20 foi incubada com diferentes concentrações de agentes desnaturante (ureia e cloridrato de guanidina) e avaliado por CD para verificar a perda de estrutura secundária (monitorado no comprimento de onda de 222 nm), e por fluorescência intrínseca do triptofano para estudar a estrutura terciária local.

Nos testes de CD, quando foi usando ureia como agente desnaturante observou-se que a C_m apresentada pela proteína hDjC20 na amostra pura foi de $4,3 \pm 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$. A condição de hDjC20 na presença de EDTA, a C_m apresentada para ureia é de $3,8 \pm 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 15 e Tabela 8).

Quando usado cloridrato de guanidina como agente desnaturante, a C_m apresentada pela proteína na amostra pura é de $1,2 \pm 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e para a condição na presença do EDTA apresenta uma C_m de $1,1 \pm 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ não apresentando uma diferença mensurável para este experimento.

Figura 15: Desnaturação química monitorado por CD. A) Usando ureia como agente desnaturante. B) Usando cloridrato de guanidina como agente desnaturante.

Fonte: Autoria própria

Agora quando analisado a desnaturação química da proteína usando a fluorescência intrínseca do triptofano como sonda (Figura 16) pode ser observado que há um deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ para comprimentos de onda maiores, indicando que os triptofanos foram mais expostos ao solvente em solução.

Usando o $\langle \lambda \rangle$ observou-se que a C_m de ureia como agente desnaturante é de $4,3 \pm 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ para o estado da proteína nativa. Na presença de EDTA observou-se uma mudança grande na estabilidade terciária da proteína onde a C_m por ureia é de $2,8 \pm 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$. Quando usado cloridrato de guanidina como agente desnaturante, observa-se que não há mudanças significativas referente à estabilidade (Figura 17).

Figura 16: Desnaturação química usando ureia como agente desnaturante monitorado por fluorescência intrínseca do triptofano. A) Usando hDjC20 em seu estado nativo. B) hDjC20 na presença de EDTA.

Fonte: Autoria própria.

Figura 17: Centro de massa espectral $\langle\lambda\rangle$ da hDjC20. A) Usando ureia como agente desnaturante com hDjC20 $5\ \mu\text{mol.L}^{-1}$. B) Usando cloridrato do guanidina como agente desnaturante com hDjC20 $10\ \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8: Parâmetros de estabilidade da hDjC20.

Proteína	CD $_{222nm}$		Fluorescência do W	
	<i>Cm</i> ureia [mol.L ⁻¹]	<i>Cm</i> GndCl [mol.L ⁻¹]	<i>Cm</i> ureia [mol.L ⁻¹]	<i>Cm</i> GndCl [mol.L ⁻¹]
<i>hDjC20 nativa</i>	4,3 ± 0,3	1,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3	1,2 ± 0,4
<i>hDjC20 com EDTA</i>	3,8 ± 0,3	1,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2

Fonte: Autoria própria

É comum em experimentos que se usa agentes desnaturantes que ocorra um efeito de supressão na emissão de fluorescência, entretanto para ambos os agentes desnaturantes, não houve um efeito significativo de supressão de fluorescência, apesar de, como esperado, haver uma mudança no $\langle \lambda \rangle$ da proteína.

Observa-se pela Figura 16 que a hDjC20 apresenta em algumas curvas de fluorescência, um efeito de supressão, entretanto não de forma ordenada, pois numa concentração intermediária de agente desnaturante, ocorre o efeito de supressão e posteriormente em concentração maior de agente desnaturante, o efeito de supressão é menor. Portanto, pode-se concluir que algum efeito de supressão interna ocorre pelo no triptofano, não podendo assumir uma influência significativa dos agentes desnaturantes para a supressão.

Outra forma de análise, é através de verificar a área sobre a curva de fluorescência para cada concentração de agente desnaturante (Figura 18).

Figura 18: Integral da intensidade de fluorescência pela concentração de agente desnaturante. A) Usando ureia como agente desnaturante com hDjC20 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. B) Usando cloridrato de guanidina como agente desnaturante com hDjC20 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se na figura 18, que quando usado ureia como agente desnaturante a hDjC20 em sua forma nativa, não apresenta mudanças significativas em relação a intensidade de sinal, agora com a proteína na presença de EDTA, em valores próximos a C_m nessa condição, ocorre um evento de supressão no sinal, onde ao mesmo tempo que

os triptofanos da hDjC20 são exposto ao solvente provavelmente o EDTA contribui na supressão de fluorescência. Provavelmtende o EDTA sequestra o Zn^{2+} causando alguma perturbação na estrutura local da proteína.

Agora quando analisado usando cloridrato de guanidina não se observa relação da concentração de agente desnaturante com intensidade de fluorescência, entretanto, na presença de EDTA, a fluorescência da proteína, é menor.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a proteína hDjC20 foi expressa em *E. coli* e purificada com alto grau de pureza como observado por SDS-PAGE 15%. Adicionalmente, os experimentos de caracterização biofísica da proteína mostram que a mesma foi obtida enovelada, onde possui majoritariamente hélice- α como estrutura secundária, em concordância com a sua estrutura 3D (PDB 3BVO), conforme avaliado por CD.

Dados obtidos a partir da técnica de fluorescência, usando como sonda o triptofano, indicaram que ambos triptofanos se encontram parcialmente expostos ao solvente e que não há mudanças conformacionais locais com alta concentração de proteína. Dados de aSEC também demonstram que a proteína não possui efeito de concentração dependente mantendo seu perfil de eluição o mesmo independente da concentração utilizada.

Os resultados obtidos por aSEC, demonstram que a hDjC20 se encontra na forma monomérica nas condições dos experimentos *in vitro* realizados, onde a proteína foi analisada em 2 condições diferentes e dentro dos parâmetros analisados ela apresenta na forma de monômero levemente alongado.

Por sua vez, dados de DSC indicam que a hDjC20 apresenta perda de estabilidade em sua T_m na condição onde há presença de EDTA indicando uma perda de estabilidade na estrutura da proteína.

Dados de desnaturação química e térmica quando analisado por CD, indicam uma estabilidade menor quando a proteína se encontra na presença de EDTA. Portanto de alguma forma o EDTA foi capaz de desestabilizar parcialmente estruturas em hélice- α , provavelmente por retirar o íon Zn^{2+} do domínio *zinc-finger* da hDjC20.

Os dados de DSC e de CD são complementares visto que o primeiro se refere a perda da estrutura terciária global da proteína, enquanto no segundo observa-se a perda de estrutura secundária da proteína.

Desta forma pode-se concluir que o zinco desempenha alguma função que facilita a estabilidade da proteína em solução.

A técnica de fluorescência intrínseca do triptofano mostrou dados parecidos com os obtidos por CD, onde a mudança mais significativa da estrutura terciária local foi para a condição onde a hDjC20 se encontrava na presença de EDTA.

Para a hDjC20 ainda existem perguntas a serem respondidas, sobre sua função como co-chaperona mitocondrial. Até o presente momento apenas estudos de sua participação no complexo Fe-S é conhecida, entretanto a proteína possui em sua estrutura um domínio J e o motivo estrutural HPD, características da família de co-chaperonas Hsp40.

Estudar e elucidar possíveis formas de interação entre esta co-chaperona e outras chaperonas presente na mitocôndria ainda é um vasto campo de estudos.

Experimentos iniciais foram realizados para interação entre essa co-chaperona com a mortalina (chaperona mitocondrial), entretanto nas condições dos testes realizados não foi verificado nenhuma forma de interação entre essas proteínas.

Desta forma ainda fica várias perguntas a serem respondidas em relação do porque da presença do domínio J nesta proteína e possíveis testes e experimentos a serem planejados e realizados. Onde seriam necessários a realização de testes funcional e de interação da hDjC20 com outras proteínas que fazem parte do seu ciclo funcional.

Experimentos de atividade ATPásica envolvendo a mortalina, GrpE e hDjC20 são previstos para serem realizados pelo grupo. Bem como experimentos de interação proteína-proteína usando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição ed. [s.l: s.n.].
- BATISTA, F. A. H. et al. From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/Hsp90 Network. **Current protein & peptide science**, v. 16, n. 8, p. 735–53, 2015a.
- BATISTA, F. A. H. et al. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **FEBS Journal**, v. 282, n. 2, p. 388–406, 2015b.
- BITTO, E. et al. Structure of human J-type co-chaperone HscB reveals a tetracysteine metal-binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 30184–30192, 2008.
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. May 2017, p. 257–261, 2005.
- CAJO, G. C. et al. The role of the DIF motif of the DnaJ (Hsp40) co-chaperone in the regulation of the DnaK (Hsp70) chaperone cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12436–12444, 2006.
- CHACINSKA, A. et al. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 628–644, 2009.
- CHEETHAM, M. E.; CAPLAN, A. J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. **Cell stress & chaperones**, v. 3, n. 1, p. 28–36, 1998.
- DMITRIJ FRISHMAN; PATRICK ARGOS. **Stride Web interface - Knowledge-Based Protein Secondary Structure Assignment**. Disponível em: <<http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py>>. Acesso em: 20 abr. 2019.
- DORES-SILVA, P. R. DAS. **Estudos da Chaperona Molecular HSP70 Mitochondrial Humana - Mortalina: Elucidando Aspectos Estruturais e Funcionais**. [s.l: s.n.].
- EDELHOCH, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948–1954, 1967.
- GÄSSLER, C. S. et al. Bag-1M Accelerates Nucleotide Release for Human Hsc70 and Hsp70 and Can Act Concentration-dependent as Positive and Negative Cofactor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 32538–32544, 2001.
- GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- GERALD BOHM. **Gerald Boehms Website - CDNN Software**. Disponível em: <<http://gerald-boehm.com/>>.

boehm.de/download/cdnn>. Acesso em: 20 abr. 2019.

GOFFIN, L.; GEORGOPOULOS, C. Genetic and biochemical characterization of mutations affecting the carboxy-terminal domain of the Escherichia coli molecular chaperone DnaJ. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 329–40, 1998.

GREENE, M. K.; MASKOS, K.; LANDRY, S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6108–13, 1998.

HAGEMAN, J.; KAMPINGA, H. H. Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2009.

HENNESSY, F. et al. Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. **Cell stress & chaperones**, v. 5, n. 4, p. 347–58, 2000.

KAMPINGA, H. H. et al. Function, evolution, and structure of J-domain proteins. 2018.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 579–592, ago. 2010.

KITYK, R.; KOPP, J.; MAYER, M. P. Molecular Mechanism of J-Domain-Trigged ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 227- 237.e4, 2018.

KOTA, P. et al. Identification of a consensus motif in substrates bound by a Type I Hsp40. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 27, p. 11073–11078, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3 Ed. ed. Baltimore, Maryland, USA: [s.n.]. v. 10

LAUFEN, T. et al. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5452–5457, 1999.

LU, Z.; CYR, D. M. The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5970–5978, 1998.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.

NCBI. **GenBank**.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição ed. [s.l: s.n.].

NOLLEN, E. A et al. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 3, p. 1083–1088, 2000.

OHTSUKA, K.; HATA, M. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. **Cell stress & chaperones**, v. 5, n. 2, p. 98–112, 2000.

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

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, n. 11, p. 2411–2423, 1995.

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

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, 1962.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual 2 Ed.** [s.l: s.n.].

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, p. 1–14, 2013.

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

SONG, L. et al. Genome-wide identification of Hsp40 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

SZABO, A. et al. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10345–10349, 1994.

TÝČ, J.; KLINGBEIL, M. M.; LUKESŠ, J. Mitochondrial Heat Shock Protein Machinery Hsp70 / Hsp40 Is Indispensable for Proper Mitochondrial DNA Maintenance and. **mBio**, v. 10, n. 6, p. e02425-14, 2015.

VELOSO-SILVA, L. L. W. et al. Structural studies of Old Yellow Enzyme of *Leishmania braziliensis* in solution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 661, n. November 2018, p. 87–96, 2019.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4ª Edição ed. [s.l: s.n.].

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamental of biochemistry**. 4ª Edição ed. [s.l: s.n.].

WADHWA, R. et al. Mortalin-MPD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, n. 4, p. 735–742, 2003.

WALTER STANFFORD. **Sednterp - Reversible Associations in Structural and Molecular Biology**. Disponível em: <<http://www.rasmb.org/>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

WARREN, J. R.; GORDON, J. A. On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 297–300, jan. 1966.

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **Genecards The Human Gene Database**.