Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Estudo estrutural e funcional da co-
chaperona SGT de *Leishmania braziliensis***

Candidata: Amanda Lais de Souza Coto

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2016

Amanda Lais de Souza Coto

Estudo estrutural e funcional da co-chaperona SGT de
Leishmania braziliensis

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

Área de concentração: Química orgânica e biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Exemplar revisado

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

São Carlos

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter vivido essa experiência e todo o grande amadurecimento pessoal e profissional que ela me proporcionou. Obrigada pelos desafios, pelo aprendizado e pelas pessoas que conheci.

Ao Prof. Dr. Júlio Borges por me receber em seu grupo, pelos ensinamentos, pela paciência e por confiar no meu trabalho. Sua orientação e dedicação à pesquisa me fizeram enxergar a ciência de um jeito muito mais interessante. Foi um grande prazer ser sua aluna e orientanda.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio à pesquisa (processo nº 2014/08786-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)). Ao CNPq e à CAPES também pelo apoio à pesquisa.

Ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” e à Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI/IQSC) pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) também por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a execução desse trabalho. Agradeço especialmente à Dra. Juliana Fattori pelo auxílio e disponibilidade.

Ao Dr. Paulo Roberto, pela preciosa amizade. Obrigada pelas boas conversas, risadas, conselhos, apoio e, principalmente, pelo dom de descomplicar as coisas dentro da minha cabeça. Viajar com você é sempre uma aventura. Vou sentir muita falta disso.

Ao Dr. Thiago Seraphim pela amizade. Sua dedicação e olhar crítico são inspiradores. Obrigada pelas discussões científicas e sobre a vida, pela companhia até altas horas no laboratório e por todas as valiosas contribuições a esse trabalho.

À Karine Minari, “vizinha” e companheira de bancada, pela empatia e amizade desde o primeiro dia. Obrigada por todas as vezes que você me ajudou, me ouviu, me motivou e me aturou nos dias difíceis (dias que, por sinal, sempre foram devidamente superados com comida boa e boas conversas).

À Dra. Fernanda Batista por ter me recebido tão bem no laboratório quando cheguei e por todos os ensinamentos. Obrigada pela sua contribuição a este trabalho e a minha formação.

Às técnicas Juliana Tamara e Vanessa Kiraly, à Marcella Paganelli e à Carol Colleti pela preciosa amizade. Obrigada pela ótima convivência e por todo o apoio. Vocês são muito importantes.

Aos demais membros do LBBP pelas discussões tão produtivas e essenciais para esse trabalho.

Aos amigos do Ibilce: Adilson, Gabriel, Lucas, Adriano, Jéssica, Naiara, Carlos. De modo especial, agradeço minha irmã Jessika pela amizade, torcida, incentivo e valiosos conselhos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Bonilla, orientador de iniciação científica, pelos ensinamentos e pelo papel fundamental na minha formação.

À minha família mineira, Juca e Josi, e aos afilhados, Mari e Wallace, meu muito obrigada pela torcida.

Aos meus pais, Luiz e Luzia, e meu irmão Henri pelo amor incondicional, pela força, pela confiança que sempre depositaram em mim e pelo exemplo. Obrigada por todos os esforços desde o primeiro dia nessa jornada e por sempre me incentivarem a ser alguém melhor.

Por fim, agradeço ao meu noivo Marcos. Obrigada por ter insistido tanto para que eu viesse à São Carlos. Sem dúvida essa foi a melhor escolha. Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, pela sua paciência e principalmente pelo seu apoio ao longo desses anos. Amo você.

"Yes, I get by with a little help from my friends

With a little help from my friends"

The Beatles

RESUMO

As chaperonas moleculares são ativas em muitos processos celulares envolvendo o enovelamento e a homeostase de proteínas. Essas características fazem das chaperonas alvos potenciais para o tratamento de diversas doenças. As Hsp70 e as Hsp90, em especial, são proteínas ubíquas altamente conservadas biologicamente que atuam no enovelamento de proteínas nascentes, prevenção da agregação proteica, recuperação de proteínas de agregados, sinalização e crescimento celular, dentre outros. Contudo, para que essas proteínas cumpram eficientemente suas funções, elas devem ser moduladas por co-chaperonas moleculares. A SGT é uma co-chaperona que pode ser dividida em três regiões: domínio N-terminal, domínio TPR e domínio C-terminal, sendo que a região do domínio TPR é a responsável pela interação com o motivo EEVD no C-terminal das Hsp90 e Hsp70 citoplasmáticas. A SGT é encontrada em vários organismos, dentre eles os protozoários do gênero *Leishmania* spp.. Estes organismos são responsáveis pela leishmaniose, uma doença negligenciada que afeta milhares de pessoas todos os anos, principalmente em países subdesenvolvidos. Evidências indicam que a SGT em protozoários é essencial para o crescimento e viabilidade da forma promastigota. Diante disso, nesse trabalho foi feito o estudo estrutural e funcional da co-chaperona SGT de *Leishmania braziliensis* (LbSGT). A LbSGT recombinante foi produzida e purificada. A caracterização estrutural indica que a LbSGT é uma proteína rica em estrutura secundária do tipo hélice α que se comporta como um dímero alongado em solução. Dados de estabilidade térmica e química indicam que a LbSGT é uma proteína formada por domínios com diferentes estabilidades. A LbSGT foi identificada *in vivo* e o *western blotting* indicou sua presença cognata nas formas promastigotas do protozoário. Os ensaios de interação indicam que as interações entre a LbSGT e a Hsp90 de *L. braziliensis* (LbHsp90) e a LbSGT e Hsp70-1A humana (usada como proteína modelo) são diferentes da interação da LbSGT com o peptídeo MEEVD. Sendo assim, esses dados sugerem que a interação da LbSGT com a Hsp70-1A e LbHsp90 envolvem mais regiões das proteínas do que somente o motivo de interação da Hsp70-1A e da LbHsp90 com o domínio TPR da LbSGT. Em conjunto, as propriedades estruturais e funcionais da LbSGT observadas estão de acordo com a possível função da SGT como proteína adaptadora entre os sistemas Hsp70 e Hsp90 no *foldossoma*.

ABSTRACT

The molecular chaperones are active in many cellular processes involving protein folding and homeostasis. These characteristics make the chaperones potential targets to the treatment of many diseases. Hsp70 and Hsp90, in special, are highly conserved ubiquitous proteins that act in the folding of nascent proteins, protein aggregation prevention, aggregate recovering, signaling and cellular growth, among others. However, for these proteins to effectively fulfill their function, they must be modulated by molecular co-chaperones. SGT is a co-chaperone that can be divided into three domains: a N-terminal domain, a TPR domain and a C-terminal domain, being the TPR domain responsible for the interaction with the EEVD motif at the C-terminus of cytoplasmic Hsp90 and Hsp70. SGT is found in various organisms; among them are the protozoans of *Leishmania* spp.. These organisms are responsible for leishmaniasis, a neglected disease that affects thousands of people every year, mainly in underdeveloped countries. Evidences indicate that SGT in protozoans is essential to the growth and viability of promastigote form. Therefore, the structural and functional study of the *Leishmania braziliensis* SGT (LbSGT) is presented. Recombinant LbSGT was produced and purified. The structural characterization points that LbSGT is rich in α -helix secondary structure and behaves as an elongated dimer in solution. Chemical and thermal stability data suggest that LbSGT is formed by domains of different stabilities. LbSGT was identified *in vivo* and the western blotting indicates its cognate presence in the protozoan promastigote forms. The interaction assays show that the interaction between LbSGT and Hsp90 of *L. braziliensis* (LbHsp90) or human Hsp70-1A (used as model protein) were different from the interaction between LbSGT with MEEVD peptide. Moreover, these data suggest that the interaction between LbSGT and Hsp70-1A and LbHsp90 involves additional protein regions besides the Hsp70-1A and LbHsp90 interaction motif. Altogether, the observed functional and structural properties of LbSGT accord to the SGT possible function as an adapter protein between the Hsp70 and Hsp90 systems in the foldosome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arranjo dos domínios DLN e DLP e conformações da Hsp70.....	3
Figura 2 – Estrutura tridimensional da Hsp90.....	4
Figura 3 – Esquema da interação entre os sistemas Hsp70 e Hsp90 no heterocomplexo <i>foldossoma</i>	6
Figura 4 – Estrutura tridimensional da SGT de <i>L. braziliensis</i>	9
Figura 5 – Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	11
Figura 6 – Análise sequencial da LbSGT.....	22
Figura 7 – Expressão e purificação da LbSGT.....	23
Figura 8 – Espectro de dicroísmo circular da LbSGT.....	24
Figura 9 – Cromatografia de exclusão molecular analítica da LbSGT.....	25
Figura 10 – Ensaio de velocidade de sedimentação da LbSGT.....	26
Figura 11 – Investigação da estabilidade química e térmica da LbSGT.....	27
Figura 12 – Investigação da desnaturação química da LbSGT por AUC.....	28
Figura 13 – Experimentos de SAXS da LbSGT.....	29
Figura 14 – Modelo <i>ab initio</i> para a LbSGT.....	30
Figura 15 – Identificação <i>in vivo</i> da LbSGT.....	32
Figura 16 – Experimentos de anisotropia de fluorescência.....	33
Figura 17 – Experimentos de MST.....	33
Figura 18 – Interação LbSGT + LbHsp90 na presença de nucleotídeos e MgCl ₂	35
Figura 19 – Interação LbSGT + Hsp70-1A na presença de nucleotídeos e MgCl ₂ ...	35
Figura 20 – Comparação entre domínios TPR.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Co-chaperonas dos sistemas Hsp70 e Hsp90.....	9
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas teóricas.....	15
Tabela 3 – Identidade e similaridade sequencial.....	22
Tabela 4 - Composição de estrutura secundária da LbSGT.....	25
Tabela 5 – Propriedades estruturais e hidrodinâmicas da LbSGT.....	30
Tabela 6 – Estudo funcional da LbSGT.....	37
Tabela 7 – Identidade e similaridade sequencial entre o TPR _{LbSGT} e os domínios TPR de HOPs ortólogas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

AMP-PNP: Adenilil imidodifosfato, do inglês *adenylyl imidodiphosphate*, análogo não clivável da adenosina trifosfato.

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

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

AUC: Ultracentrifugação analítica, do inglês *analytical ultracentrifugation*.

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

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

CHIP: Nome genérico da proteína interatora do C-terminal da Hsp70, do inglês *C-terminal Hsp70-interacting protein*.

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

Da: Dalton, unidade de massa atômica.

D_{max}: Dimensão máxima, em Å.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *fluorescein isothiocyanate*.

GrpE: Nome genérico da proteína que auxilia a troca de nucleotídeos das Hsp70, do inglês *groP-like gene E*.

f/f₀: Razão entre o coeficiente friccional experimental e o coeficiente friccional de uma esfera rígida de igual massa molecular à proteína de interesse (fator de Perrin).

HIP: Nome genérico da proteína interatora da Hsp70, do inglês *Hsp-interacting protein*.

HOP: Nome genérico da proteína organizadora das Hsp70-Hsp90, do inglês *Hsp70-Hsp90 organizing protein*.

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

Hsp40: nome genérico da proteína de choque térmico de 40 kDa, do inglês *heat shock protein of 40 kDa*.

Hsp70: Nome genérico da proteína de choque térmico de 70 kDa, do inglês *heat shock protein of 70 kDa*.

Hsp70-1A: Nome genérico da Hsp70 homóloga citoplasmática.

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

Hsp100: Nome genérico da proteína de choque térmico de 100 kDa, do inglês *heat shock protein of 100 kDa*.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo.

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

K_D: Constante de dissociação.

kDa: Quilodalton, equivalente a mil daltons.

MM: Massa molecular.

mM: Milimolar (10^{-3} molar).

MST: Termoforese em microescala, do inglês *microscale thermophoresis*.

NEFs: Fatores de troca de nucleotídeos, do inglês *nucleotide exchange factors*.

nM: Nanomolar (10^{-9} molar).

p23: Nome genérico da proteína de 23 kDa de que interage com a Hsp90.

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

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

pH: Potencial hidrogeniônico.

R₀: Raio de uma esfera rígida de mesma massa molecular que a proteína de interesse.

R_g: Raio de giro, em Å.

rpm: Rotações por minuto.

R_S: Raio de Stokes, em Å.

s: Coeficiente de sedimentação, em S.

S: Svedberg, 10^{-13} segundos.

$s^0_{20,w}$: Coeficiente de sedimentação em condição padrão (20 °C e em água) a 0 mg mL⁻¹ de proteína.

$s_{20,w}$: Coeficiente de sedimentação em condição padrão (20 °C e em água).

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

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

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

TOM70: Nome genérico da proteína translocadora da membrana mitocondrial externa de 70 kDa, do inglês *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane of 70 kDa*.

UA: Unidades arbitrárias

V_{bar}: Volume parcial específico, em cm³ g⁻¹.

Å: Unidade de medida – Ångström.

°C: Unidade de temperatura – graus Celsius.

ε: Coeficiente de extinção molar, em M⁻¹ cm⁻¹.

λ: Comprimento de onda, em nanômetros.

μM: Micromolar (10^{-6} molar).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As chaperonas moleculares	1
1.2. As famílias das Hsp70 e Hsp90	2
1.3. <i>Foldossoma</i> : o grande complexo das chaperonas moleculares.....	4
1.4. As co-chaperonas com domínio TPR.....	6
1.5. SGT.....	7
1.6. Leishmaniose: uma doença tropical negligenciada.....	10
1.7. Objetivos	12
2. DESENVOLVIMENTO	13
2.1. Materiais e métodos.....	13
2.1.1. Clonagem e alinhamento global.....	13
2.1.2. Expressão e purificação.....	14
2.1.3. Quantificação das proteínas	15
2.1.4. Caracterização biofísica da LbSGT.....	15
2.1.4.1. Espectropolarimetria de dicroísmo circular	15
2.1.4.2. Cromatografia de exclusão molecular analítica.....	16
2.1.4.3. Ultracentrifugação analítica.....	17
2.1.4.4. Espalhamento de raios-x a baixo ângulo	18
2.1.5. Western blotting	19
2.1.6. Estudo da interação da LbSGT com LbHsp90 e Hsp70-1A	19
2.1.6.1. Termoforese em microescala.....	19
2.1.6.2. Anisotropia de fluorescência	21
2.2. Resultados e discussão	21
2.2.1. Análise sequencial, expressão e purificação da LbSGT	21

2.2.2. Caracterização da estrutura secundária da LbSGT	24
2.2.3. Estudos hidrodinâmicos: propriedades e estado oligomérico da LbSGT.....	25
2.2.4. Estudo da estabilidade da LbSGT.....	26
2.2.5. SAXS: dinâmica conformacional e construção do modelo ab initio.....	28
2.2.6. Identificação da LbSGT in vivo.....	31
2.2.7. Estudos funcionais: interação da LbSGT com LbHsp90, Hsp70-1A e peptídeo MEEVD	32
2.2.8. A LbSGT é estruturalmente uma HIP e funcionalmente uma HOP.....	37
3. CONCLUSÕES.....	41
4. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. As chaperonas moleculares

As proteínas são consideradas macromoléculas biológicas complexas, versáteis, abundantes e essenciais para todos os organismos vivos. As funções biológicas desempenhadas pelas proteínas são variadas e dependem diretamente da estrutura tridimensional característica (estrutura nativa) adotada por cada proteína após o enovelamento (Tirolí-Cepeda e Ramos, 2011; Bozaykut *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015). Vale destacar, no entanto, que a função biológica de proteínas intrinsecamente desenoveladas não requer necessariamente uma estrutura tridimensional (Fink, 2005). De fato, aproximadamente 75% das proteínas sinalizadoras possuem sequências com mais de 30 resíduos de aminoácidos com estruturas preditas para serem desordenadas e/ou flexíveis (Dunker *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2016). O enovelamento proteico ocorre em um ambiente rico em macromoléculas; quando em condições de estresse como altas temperaturas, privação de nutrientes, hipóxia, variações de concentração iônica e presença de metais pesados, este processo não ocorre corretamente, originando proteínas mal enoveladas que podem formar agregados proteicos (Stravopodis *et al.*, 2007; Bozaykut *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015). Diversas doenças parecem estar relacionadas à formação de agregados proteicos, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, fibrose cística, diabetes e alguns tipos de câncer (Chai *et al.*, 1999; Forget *et al.*, 2013; Ashraf *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Sendo assim, o controle de qualidade de proteínas (ou proteostase) desempenhado pela célula é essencial para regular os processos de síntese, enovelamento e degradação (Tirolí-Cepeda e Ramos, 2011; Saibil, 2013; Bozaykut *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015).

A proteostase é mediada por chaperonas moleculares, uma classe de proteínas que são ativas em muitos processos celulares envolvendo o enovelamento e a homeostase de proteínas (Saibil, 2013; Batista, F. A. H. *et al.*, 2015). As chaperonas são também conhecidas como proteínas de choque-térmico (Hsp, do inglês *heat shock proteins*) (Wang *et al.*, 2006) por terem sua expressão aumentada em resposta ao estresse, especialmente em condições de estresse térmico. Essas proteínas são divididas em seis grandes famílias, de

acordo com suas massas moleculares: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60/10, Hsp40 (ou *J proteins*) e smHsp (Borges e Ramos, 2005; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011; Bozaykut *et al.*, 2014; Brandvold e Morimoto, 2015; Smith *et al.*, 2015). Essas famílias não compartilham similaridade na sequência de aminoácidos e no mecanismo de ação, contudo, todas reconhecem e ligam superfícies hidrofóbicas de proteínas parcialmente ou totalmente desenoveladas.

1.2. As famílias das Hsp70 e Hsp90

As Hsp70 são proteínas ubíquas altamente conservadas biologicamente (Da Silva e Borges, 2011). Dentre os diversos processos celulares nos quais as Hsp70 estão envolvidas, pode-se citar o enovelamento de proteínas nascentes, a prevenção da agregação proteica, a recuperação de proteínas de agregados, o transporte de proteínas através de membranas, o encaminhamento de proteínas para a degradação e a estabilização de fatores de transcrição celular (Mayer *et al.*, 2001; Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Wegele, Müller, *et al.*, 2004). Estruturalmente as Hsp70 apresentam-se na forma de monômeros em solução, podendo ser divididas em dois domínios bem conservados (Figura 1). O domínio DLN (domínio de ligação de nucleotídeos adenosina) é responsável pela atividade ATPásica e o domínio DLP (domínio de ligação de proteínas/peptídeos) é responsável pela interação com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Zhu *et al.*, 1996; Rüdiger *et al.*, 1997; Rüdiger *et al.*, 2001).

Figura 1 – Arranjo dos domínios DLN e DLP e conformações da Hsp70. A) Na conformação fechada a Hsp70 está ligada ao ADP. Seu domínio DLN (em verde, PDB ID: 3HSC) conecta-se ao domínio DLP (em azul, PDB ID: 1DKZ) por meio de uma região flexível chamada *linker*. No DLP, uma longa estrutura em hélice- α (em vermelho) atua como uma tampa que se fecha sobre a proteína cliente. Nesse estado a afinidade por proteínas clientes é alta. **B)** Na conformação aberta a Hsp70 está ligada ao ATP. A tampa se abre e, junto com o DLP, apoia-se ao domínio DLN (PDB ID: 4B9Q). Nesse estado a afinidade por proteínas clientes é baixa.

Fonte: Adaptado de (Saibil, 2013).

As Hsp90 também são proteínas ubíquas e altamente conservadas biologicamente, entretanto, o mecanismo de ação dessa família ainda não é bem compreendido (Saibil, 2013). Essas chaperonas interagem com um grande número de proteínas clientes e participam de processos como a prevenção da agregação proteica, sinalização e crescimento celular, atuando na estabilização de receptores hormonais, proteínas quinase e outras proteínas (Pratt e Toft, 2003; Wegele, Müller, *et al.*, 2004; Borges e Ramos, 2005; Pearl e Prodromou, 2006; Tirolí-Cepeda e Ramos, 2011; Brandvold e Morimoto, 2015). As Hsp90 comportam-se como homodímeros em solução, sendo que cada protômero pode ser dividido em três domínios: domínio N-terminal, domínio intermediário e domínio C-terminal (Figura 2) (Krukenberg *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). O domínio N-terminal possui um sítio de ligação ao ATP, com baixa atividade ATPásica, responsável pela ligação com co-chaperonas e peptídeos (Wegele, Müller, *et al.*, 2004; Pearl e Prodromou, 2006; Krukenberg *et al.*, 2011). Além disso, este domínio dimeriza-se durante o ciclo funcional da Hsp90 e está conectado por um *linker* positivamente carregado ao domínio intermediário. Este último, por sua vez, participa diretamente da hidrólise de ATP e é o principal sítio de interação com as proteínas clientes (Meyer *et al.*, 2003; Hainzl *et al.*, 2009). O domínio C-terminal é

responsável pela dimerização permanente da Hsp90 e interação com proteínas clientes e co-chaperonas (Krukenberg *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Figura 2 – Estrutura tridimensional da Hsp90. **A)** Hsp90 no estado aberto, sem ligantes (PDB ID: 2IOQ) **B)** Estado parcialmente fechado, onde Hsp90 está ligada ao ADP (PDB ID: 2O1V). **C)** Estado fechado, onde Hsp90 está ligada ao ATP (PDB ID: 2CG9). O domínio N-terminal está representado em verde, o domínio intermediário em amarelo e o domínio C-terminal em azul.

Fonte: Adaptado de (Saibil, 2013).

As diferentes conformações da Hsp70 e da Hsp90 observadas nas Figuras 1 e 2 estão diretamente relacionadas à hidrólise do ATP. Os nucleotídeos possuem papel fundamental no direcionamento do ciclo funcional e na interação dessas proteínas com co-chaperonas e proteínas clientes (Southworth e Agard, 2008; Mickler *et al.*, 2009; Ratzke *et al.*, 2012).

1.3. **Foldossoma: o grande complexo das chaperonas moleculares**

A Hsp70 e a Hsp90 não atuam sozinhas para manter a proteostase. Além de interagirem com uma grande variedade de substratos, essas chaperonas também interagem entre si, dando origem a um heterocomplexo chamado *foldossoma* (Figura 3) (Wegele, Muller, *et al.*, 2004; Borges e Ramos, 2005; Cano *et al.*, 2013; Saibil, 2013; Seraphim *et al.*, 2014; Batista, F. A. H. *et al.*, 2015). Um número considerável de proteínas assessoras estão envolvidas na regulação do

foldossoma. Essas proteínas são genericamente chamadas de co-chaperonas, proteínas que mediam a especificidade das Hsp70/Hsp90 por uma proteína cliente, facilitam o enovelamento e a desagregação proteica e regulam os ciclos funcionais individuais das chaperonas. São exemplos de co-chaperonas a HIP, a Aha1 e a p23. Adicionalmente, existem co-chaperonas adaptadoras que conectam e mediam indiretamente a interação entre Hsp70 e Hsp90, desempenhando papel fundamental na formação do heterocomplexo (Caplan, 2003; Pratt e Toft, 2003; Ommen *et al.*, 2010). São exemplos de co-chaperonas com essas características as proteínas HOP e SGT.

No início do ciclo funcional da Hsp70 (1), uma co-chaperona *J protein* se liga às superfícies hidrofóbicas de uma proteína cliente (desenovelada, enovelada incorretamente ou parcialmente enovelada) e a entrega para a Hsp70 no estado ligado ao ATP. A ligação do complexo *J protein*-proteína cliente à Hsp70 estimula a hidrólise de ATP, levando essa proteína ao estado ligado ao ADP (Kampinga e Craig, 2010; Da Silva e Borges, 2011). Neste estágio, as co-chaperonas HIP (*Hsp70-interacting protein*) ou SGT (*Small glutamine-rich IPR protein*) podem se associar e estabilizar o complexo Hsp70-ADP-proteína cliente (Hohfeld *et al.*, 1995; Angeletti *et al.*, 2002; Borges e Ramos, 2005; Li, Z. *et al.*, 2013). Em seguida, os fatores de troca de nucleotídeo (GrpE, Hsp110, HspBP1 e BAG) interagem com a Hsp70 e estimulam a troca de ADP por ATP, reduzindo a afinidade da Hsp70 pela proteína cliente e promovendo sua liberação (Borges e Ramos, 2005; Da Silva e Borges, 2011). O complexo Hsp70-ATP-*J protein*-proteína cliente, chamado de complexo precoce, pode também ser direcionado para o sistema Hsp90 (2) via HOP (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) ou SGT. O complexo Hsp90-ATP-HOP/SGT associa-se ao complexo precoce dando origem a um complexo intermediário onde ocorre a transferência da proteína cliente da Hsp70 para a Hsp90 (Wegele, Muller, *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2013). A ligação das co-chaperonas Aha1 e p23 à Hsp90 desmontam o complexo intermediário e originam o complexo tardio. Durante o desmonte, a Hsp70 é liberada juntamente com a *J protein* e a HOP/SGT (Cano *et al.*, 2013; Li, J. *et al.*, 2013). A inibição da Hsp90, por sua vez, leva à desmontagem do complexo intermediário (3). Nesse caso, a CHIP participa do processo de ubiquitinação da proteína cliente para

posterior depuração pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Arndt *et al.*, 2007; Biamonte *et al.*, 2010).

Figura 3 – Esquema da interação entre os sistemas Hsp70 e Hsp90 no heterocomplexo *foldossoma*. Na figura os esquemas dos ciclos funcionais da Hsp70 e Hsp90 são ilustrados. **(1)** Ciclo funcional da Hsp70 e atuação da *J protein*, HIP/SGT e NEFs. A formação do complexo precoce e ligação da HOP/SGT e Hsp90 resultam na transferência da proteína cliente do sistema Hsp70 para o sistema Hsp90, formando o complexo intermediário. **(2)** Ciclo funcional da Hsp90 e papel das co-chaperonas Aha1 e p23. Estas co-chaperonas se ligam ao complexo intermediário, promovendo sua desmontagem e formando complexos tardios no ciclo da Hsp90. Com o prosseguimento do ciclo, a proteína cliente enovela-se em sua conformação ativa e realiza seu papel no crescimento celular. **(3)** Inibidores da Hsp90 podem interferir na montagem de complexos intermediários, fazendo com que a proteína cliente seja ubiquitinada e encaminhada para o sistema ubiquitina-proteassoma, via co-chaperona CHIP. É importante ressaltar que, apesar da integração dos ciclos funcionais da Hsp70 e Hsp90, estes sistemas também atuam independentemente para promover o enovelamento proteico.

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

1.4. As co-chaperonas com domínio TPR

Como visto anteriormente, as co-chaperonas são fundamentais para garantir que as Hsp70 e Hsp90 cumpram eficientemente suas funções (Borges e Ramos, 2005; Tirolí-Cepeda e Ramos, 2011; Seraphim *et al.*, 2014). Dentre as diversas co-chaperonas descritas na literatura, vale destacar uma importante classe de proteínas que regulam a atividade das Hsp70 e Hsp90: as co-

chaperonas com domínio TPR (Angeletti *et al.*, 2002). O TPR (do inglês *tetratricopeptide repeat*), ou tetratricopeptídeo, é um motivo de repetição composto por 34 resíduos de aminoácidos que se enovelam na forma de duas hélices- α pontuadas por uma volta (Hirano *et al.*, 1990). O arranjo paralelo de motivos TPR adjacentes dá origem a uma estrutura super-helicoidal que facilita a interação proteína-proteína. Um domínio TPR funcional deve ser composto por, no mínimo, três motivos TPR (Angeletti *et al.*, 2002; Liou e Wang, 2005).

As co-chaperonas podem ter um ou mais domínios TPR. A HOP, por exemplo, possui três domínios TPR e é capaz de interagir simultaneamente com a Hsp70 e a Hsp90. O domínio TPR1 da HOP interage somente com a Hsp70 e o domínio TPR2A interage somente com a Hsp90. Já o domínio TPR2B é menos seletivo do que os demais e interage tanto com a Hsp70 quanto com a Hsp90 (Scheufler *et al.*, 2000; Liou e Wang, 2005; Batista *et al.*, 2016). Algumas co-chaperonas interagem indiscriminadamente com Hsp70 e Hsp90 por meio de um único domínio TPR, como é o caso da CHIP (Connell *et al.*, 2001) e da TOM70 (Young *et al.*, 2003). Por outro lado, co-chaperonas com um único domínio TPR podem também interagir com apenas uma chaperona (Hsp70 ou Hsp90), como é o caso da HIP, proteína que interage apenas com a Hsp70 (Dores-Silva *et al.*, 2012).

1.5. SGT

A co-chaperona SGT foi primeiramente descrita como uma co-chaperona da Hsc70 e possível reguladora negativa da atividade do complexo Hsp70/Hsp40 (Liu *et al.*, 1999; Angeletti *et al.*, 2002). Posteriormente, a participação da SGT em outros processos celulares, tais como a endocitose, interações com proteínas β -amilóides, receptores do hormônio do crescimento e controle da mitose e apoptose foi descrita na literatura (Fonte *et al.*, 2002; Schantl *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Winnefeld *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2007; Ommen *et al.*, 2010). Sabe-se também que essa co-chaperona é responsável por mediar a associação de diversas chaperonas moleculares. Em lisados de *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que a SGT coprecipita com Hsp90, Hsp70, Hsp40 e Hsp100. Nesse mesmo organismo, foi observado também que a Mdy2, uma proteína com um domínio ubiquitina-*like*, interage com o domínio N-terminal da

SGT (Liou *et al.*, 2007). Embora esteja presente em uma grande variedade de organismos, a SGT não foi encontrada em protozoários do Filo Apicomplexa, como *Plasmodium falciparum* (Ommen *et al.*, 2010).

A SGT pode ser dividida em três domínios: domínio N-terminal, domínio TPR e domínio C-terminal (Figura 4). O domínio N-terminal possui um motivo *coiled-coil* responsável pela formação de homodímeros (Tobaben *et al.*, 2003; Liou e Wang, 2005; Worrall *et al.*, 2008; Ommen *et al.*, 2010). Além disso, evidências sugerem que essa região interage com proteínas clientes (Liou *et al.*, 2007). O domínio TPR, localizado no centro da proteína, é responsável pela interação da SGT com as sequências MEEVD da Hsp90 e PTIEEVD da Hsp70 (Tobaben *et al.*, 2003; Liou e Wang, 2005; Liou *et al.*, 2007; Worrall *et al.*, 2008). Na literatura, há evidências que a interação entre a SGT e a Hsp100 também ocorre via domínio TPR (Liou *et al.*, 2007). Já o domínio C-terminal contém uma região rica em glutamina (Tobaben *et al.*, 2003; Liou e Wang, 2005). Nesse domínio os resíduos de glutamina, asparagina e prolina são responsáveis pela interação da SGT com peptídeos apolares (Ommen *et al.*, 2010). No entanto, em Cinetoplastídeos (como os protozoários do gênero *Leishmania* spp.) o domínio C-terminal da SGT não apresenta uma região rica em glutamina. Nesses casos essa região é substituída por outra rica em resíduos de aminoácidos carregados, principalmente glutamato (Ommen *et al.*, 2010).

Figura 4 – Estrutura tridimensional da SGT de *L. braziliensis*. Abaixo estão representados o domínio N-terminal (PDB ID: 4CPG), região responsável pela dimerização da proteína, domínio TPR (PDB ID: 2VYI), responsável pela interação com as Hsp70 e Hsp90 e o domínio C-terminal (construído com o *software* SWISS-MODEL usando como *template* a yTom70 - PDB ID: 2GW1), região onde acontece a interação com resíduos de aminoácidos apolares. Os domínios N-terminais de cada protômero estão representados em vermelho e amarelo.

Fonte: Autoria própria.

A função da SGT nos processos celulares descritos anteriormente e no *foldossoma* não é muito bem compreendida (Philp *et al.*, 2013; Seraphim *et al.*, 2014). Como visto na Figura 3, em (1) o papel desempenhado pela SGT assemelha-se ao da HIP, uma proteína dimérica que interage com a Hsp70 com estequiometria de 2:1 (Hohfeld *et al.*, 1995). No entanto, em (2) o papel desempenhado pela SGT assemelha-se ao da HOP, uma proteína monomérica que interage com a Hsp70 e Hsp90 com estequiometria de 1:1 (Scheufler *et al.*, 2000). A Tabela 1 resume as características e as interações das co-chaperonas acima citadas. Com base nessas informações pode-se afirmar que do ponto de vista estrutural a SGT é semelhante à HIP, porém, quando são consideradas as interações que a SGT realiza, pode-se dizer que essa proteína é funcionalmente semelhante à HOP (Seraphim *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Co-chaperonas dos sistemas Hsp70 e Hsp90. Comparação estrutural e funcional das proteínas HIP, HOP e SGT.

<i>Co-chaperona</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Interações observadas</i>
HIP	Dímero	Hsp70
HOP	Monômero	Hsp70 e Hsp90
SGT	Dímero	Hsp70 e Hsp90

Fonte: Autoria própria.

1.6. Leishmaniose: uma doença tropical negligenciada

As doenças tropicais negligenciadas têm maior incidência nas Américas, África Subsaariana, Ásia, Oceania e Oriente Médio e são comumente associadas à pobreza. Elas são ditas negligenciadas devido ao baixo financiamento em pesquisa que recebem visando o seu controle. Embora apresentem baixa mortalidade, a incapacidade e a desfiguração que as doenças negligenciadas causam ao indivíduo ocasionam profundos impactos de cunho social, educacional e político (Seraphim *et al.*, 2014; Canuto *et al.*, 2015; Rafati *et al.*, 2015).

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp.. Em humanos, a leishmaniose é causada por 17 espécies diferentes do protozoário e pode se manifestar de três formas diferentes: leishmaniose cutânea, mucocutânea ou visceral, sendo essa última a forma letal da doença (Croft e Olliaro, 2011). A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países (Lindoso e Lindoso, 2009). A forma visceral manifesta-se majoritariamente na Etiópia, Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão; a forma mucocutânea manifesta-se majoritariamente na Bolívia, Brasil e Peru, enquanto a forma cutânea manifesta-se majoritariamente no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> acessado em 19/05/2016). Cerca de 900 mil a 1,6 milhões de novos casos de leishmaniose são relatados no mundo ao ano. Dentro deste montante, 200-400 mil casos correspondem à forma visceral da doença, levando a óbito 20-50 mil pessoas todos os anos (Alvar *et al.*, 2012).

A leishmaniose é transmitida a diversos hospedeiros pela picada de um flebotomídeo (Figura 5) (Shonhai *et al.*, 2011). A prevenção e o controle da leishmaniose são complexos, uma vez que nem sempre é necessário o hospedeiro humano para completar o ciclo de vida do parasito (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/> acessado em 26/07/2016). Os tratamentos existentes para a leishmaniose dependem de fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasito. Embora a leishmaniose seja uma doença tratável, os fármacos atualmente administrados são eficazes apenas contra certas espécies de *Leishmania* e em certas regiões geográficas (<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> acessado em 26/07/2016). Atualmente, os principais fármacos utilizados contra a leishmaniose

são compostos pelo Antimonial Pentavalente (*Pentostan* / GSK, *glucantime* / Sanofi), pela Anfotericina B (*AmBisome* / United) e pela Miltefosina (*Impavido* / Paladin Therapeutics), sendo esse último o primeiro agente oral eficaz contra a leishmaniose visceral, aprovado para uso pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) em março de 2014 (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/> acessado em 26/07/2016). Entretanto, um número crescente de casos relacionados à resistência ao antimonial, bem como a alta toxicidade e o alto custo de alguns fármacos empregados e a necessidade de hospitalização fazem com que o indivíduo abandone a terapia. Sendo assim, a busca por novos fármacos e tratamentos mais efetivos se faz necessária (Seraphim *et al.*, 2014; Canuto *et al.*, 2015).

Figura 5 – Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*. (1) Promastigotas metacíclicos infectam o hospedeiro mamífero através da picada da fêmea do mosquito-palha. (2) Estes promastigotas são fagocitados por células do sistema imune, como o macrófago. (3) Dentro dos fagolisossomos, a alteração de pH e temperatura induzem a diferenciação dos parasitos para a forma amastigota. Nesta etapa, as chaperonas moleculares Hsp70 e Hsp90 executam papel essencial na adaptação e diferenciação dos parasitos. Os amastigotas se reproduzem e (4) são transmitidos para o inseto vetor quando este pica o hospedeiro mamífero infectado. (5) No inseto, os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicos, seguido pela forma promastigota metacíclica, e a transmissão para um hospedeiro mamífero inicia um novo ciclo de vida.

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

O complexo ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* envolve a diferenciação do parasito da forma promastigota (no flebotomo mosquito-palha) para a forma amastigota (no hospedeiro vertebrado). A infecção não é estressante somente para o hospedeiro; durante a diferenciação os parasitos

experimentam condições adversas como grande variação de temperatura e pH, indisponibilidade de nutrientes, estresse oxidativo e degradação enzimática (Beattie e Kaye, 2011; Shonhai *et al.*, 2011). Os efeitos nocivos dessas condições são minimizados pela superexpressão de chaperonas moleculares. Além de atuarem na homeostase proteica, essas proteínas possibilitam a adaptação e diferenciação celular, desempenhando importantes papéis na sobrevivência, virulência e proliferação parasitárias (Pallavi *et al.*, 2010; Shonhai *et al.*, 2011). A inibição das Hsp90 em *Leishmania donovani*, por exemplo, causa interferências no crescimento celular e na diferenciação parasitária (Wiesgigl e Clos, 2001a; b; Pallavi *et al.*, 2010). Ainda em *L. donovani*, a SGT é essencial para o crescimento e viabilidade da forma promastigota do parasito, interagindo dentro da célula com outras co-chaperonas (HIP e HOP) e formando um grande complexo com as Hsp70 e Hsp90 (Ommen *et al.*, 2010).

Baseado no levantamento bibliográfico apresentado acima, pode-se inferir que as chaperonas são potenciais alvos terapêuticos no tratamento da leishmaniose. Entretanto, um ponto importante a ser considerado nesta abordagem é a alta similaridade entre as Hsp70/Hsp90 do parasito e do homem, uma vez que a inibição das chaperonas do parasito deve ser seletiva. Sendo assim, o estudo das co-chaperonas ganha destaque, visto que essas proteínas apresentam baixa similaridade entre si (Seraphim *et al.*, 2013; Batista, F. A. H. *et al.*, 2015). Motivados por tal característica, este trabalho objetivou o estudo da co-chaperona SGT de *Leishmania braziliensis* (LbSGT) a fim de compreender sua relação estrutura-função, sua atuação nos sistemas das Hsp70 e Hsp90 e seu potencial como alvo terapêutico no tratamento da leishmaniose.

1.7. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar estrutural e funcionalmente a co-chaperona LbSGT utilizando técnicas bioquímicas e biofísicas a fim de elucidar sua função junto à Hsp90 e à Hsp70 e seu potencial terapêutico no tratamento da leishmaniose. Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Analisar a sequência de aminoácidos e produzir a LbSGT;
- Purificar a LbSGT até a homogeneidade;

- Caracterizar a estrutura secundária e a estabilidade química e térmica da LbSGT;
- Caracterizar as propriedades hidrodinâmicas e o estado oligomérico da LbSGT;
- Estudar a estrutura da LbSGT por espalhamento de raios-X a baixos ângulos;
- Construir um modelo *ab initio* para a LbSGT de forma a determinar a sua estrutura em baixa resolução;
- Identificar a LbSGT *in vivo*;
- Estudar a interação da LbSGT com Hsp90 e Hsp70.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Materiais e métodos

2.1.1. Clonagem e alinhamento global

A busca pela SGT de *L. braziliensis* (LbSGT) (NCBI ID: XM_001566896.1; GenBank accession number: LbrM.30.2700) na base de dados do genoma de *L. braziliensis* depositado no TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010) foi feita utilizando a sequência da SGT humana (hSGT) (Protein ID: NM_003021.3; GenBank accession number: 6449) como molde. A partir da sequência de DNA da LbSGT, *primers* específicos (5'-AAGCATATGATGGAGGAGAAAGATCAGCC-3' (*forward*) e 5'-CTTAAGCTTTTACTAAGCACTACTGTTCG-3' (*reverse*)) foram desenhados com a inclusão de sítios de restrição para as enzimas *Nde* I e *Hind* III. Utilizando esses *primers*, o DNA codante da proteína LbSGT foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico de *L. braziliensis* M2904 (MHOM/BR/75/M2904). Essa estratégia possibilitou a construção do vetor pET28a::LbSGT que foi utilizado na expressão da proteína recombinante em células competentes BL21(DE3) de *E. coli*. A sequência do DNA clonado foi confirmada por sequenciamento.

O alinhamento global da sequência da LbSGT com as proteínas hSGT#1 (NCBI ID: AF368279_1), hSGT#2 (NCBI ID: AF368281_1), ySGT (NCBI ID: EDN63877) e os domínios TPR das HOPs de *L. braziliensis* (NCBI ID: XP_001562145), levedura (NCBI ID: CAA99217) e humano (NCBI ID: P31948) foi feito pelo software Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os

valores de identidade e similaridade foram obtidos pelo *software* Lalign (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>) (Sievers *et al.*, 2011).

2.1.2. Expressão e purificação

Células *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor pET28a::LbSGT foram cultivadas a 37 °C em meio LB com canamicina (30 µg.mL⁻¹) até a cultura bacteriana atingir OD_{600nm} de aproximadamente 0,6. A temperatura foi então reduzida para 30 °C e a expressão da LbSGT foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG. Após 6 horas de indução as células foram colhidas por centrifugação a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em tampão de lise (30 mL por litro de indução) contendo 20 mM fosfato de sódio (pH 7,4), 500 mM NaCl e 20 mM imidazol. Posteriormente, foram adicionadas 5 U de DNase e 30 µg.mL⁻¹ de lisozima e a incubação ocorreu durante 40 minutos em gelo. Após esse período, as células foram lisadas por sonicação e submetidas à centrifugação a 18000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas hidrofílicas PVDF com poros de 0,45 µm antes de ser submetido à purificação.

A purificação foi feita adotando dois passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel e cromatografia de exclusão molecular preparativa. Para o primeiro passo cromatográfico, o lisado celular filtrado foi aplicado em uma coluna *HiTrap* devidamente carregada com íons Ni⁺² e previamente equilibrada com o tampão de lise descrito anteriormente. A proteína recombinante foi eluída em tampão 20 mM fosfato de sódio (pH 7,4) com 500 mM NaCl e 500 mM imidazol e posteriormente incubada com trombina durante 15 horas a 4 °C (foi adicionada 1 U de trombina para cada mg.mL⁻¹ de proteína eluída). Por fim, a cromatografia de exclusão molecular preparativa foi feita em coluna Superdex 200 16/60 acoplada ao *ÄKTA Prime plus device* e previamente equilibrada com tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA e 1 mM β-mercaptoetanol. As amostras coletadas em cada passo de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética foi feita em voltagem constante e o gel corado com *comassie brilliant blue*. A LbHsp90 e a Hsp70-1A foram expressas e purificadas conforme descrito em (Silva *et al.*, 2013) e (Borges, J. C. e Ramos, C. H., 2006; Borges e Ramos, 2009), respectivamente.

2.1.3. Quantificação das proteínas

As proteínas foram quantificadas por espectrofotometria UV/visível de acordo com a lei de Beer-Lambert:

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

onde C é a concentração molar (mol.L^{-1}), Abs é a absorbância em 280 nm (adimensional), l é o caminho óptico (cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$). Algumas propriedades físico-químicas usadas no cálculo da concentração molar das proteínas e também em outros experimentos foram determinadas pelo software Sednterp (<http://sednterp.unh.edu/>) e estão dispostas na tabela a seguir:

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas teóricas. Valores calculados pelo Sednterp em condições desnaturantes considerando a LbSGT sem cauda de histidina e LbHsp90 e Hsp70-1A com cauda de histidina.

<i>Proteína</i>	$\epsilon_{280\text{nm}}$ ($\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$)	<i>MM (kDa)</i>	<i>His-tag</i>	<i>Número de resíduos</i>
LbSGT	20860	45,9	Clivada	411
LbHsp90	57300	82,8	Não clivada	724
Hsp70-1A	33350	72,2	Não clivada	661

Fonte: Autoria própria.

2.1.4. Caracterização biofísica da LbSGT

2.1.4.1. Espectropolarimetria de dicroísmo circular

As medidas de dicroísmo circular foram tomadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a um sistema Peltier PFD 425S para controle da temperatura. O espectro da LbSGT foi coletado a 20 °C com taxa de aquisição de 100 nm.min⁻¹ e largura da banda de 1 nm utilizando cubeta circular de quartzo com caminho óptico de 0,02 cm contendo 0,4 mg.mL⁻¹ de proteína em tampão 10 mM fosfato de sódio (pH 7,5) com 10 mM NaCl. Foram tomadas 60 acumulações. O espectro resultante foi normalizado para elipticidade residual molar ($[\theta]$) de acordo com a equação:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MM}{n \times C \times l} \quad (2)$$

onde θ é o sinal de dicroísmo circular (graus), MM é a massa molecular proteica (kDa), n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, l é o caminho óptico (cm), e C é a concentração proteica (mg.mL⁻¹). O conteúdo de estrutura

secundária da proteína foi estimado pelos *softwares* CDNN deconvolution (Böhm *et al.*, 1992) e Dichroweb (Whitmore e Wallace, 2008).

A estabilidade da LbSGT frente a agentes químicos desnaturantes foi estudada utilizando ureia. A proteína a $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão 20 mM fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 100 mM KCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol foi incubada com ureia por 60-120 minutos. A solução de ureia foi preparada no mesmo tampão da proteína e sua concentração foi determinada por refratometria de acordo com a equação abaixo (Warren e Gordon, 1966):

$$(117,66 \times \Delta N) + (29,753 \times (\Delta N)^2) + (185,56 \times (\Delta N)^3) \quad (3)$$

onde ΔN é a diferença entre o índice de refração da solução de ureia e o índice de refração do tampão. Os dados foram coletados em um único comprimento de onda (222 nm), a 20 °C com taxa de aquisição de 100 nm.min^{-1} e largura da banda de 1 nm utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. Foram tomadas 10 acumulações. Todas as medidas foram normalizadas para elipticidade residual molar ($[\theta]$) (Equação 2). Os ajustes dos dados foram feitos pelo *software* Origin 8.0 com a função bi dose-resposta. A partir destes ajustes foi determinado o valor de C_m , isto é, o ponto de inflexão da curva sigmoidal graficada.

A estabilidade da LbSGT frente a altas temperaturas também foi estudada. A proteína a $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão 20 mM fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 100 mM KCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol teve sua desnaturação térmica monitorada em um único comprimento de onda (222 nm) num intervalo de 20-90 °C empregando largura de banda de 1 nm e cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. Por fim, todas as medidas foram normalizadas para elipticidade residual molar ($[\theta]$) (Equação 2). Os ajustes dos dados foram feitos pelo *software* Origin 8.0 com a função bi dose-resposta. A partir destes ajustes foi determinado o valor de T_m , isto é, o ponto de inflexão da curva sigmoidal graficada.

2.1.4.2. Cromatografia de exclusão molecular analítica

Para os experimentos de aSEC, 1 mg.mL^{-1} de LbSGT foi aplicado em uma coluna Superdex 200 GL 10/30 acoplada ao *ÄKTA Prime plus device*. A coluna foi previamente equilibrada com tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 100 mM

NaCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol e a eluição proteica foi monitorada em 280 nm. Após a eluição da proteína recombinante, uma mistura de proteínas padrão com R_s e MM conhecidos (apoferritina, γ -globulina, BSA, anidrase carbônica e citocromo C) foi preparada a 1 mg.mL⁻¹ no tampão descrito acima e aplicada na coluna. O volume de retenção observado para as proteínas padrão foi transformado em coeficiente de partição de acordo com a equação:

$$k_{av} = \frac{v_e - v_0}{v_t - v_0} \quad (4)$$

onde k_{av} é o coeficiente de partição, v_e é o volume de eluição das proteínas, v_0 é o volume morto da coluna (determinado pela corrida de 1 mg.mL⁻¹ de blue dextran) e v_t é o volume total da coluna. Os ajustes dos dados foram feitos pelo *software* Origin 8.0. Parâmetros hidrodinâmicos como a $MM_{aparente}$ e o R_s da LbSGT foram obtidos por regressões lineares; o primeiro parâmetro foi obtido plotando k_{av} versus log MM e o segundo parâmetro foi obtido plotando R_s versus $-\log k_{av}^{1/2}$.

2.1.4.3. Ultracentrifugação analítica

Os experimentos de ultracentrifugação analítica, método de velocidade de sedimentação (SV-AUC), foram realizados em uma ultracentrífuga analítica *Beckman Optima XL-A* (equipada com rotor AN-60Ti). A LbSGT em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 100 mM NaCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol foi testada a 20 °C e 25000 rpm em concentrações que variaram de 300 a 1850 μ g.mL⁻¹. A aquisição de dados foi feita em 236 nm.

Os dados experimentais de absorbância foram graficados e ajustados contra o raio da cela utilizando o *software* SedFit (v.12.1) (Schuck *et al.*, 2002) a fim de obter os coeficientes de sedimentação (s) na forma de uma função de distribuição de s ($c(s)$). A razão friccional (f/f_0) foi utilizada como parâmetro de regularização nesse ajuste. Os valores de s foram determinados como o ponto máximo das curvas $c(s)$ depois da normalização para as condições padrão ($s_{20,w}$) (coeficiente de sedimentação em água, a 20 °C). Para tanto, foram usados os valores de viscosidade do tampão ($\eta = 0,01085$ poise), densidade do tampão ($\rho = 1,00486$ g.mL⁻¹) e volume parcial específico da proteína ($V_{bar} = 0,72443$ cm³.g⁻¹) determinados pelo *software* Sednterp. Por fim, o coeficiente de sedimentação padrão ($s_{20,w}^0$) (coeficiente de sedimentação em condições padrão em diluição

infinita, onde a concentração de proteína tende a $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi estimado pela regressão linear de $s_{20,w}$ versus a concentração de proteína.

Os experimentos de desnaturação química acompanhada por AUC foram feitos no mesmo equipamento, utilizando o mesmo rotor. A LbSGT a $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão 20 mM fosfato de potássio (pH 7,5) com 100 mM KCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol foi testada a 20°C e 40000 rpm. A aquisição de dados foi feita em 236 nm. A solução de ureia foi preparada no mesmo tampão da proteína e sua concentração foi determinada por refratometria, de acordo com a equação 3. Esses experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM-ABTLuS) em Campinas/SP.

2.1.4.4. Espalhamento de raios-x a baixo ângulo

Os experimentos de SAXS foram feitos na linha D02A-SAXS2 nas dependências do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM-ABTLuS) em Campinas/SP. Os dados de espalhamento foram coletados usando um feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e distância detector-amostra de aproximadamente 1000 mm. As amostras de LbSGT (a $1,5, 3, 4,5$ e 6 mg.mL^{-1} em tampão 20 mM fosfato de potássio (pH 7,5) com 100 mM KCl, 10 mM EDTA e 1 mM β -mercaptoetanol) foram medidas em célula com janela de mica com 1 mm de caminho óptico. Os perfis de espalhamento foram coletados por um detector MarCCD durante 300 segundos para as amostras e para o tampão.

No tratamento dos dados, o perfil de espalhamento do tampão foi subtraído dos perfis de espalhamento das amostras. A agregação proteica foi verificada usando a aproximação de Guinier (linearidade em $\ln I(q)$ versus q^2 , para valores de baixo q). Os valores de R_g foram estimados (Konarev *et al.*, 2003) e os valores de $p(r)$ foram calculados usando o *software* GNOM (Semenyuk e D.I., 1991; Svergun, 1992). O modelo *ab initio* da LbSGT foi construído pelo *software* DAMMIN (Svergun, 1999). Foram gerados cerca de 20 modelos, sendo que os mais prováveis foram obtidos usando o *software* DAMAVER (Volkov e Svergun, 2003), levando ao modelo final apresentado neste trabalho. O *software* HydroPro (Ortega *et al.*, 2011) foi usado na validação e predição de propriedades hidrodinâmicas do modelo *ab initio* final (Borges *et al.*, 2016).

2.1.5. Western blotting

Para a identificação *in vivo* da LbSGT foram usadas linhagens de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimonial SbIII (MHOM/BR/75/M2904). O cultivo dos parasitos e a preparação dos lisados celulares foram feitos conforme descrito em (Seraphim *et al.*, 2013).

A LbSGT a 10 ng.mL^{-1} e alíquotas dos lisados celulares foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética foi feita a transferência para uma membrana de nitrocelulose de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. A membrana foi então bloqueada por 1 hora com tampão 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20 e 5 % de leite em pó. Após esse período, o anticorpo policlonal primário produzido em coelho anti-LbSGT (Célula B – Serviço de produção de anticorpos – UFRGS/RS) foi adicionado no título 1:50000 e a incubação ocorreu por mais 1 hora. A membrana foi posteriormente lavada com tampão 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 150 mM NaCl (tampão de lavagem) e então foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (título 1:30000) conjugado com a fosfatase alcalina. Após 1 hora de incubação nessas condições, a membrana foi novamente lavada com tampão de lavagem e revelada com NBT/BCIP, do kit AP conjugate substrate da Biorad.

2.1.6. Estudo da interação da LbSGT com LbHsp90 e Hsp70-1A

2.1.6.1. Termoforese em microescala

Para os ensaios de termoforese em microescala (MST) as proteínas LbHsp90 e Hsp70-1A foram marcadas. Para tanto, 1 mg.mL^{-1} de isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi preparado no mesmo tampão das proteínas (40 mM HEPES (pH 7,5) com 100 mM KCl) e posteriormente incubado com as proteínas puras durante 15 horas a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (foram adicionados $50 \text{ }\mu\text{L}$ de FITC para cada 1 mg.mL^{-1} de proteína). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm durante 10 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes resultantes foram aplicados em uma coluna *HiTrap desalting* acoplada ao *ÄKTA Prime plus device* previamente equilibrada com o tampão das amostras, a fim de retirar a porção de FITC não ligada. As proteínas marcadas foram quantificadas conforme a Equação 5. Um fator de correção é aplicado visto que o FITC também absorve em 280 nm.

$$C = Abs_{280nm} - \frac{(0,35 \times Abs_{495nm})}{\epsilon_{280nm}} \quad (5)$$

onde C é a concentração molar (mol.L^{-1}), Abs_{280nm} é a absorbância em 280 nm (adimensional), Abs_{495nm} é a absorbância em 495 nm (adimensional) e ϵ_{280nm} é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$). A proporção de FITC ligada à proteína pode ser estimada de acordo com a equação a seguir:

$$\frac{F}{P} = \frac{MM}{389} \times \frac{\frac{Abs_{495nm}}{195}}{\frac{[Abs_{280nm} - (0,35 \times Abs_{495nm})]}{E^{0,1\%}}} \quad (6)$$

onde F/P é a razão molar (FITC/proteína) (adimensional), MM é a massa molecular da proteína marcada (Da), Abs_{495nm} é a absorbância em 495 nm (adimensional), Abs_{280nm} é a absorbância em 280 nm (adimensional) e $E^{0,1\%}$ é a absorção de 1 mg.mL^{-1} de proteína em 280 nm. A razão molar F/P de um bom procedimento de marcação deve estar entre 0,3 e 1,0 (The e Feltkamp, 1970a; b; Goding, 1976). O peptídeo MEEVD utilizado foi sintetizado já ligado ao FITC. Sua quantificação foi feita de acordo com a Equação 1, considerando a absorbância em 495 nm e $\epsilon_{495nm} = 70000 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$.

Os experimentos de MST foram feitos em um Monolith NT.115 (*NanoTemper Technologies*) a 23 °C usando 20% de LED, excitação tipo “azul” e 20-40% de IR-laser power. Os tempos de *laser on* e *laser off* empregados foram de 30 e 35 segundos, respectivamente. As concentrações de FITC-LbHsp90, FITC-Hsp70-1A e FITC-peptídeo MEEVD foram mantidas constantes em 55, 92 e 55 nM, respectivamente. A LbSGT foi titulada em diluições seriadas (1:1) sendo a maior concentração de 250 μM e a menor concentração de 5 nM (concentrações de LbSGT dimérica). As amostras foram colocadas em capilares tipo padrão da *NanoTemper Technologies* e as medições foram realizadas em tampão 40 mM HEPES (pH 7,5) contendo 100 mM KCl e 0,05 % de Tween-20 na presença e ausência de 2 mM de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP-PNP) e 2 mM de MgCl_2 . Os ajustes dos dados foram feitos pelo software Origin 8.0 plotando a fração ligada *versus* log concentração LbSGT. A partir destes ajustes foi determinada a constante de dissociação (K_D) de interação entre as espécies (Seidel *et al.*, 2013). Os experimentos aqui descritos foram realizados nas dependências do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM-ABTLuS) em Campinas/SP.

2.1.6.2. Anisotropia de fluorescência

Para os ensaios de anisotropia a LbSGT foi marcada com fluoresceína como descrito na seção anterior. Foram estudadas as interações da FITC-LbSGT com a LbHsp90 e da FITC-LbSGT com a Hsp70-1A (na presença e ausência de 2 mM de nucleotídeos e 2 mM de $MgCl_2$) e também a interação do FITC-peptídeo MEEVD com a LbSGT. Todas as proteínas foram preparadas em tampão 40 mM HEPES (pH 7,5) contendo 100 mM KCl. Para a primeira interação, a concentração de FITC-LbSGT foi mantida constante em 15 nM e a concentração de LbHsp90 (dimérica) variou de 0,7 a 25 μ M. Na segunda interação a concentração de FITC-LbSGT foi mantida constante em 15 nM e a concentração de Hsp70-1A variou de 0,1 a 80 μ M e na terceira interação a concentração de FITC-peptídeo MEEVD foi também mantida constante em 15 nM e a concentração de LbSGT (dimérica) variou de 0,7 a 25 μ M. As medidas foram feitas em um fluorímetro ISS K2 a 20 °C, com *time base* de 5 segundos e *number of interactions* igual a 5. Após incubação inicial de 6 minutos, as amostras foram excitadas em 495 nm e a emissão polarizada foi detectada usando um filtro 515 nm. O tempo de incubação para as amostras subsequentes foi de 2 minutos e a emissão polarizada foi detectada nas mesmas condições. Os ajustes dos dados foram feitos pelo software Origin 8.0. O K_D de interação entre as espécies foi obtido plotando a anisotropia de fluorescência *versus* log concentração de proteína não marcada. Esses ensaios foram feitos nas dependências do Laboratório do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” localizado no IFSC/USP São Carlos-Campus II em São Carlos/SP.

2.2. Resultados e discussão

2.2.1. Análise sequencial, expressão e purificação da LbSGT

A LbSGT teve sua sequência comparada com as proteínas ortólogas hSGT#1, hSGT#2 (isoformas em humano) e ySGT. O alinhamento sequencial (mostrado na Figura 6) indica que a LbSGT tem 34% de identidade com a hSGT#1 e a ySGT e 41% de identidade com a hSGT#2, sugerindo um baixo grau de conservação entre essas proteínas. A região com maior conservação entre elas é o domínio TPR, responsável pela interação da SGT com a Hsp90 e Hsp70. O domínio TPR da LbSGT apresenta aproximadamente 50% de identidade e 78%

de similaridade com os domínios TPRs das proteínas ortólogas. Os valores obtidos estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Identidade e similaridade sequencial. Valores de identidade e similaridade (em %) obtidos pelo software Lalign. Para fins comparativos, foram feitos os alinhamentos das sequências completas e das sequências dos domínios TPR de SGTs ortólogas.

Proteínas completas			Domínios TPR		
Alinhamento com LbSGT	Identidade (%)	Similaridade (%)	Alinhamento com TPR _{LbSGT}	Identidade (%)	Similaridade (%)
ySGT	34	64	TPR _{ySGT}	46	74
hSGT#1	34	64	TPR _{hSGT#1}	50	79
hSGT#2	41	70	TPR _{hSGT#2}	48	80

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Análise sequencial da LbSGT. O alinhamento mostrou que a LbSGT tem baixa identidade com as isoformas ortólogas hSGT#1, hSGT#2 e ySGT. Abaixo o símbolo * representa aminoácidos idênticos, : aminoácidos com propriedades fortemente similares e . aminoácidos fracamente similares. O domínio TPR, região mais conservada, está destacado na figura.

LbSGT	MEEKDQPIITDDHRKLVFSFLRMMRRSKV-----ENPERTEAVAQMLGEEFGVDPAGSGGLHDTVDVL	
ySGT	-----MSASKEEIAALIVNYFSSIVEKKEISEDGADSLNVAMDCISEAFGFEREAVSGILGKSEFKG	
hSGT#1	-----MDNKKRLAYAI IQFLHDQLRHGGLSSDAQESLEVAIQCLETAFGVTVEDSDLA-----LP	
hSGT#2	-----MSSIKHLVYAVIRFLREQSQMDTYTSDEQESLEVAIQCLETVFKISPETHLA-----VS	
	 : . : : : : : : *	
LbSGT	EAFKTALREHERRSGAEQDEKFMFSFVELLEKKGYFKGVEKGSDEYAQRLEKARDKFNQRNNPYEGLTAE	TPR
ySGT	QH-----LADILNSASRVPSNKKDDAEN-----VEINIPEDDAETKAKAE	
hSGT#1	QT-----LPEI-----FEAAATGKE-M---PQDLRSPARTPPSEEDSAEAE	
hSGT#2	QP-----LTEM-----FTSSFCCKND-V---LP-----LSNSVPEDVGVKAD	
	: : : : : : : *	
LbSGT	QIKNKGNELMSQAKYKEAIAYYTKAIELESNDNAVFFANRAAAHHLKDYDNAIDCERAI VINPEYSKS	TPR
ySGT	DLKMQGNKAMANKDYELAINKYTEA IKVLP TNAIYYANRAAAHSSLKEYDQAVKDAESAISIDPSYFRG	
hSGT#1	RLKTEGNEQMKVENFEAAVHFY GKAIELNPANAVYFCNRAAAYS KLGN YAGAVQDCERAICIDPAYS KA	
hSGT#2	QLKDEGNHMKENYAAA VDCY TQAIELDPNNAVYYCNRAAQS KLGH YTD AIKDCEKAI AIDSKYSA	
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
LbSGT	YSRLGTALFYQENYARAVEAFTKACDLDPDNDTYK-----EDLKRAEKA-----KMTGLT	TPR
ySGT	YSRLGFAKYAQGKPEEALAYKKVLDIEGNATEAMKRDYESAKKKVEQSLNLEKTVPEQSRDADVDAS	
hSGT#1	YGRMGLALSSLNKHVEAVAYYKKALELDPDNETYK-----SNLKIAELKL-----REAPSP	
hSGT#2	YGRMGLALTALNKFEEAVTSYQKALDLPENDSYK-----SNLKIAEQKL-----REVSSP	
	* . * : * : : * : : * : : * : *	
LbSGT	TGGGMGGFPGMGGFPGMGGMPDMSQFASMMNNPQFMETAQRMMQNPEFSNMVANMA-----GKFS	
ySGT	QGASAGGLPDLGSL LG-----GLGGLMNNPQLMQAAQKMSNPGAMQNIQKMMQDPSIRQMAEGFA	
hSGT#1	TGGVG-----SFDIAGLLNPNPGFMSMASNLMMNNPQIQQLMSGMI-----SG--	
hSGT#2	TGTGL-----SFDMASLINNP AFISMAASLMQN PQVQQLMSGMM-----TN--	
	* : : : * : : * : * : *	
LbSGT	QGGMDPAELNRLGADMGMNRNVDEEGNVV-----TPFGKVNRAAIEKLQEEVVRKNPKLAGIMADVQA	
ySGT	SGGGTPNLSDLMN-----NPALRNM-----AGNLFGGAGAQST-----DETPDNENKQ-----	
hSGT#1	--GN-----NPLGTPGTSPSQNDLASLIQAGQQFAQQMQQNPELIEQLRSQIRSRTPSAS---NDDQQ	
hSGT#2	--AI-----G--GPAAGVGGLTDLSSLIQAGQQFAQQIQQNPELIEQLRNHIRSRFSFSS---AEEHS	
	. : : : : : : : : : : : : : : : :	
LbSGT	NGYGAFQKYLGDPPDVMSLMMKFQSLMFTNPNSSA	
ySGT	-----	
hSGT#1	E-----	
hSGT#2	-----	

Fonte: Autoria própria.

Apesar de possuírem baixo grau de conservação, as proteínas completas apresentam alto grau de similaridade (aproximadamente 66%). Devido à maior conservação do domínio TPR, pode-se inferir que a LbSGT tem potencial de interagir com as chaperonas Hsp90 e Hsp70 através deste domínio. Ademais, o baixo grau de conservação observado entre as SGTs ortólogas sugere que os mecanismos envolvidos nessas interações podem apresentar peculiaridades, principalmente devido à variação estrutural da região C-terminal.

A LbSGT recombinante foi devidamente obtida nas condições apresentadas na seção Materiais e métodos. Após a expressão em *E. coli*, a proteína foi purificada por dois passos cromatográficos até alcançar a homogeneidade e grau de pureza maior que 95%. Entre os dois passos adotados (cromatografia de afinidade ao níquel e cromatografia de exclusão molecular), a cauda de histidina fusionada na extremidade N-terminal da LbSGT foi clivada com trombina. A eficiência da estratégia de purificação escolhida para a LbSGT solúvel foi acompanhada com gel SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970), como visto na Figura 7 abaixo:

Figura 7 – Expressão e purificação da LbSGT. Gel SDS-PAGE a 12% mostrando a expressão da LbSGT (MM $\approx$ 45 kDa) em *E. coli* BL21 (DE3) pela adição de IPTG (canaleta 2 corresponde às células não induzidas, canaleta 3 à fração solúvel das células induzidas e canaleta 4 à fração insolúvel das células induzidas) e purificação por dois passos cromatográficos. O sobrenadante resultante da lise das células induzidas (canaleta 5) foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel. A proteína eluída (canaleta 6) teve sua cauda de histidina clivada com trombina e foi posteriormente submetida à cromatografia de exclusão molecular sendo finalmente obtida com alto grau de pureza e homogeneidade (canaleta 7).

Fonte: Autoria própria.

As espécies de tamanhos menores que 45 kDa que aparecem abaixo da banda da proteína alvo nas canaletas 6 e 7 (Figura 7) correspondem à

degradação da região C-terminal da LbSGT. Esse comportamento também é observado em SGTs de outros organismos, como *Caenorhabditis elegans* (Worrall *et al.*, 2008). Vale ressaltar que as bandas de degradação observadas não comprometem a qualidade dos resultados aqui apresentados, pois não somaram 5% da amostra íntegra.

2.2.2. Caracterização da estrutura secundária da LbSGT

A estrutura secundária da LbSGT foi estudada por dicroísmo circular. Na Figura 8 os picos mínimos em 222 nm e 208 nm e o pico máximo em aproximadamente 190 nm observados caracterizam proteínas ricas em estruturas do tipo hélice α . Este resultado indicou que a LbSGT recombinante foi obtida na forma enovelada.

Figura 8 - Espectro de dicroísmo circular da LbSGT. O espectro de CD para a LbSGT mostra que a proteína foi obtida enovelada. Na figura está representada a elipticidade residual molar ($[\theta]$) aferida num intervalo de 260 a 183 nm.

Fonte: Autoria própria.

A partir do espectro de CD foi feita uma estimativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína recombinante utilizando os *softwares* *CDNN deconvolution* e *Dichroweb*, conforme disposto na Tabela 4. As previsões feitas pelos *softwares* foram bem parecidas, indicando que a LbSGT possui estrutura secundária do tipo hélice α em grande quantidade. Como visto anteriormente, os três domínios que compõem a LbSGT são preditos para serem ricos em estruturas do tipo hélices α , destacando-se entre eles o domínio TPR. Interessantemente,

essa assinatura espectral foi também observada para outras co-chaperonas contendo domínios TPR em *L. braziliensis*, como a LbHIP e a LbHOP (Dores-Silva *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Composição de estrutura secundária da LbSGT. Os valores estimados para cada tipo de estrutura são dados em porcentagem (%). Os erros das deconvoluções foram < 5%.

<i>Tipo de estrutura secundária</i>	<i>CDNN deconvolution (%)</i>	<i>Dichroweb (%)</i>
Hélice α	57	55
Folha β antiparalela	2	4
Folha β paralela	7	5
Voltas β	12	14
Randômica	22	22
<i>Total</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

Fonte: Autoria própria.

2.2.3. Estudos hidrodinâmicos: propriedades e estado oligomérico da LbSGT

A caracterização hidrodinâmica da LbSGT foi feita por aSEC e AUC. Nos experimentos de aSEC (Figura 9), a LbSGT eluiu com volume de 11,7 mL, perfil muito parecido ao da λ -globulina, uma proteína padrão de 160 kDa (Figura 9A). Com base nos perfis de eluição das proteínas padrão e da proteína alvo, a MM_{aparente} calculada para a LbSGT foi de 164 ± 5 kDa e o R_s de 47 ± 2 Å.

Figura 9 – Cromatografia de exclusão molecular analítica da LbSGT. **A)** O perfil de eluição da LbSGT (linha vermelha) mostra que a proteína alvo eluiu na forma de uma única espécie. Os experimentos foram feitos em uma coluna Superdex 200 GL 10/300 calibrada com uma mistura de proteínas padrão de R_s e MM conhecidas (linha azul). **B)** Regressão linear para determinação do R_s da LbSGT (representada na figura pelo círculo vermelho).

Fonte: Autoria própria.

A f/f_0 foi calculada com base nos valores de R_s experimental e R_{shp} predito para a proteína alvo, que foi 30 Å. Os cálculos forneceram uma $f/f_0 = 1,6 \pm 0,1$, indicando que a LbSGT comporta-se como um dímero alongado em solução.

Os experimentos de velocidade de sedimentação (SV-AUC) estão representados abaixo. A Figura 10A mostra que a LbSGT sedimentou na forma de uma única espécie e apresenta $MM = 91 \pm 2$ kDa. A regressão linear da concentração de LbSGT em função dos valores de $s_{20,w}$ (Figura 10B) forneceu o valor de $s_{20,w}^0 = 4,72 \pm 0,02$ S. A f/f_0 obtida pelo ajuste do *software* SedFit foi de $1,60 \pm 0,04$. Esses valores, assim como os obtidos por aSEC, indicam que a LbSGT comporta-se como um dímero alongado em solução.

Figura 10 – Ensaio de velocidade de sedimentação da LbSGT. A) Representação gráfica da distribuição dos coeficientes de sedimentação ($c(S)$) para diferentes concentrações de proteína, mostrando que o sistema é monodisperso. B) Regressão linear para determinação do $s_{20,w}^0$ da LbSGT.

Fonte: Autoria própria.

2.2.4. Estudo da estabilidade da LbSGT

A estabilidade química e térmica da LbSGT também foi estudada. Os perfis de desnaturação obtidos a partir do monitoramento do sinal de CD em 222 nm (Figura 11) forneceram os valores de C_m e T_m , parâmetros que também ajudam a compreender a organização proteica. Na Figura 11A observou-se que a ureia induziu duas transições na LbSGT ($C_{m1} = 3,2 \pm 0,1$ mol.L⁻¹ e $C_{m2} = 6,0 \pm 0,1$ mol.L⁻¹). A elipticidade residual molar próxima à zero nas concentrações mais altas de ureia (região de pós-transição) indicou que a estrutura secundária da LbSGT foi totalmente rompida pelo agente desnaturante. Na Figura 11B observou-se que as altas temperaturas também induziram duas transições na LbSGT ($T_{m1} = 52,5 \pm 0,7$ °C e $T_{m2} = 62 \pm 1$ °C). O desenovelamento térmico da LbSGT foi um processo parcialmente reversível, visto que a estrutura secundária foi recuperada em aproximadamente 40% após o retorno à temperatura inicial (20 °C) (dados não mostrados).

Figura 11 – Investigação da estabilidade química e térmica da LbSGT. **A)** Perfil da desnaturação química da LbSGT monitorada por CD em 222 nm. Na figura está representada a elipticidade residual molar ($[\theta]$) aferida em concentrações crescentes de ureia. Os valores correspondem à média de três réplicas. **B)** Perfil da desnaturação térmica da LbSGT monitorada por CD em 222 nm. Na figura está representada a elipticidade residual molar ($[\theta]$) em um intervalo de 20 a 90 °C. Os valores correspondem à média de duas réplicas.

Fonte: Autoria própria.

A presença de mais de uma transição tanto na desnaturação química quanto na desnaturação térmica acompanhadas por CD sugere que a LbSGT possui domínios proteicos com estabilidades distintas. Portanto, a LbSGT possui características de uma proteína multidomínios. A LbHIP também apresentou múltiplas transições nos seus perfis de desnaturação química. A desnaturação química da LbHIP induzida por ureia e cloridrato de guanidina e acompanhada por CD, Fluorescência, AUC e SAXS sugerem que a C_{m1} da LbHIP corresponde a um evento que envolve os domínios TPR e C-terminal da proteína, enquanto que a C_{m2} corresponde à dissociação do dímero. Como a segunda transição ocorre em concentração maior que 9 mol.L^{-1} de ureia, pôde-se inferir que a LbHIP dimérica é altamente estável (Dores-Silva *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2016).

A fim de compreender melhor a diferença de estabilidade dos domínios e identificar a quais eventos às transições estão relacionadas, a desnaturação química da LbSGT foi monitorada por AUC. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 12.

Figura 12 – Investigação da desnaturação química da LbSGT por AUC. A) Representação gráfica da distribuição dos coeficientes de sedimentação ($c(S)$) para diferentes concentrações de ureia, mostrando que a dissociação do dímero ocorre com 3 mol.L⁻¹ de agente desnaturante. B) Representação gráfica do $s_{20,w}$ e da MM em função da concentração de ureia.

Fonte: Autoria própria.

As curvas de distribuição dos coeficientes de sedimentação observadas na Figura 12A permitiram extrair valores de $s_{20,w}$ a partir de seus picos. Tais valores foram representados na Figura 12B e o ajuste sigmoidal feito sugeriu uma única C_m em 3 mol.L⁻¹ para a LbSGT. Interessantemente, na concentração de 3 mol.L⁻¹ de ureia foi observada a presença de 2 espécies em solução, provavelmente devido à monomerização da LbSGT (Figura 12A). Na transição em 3 mol.L⁻¹ o valor de $s_{20,w}$ passou de 4,72 S para 3,39 S e o valor de MM estimada passou de 91 kDa para 55 kDa (Figura 12B). Esse valor de C_m foi coerente com o valor de C_{m1} obtido por CD na presença do mesmo agente desnaturante. Essas informações nos permitem inferir que os valores de C_m em 3 mol.L⁻¹ observados por CD e por AUC correspondem à dissociação do dímero, isto é, envolvem o desenovelamento do domínio N-terminal da LbSGT. Ademais, pode-se inferir também que a LbSGT é menos estável do que a LbHIP, visto que a dissociação do dímero ocorre em concentrações de ureia menores do que as requeridas para a dissociação da LbHIP (Dores-Silva *et al.*, 2012).

2.2.5. SAXS: dinâmica conformacional e construção do modelo *ab initio*

Os dados de SAXS para a LbSGT foram coletados a fim de elucidar sua dinâmica em solução. A curva de espalhamento de raios-X e a linearidade observada na análise da região de Guinier (Figura 13A) sugeriram que a solução contendo a LbSGT estava homogênea e que não ocorreu agregação aparente independente da concentração e tempo de exposição ao feixe de raios-X. Sendo

assim, o sistema foi classificado como monodisperso e forneceu os valores de $MM = 99 \pm 3$ kDa e $R_g = 41 \pm 1$ Å. A Figura 13B representa a curva de distribuição de distâncias da LbSGT indicando que essa proteína possui um D_{max} de 165 ± 5 Å com características de proteína modular ou contendo múltiplos domínios. Em conjunto, os dados de SAXS corroboram com a observação de que a LbSGT se comportou como um dímero alongado em solução.

Figura 13 – Experimentos de SAXS da LbSGT. **A)** Curva de espalhamento da LbSGT obtida a partir da média das curvas coletadas para as concentrações de 4,5 e 6 mg.mL⁻¹. A curva da proteína foi sobreposta com as curvas calculadas pelo programa GNOM. *Inserto:* análise da região de Guinier para a LbSGT a 4,5 mg.mL⁻¹. **B)** A respectiva função $p(r)$ para a curva de espalhamento da LbSGT foi obtida pelo programa GNOM e indica que a proteína tem D_{max} de aproximadamente 165 Å.

Fonte: Autoria própria.

O modelo *ab initio* foi construído com base no ajuste das curvas simuladas pelos *softwares* DAMMIN e DAMAVER. Esse modelo foi então validado pela correlação das propriedades hidrodinâmicas e estruturais preditas para este (extraídas pelo *software* HydroPro) com aquelas obtidas experimentalmente pelas técnicas de aSEC, AUC e SAXS (ver Figuras 9, 10 e 13). Para fins comparativos todos esses resultados foram sumarizados na Tabela 5. A boa correlação entre os dados experimentais e os dados preditos para o modelo *ab initio* indicam que este é um bom representante para a estrutura em baixa resolução da LbSGT, principalmente considerando que se trata de uma proteína multi-domínios e provavelmente detentora de relativa flexibilidade entre as regiões que conectam os diferentes domínios.

Tabela 5 – Propriedades estruturais e hidrodinâmicas da LbSGT. Abaixo estão dispostos os valores preditos pelo *software* Sednterp para a LbSGT como um monômero ou dímero globular em água a 20 °C, os valores obtidos experimentalmente pelas técnicas biofísicas empregadas e também os valores teóricos para o modelo *ab initio* preditos pelo *software* HydroPro.

Propriedades	Predito para uma esfera		Determinação experimental			
	Monômero	Dímero	aSEC	SV-AUC	SAXS	HydroPro
MM (kDa)	45,9	91,8	164 ± 5	91 ± 2	99 ± 3	-
$s_{20,w}^0$ (S)	4,8	7,4	-	4,72 ± 0,02	-	5,17
R_s (Å)	24	30	47 ± 2	-	-	41,6
f/f_0	1	1	1,6 ± 0,1 ^{&}	1,60 ± 0,04 ^{&}	-	-
R_g (Å)	-	-	-	-	41 ± 1	41,2
D_{max} (Å)	-	-	-	-	165 ± 5	165

[&] Considerando dímero.

Fonte: Autoria própria.

Sabendo que o modelo *ab initio* é um bom representante para a LbSGT em solução, foi feita a sobreposição de estruturas terciárias ao modelo a fim de compreender melhor a organização estrutural e a dinâmica da proteína LbSGT (Figura 14).

Figura 14 – Modelo *ab initio* para a LbSGT. Sobreposição dos envelopes do modelo *ab initio* da LbSGT obtidos pelo *software* DAMMIN às estruturas 3D: PDB ID 2VYI (domínio TPR da hSGT), PDB ID 4CPG (domínio N-terminal da hSGT) e PDB ID 2GW1 (modelo estrutural do domínio C-terminal construído com o *software* SWISS-MODEL usando como *template* a yTom70). Cada monômero está representado em vermelho e verde.

Fonte: Autoria própria.

O modelo *ab initio* obtido representa um dímero alongado e é consistente com as propriedades hidrodinâmicas e estruturais determinadas experimentalmente para a LbSGT. Ademais, o modelo permitiu prever a posição dos domínios da proteína alvo. Como o domínio N-terminal é o ponto de dimerização, ele foi colocado no centro do modelo *ab initio* (Figura 14). O domínio

TPR de cada protômero foi colocado ao lado de cada domínio N-terminal e nas extremidades foi colocado o modelo referente ao domínio C-terminal construído com o *software* SWISS-MODEL. É importante afirmar que o modelo para a região C-terminal da LbSGT não apresentou qualidade estereoquímica devido à baixa identidade desta região com possíveis *templates* identificados no PDB (*Protein Data Bank*). Ainda assim, este modelo foi usado para a sobreposição pois não foram analisadas características ou detalhes atômicos da estrutura.

Interessantemente, as propriedades experimentais aqui apresentadas assemelham-se muito às propriedades experimentais determinadas para a LbHIP. Essa última também se comporta como um dímero alongado em solução, com $MM = 83 \pm 4$ kDa, $R_g = 53 \pm 2$ Å, $f/f_0 = 1,94 \pm 5$ e $D_{max} = 200 \pm 10$ Å (calculados de acordo com as curvas experimentais de SAXS) (Dores-Silva *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2016).

2.2.6. Identificação da LbSGT *in vivo*

Os experimentos de *western blotting* foram feitos a fim de identificar e investigar o perfil de expressão da LbSGT em função da temperatura em linhagens de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimonial SbIII (Figura 15). A motivação desta análise foi verificar uma possível relação entre a expressão da proteína alvo e a resposta do parasito ao antimonial (Batista, F. A. *et al.*, 2015).

Na figura abaixo, observa-se uma banda de aproximadamente 50 kDa em todas as condições testadas, indicado que a LbSGT foi expressa nas linhagens sensíveis e resistentes ao antimonial tanto nas condições normais de crescimento do parasito (a 26 °C) quanto em condições que simulam o choque térmico (a 37 °C). Sendo assim, esses resultados mostraram a LbSGT como uma proteína expressa constitutivamente, podendo ser classificada como proteína cognata nas condições testadas.

Figura 15 – Identificação *in vivo* da LbSGT. Células promastigotas das linhagens de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimonial mantidas em diferentes temperaturas (26 e 37 °C) foram lisadas e submetidas à análise por *western blotting*. Utilizando um anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante, foi possível observar uma banda de aproximadamente 50 kDa em todos os lisados celulares, indicando que a LbSGT foi expressa em todas as condições consideradas.

Fonte: Autoria própria.

2.2.7. Estudos funcionais: interação da LbSGT com LbHsp90, Hsp70-1A e peptídeo MEEVD

As técnicas de MST e anisotropia de fluorescência foram escolhidas para elucidar a função da LbSGT junto à Hsp90 e à Hsp70. Nesses experimentos a Hsp70-1A humana disponível no laboratório (Borges, J. C. e Ramos, C. H. I., 2006; Borges e Ramos, 2009) foi empregada no lugar da LbHsp70, pois essa proteína recombinante não foi obtida na forma solúvel (dados não mostrados). Na Figura 16 os experimentos de anisotropia de fluorescência renderam valores de K_D de $4,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para a interação da FITC-LbSGT com a LbHsp90, $6,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para a interação da FITC-LbSGT com a Hsp70-1A e $K_D > 100 \mu\text{M}$ para a interação do FITC-peptídeo MEEVD com a LbSGT.

Figura 16 – Experimentos de anisotropia de fluorescência. Medidas de anisotropia de fluorescência normalizadas para determinar o K_D de interação entre FITC-LbSGT + LbHsp90, FITC-LbSGT + Hsp70-1A e FITC-peptídeo MEEVD + LbSGT. As curvas foram obtidas em concentrações crescentes de proteínas não marcadas. Os valores de K_D foram obtidos de acordo com o ajuste matemático como o ponto de inflexão das curvas.

Fonte: Autoria própria.

As interações da LbSGT com a FITC-LbHsp90 e da LbSGT com o FITC-peptídeo MEEVD também foram estudadas por MST, como visto na Figura 17. A interação entre a LbSGT e a FITC-Hsp70-1A não foi detectada por MST.

Figura 17 – Experimentos de MST. Medidas de interação para determinar o K_D de interação entre FITC-LbHsp90 e LbSGT e FITC-peptídeo MEEVD e LbSGT. As curvas foram obtidas em concentrações crescentes de LbSGT e os valores de K_D foram obtidos de acordo com o ajuste matemático como o ponto de inflexão das curvas.

Fonte: Autoria própria.

Os experimentos de MST forneceram valores de K_D de $7 \pm 1 \mu\text{M}$ para a interação da FITC-LbHsp90 com a LbSGT e $K_D > 100 \mu\text{M}$ para a interação do FITC-peptídeo MEEVD com a LbSGT. Em ambas as técnicas os resultados obtidos sugerem que a afinidade da LbSGT pela LbHsp90 foi maior do que a afinidade da LbSGT pelo peptídeo MEEVD. Essa diferença de afinidade entre a proteína completa e o peptídeo também é observada para a Hsp70-1A nos experimentos de anisotropia de fluorescência: a afinidade da LbSGT pela Hsp70-1A é maior do que a afinidade da LbSGT pelo peptídeo MEEVD. Os experimentos de anisotropia de fluorescência também sugerem que a afinidade da LbSGT pela LbHsp90 e pela Hsp70-1A são da mesma ordem de grandeza. Sendo assim, pode-se inferir que outras regiões das proteínas completas, além do motivo EEVD, estão envolvidas na interação entre as espécies.

Como visto anteriormente, a SGT e a HOP assemelham-se do ponto de vista funcional. Na literatura o K_D de interação entre a LbHOP e a LbHsp90 determinado por ITC é de $1,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Batista *et al.*, 2016). Esse valor é da mesma ordem de grandeza que os valores de K_D descritos nesse trabalho para a interação entre a LbSGT e a LbHsp90, evidenciando as similaridades entre as proteínas.

As co-chaperonas SGT/HOP atuam no complexo intermediário auxiliando na transferência da proteína cliente da Hsp70 para a Hsp90 (Seraphim *et al.*, 2014). Nessa transferência o complexo Hsp90-ATP-HOP/SGT associa-se ao complexo precoce após a hidrólise do ATP (Hsp70-ADP-*J protein*-proteína cliente). Sabendo da importância dos nucleotídeos no direcionamento dos ciclos funcionais das chaperonas, a interação da LbSGT com a LbHsp90 e da LbSGT com a Hsp70-1A na presença de nucleotídeos e MgCl_2 também foram estudadas (Figuras 18 e 19, respectivamente). O íon Mg^{+2} foi adicionado por se tratar de um cofator que facilita a interação das Hsp90/Hsp70 com os nucleotídeos.

Figura 18 – Interação LbSGT + LbHsp90 na presença de nucleotídeos e $MgCl_2$. **A)** Medidas de interação para determinar o K_D de interação entre FITC-LbHsp90 e LbSGT na presença de 2 mM de $MgCl_2$ e 2 mM de ATP, ADP ou AMP-PNP obtidas por MST. As curvas foram obtidas em concentrações crescentes de LbSGT e os valores de K_D foram obtidos de acordo com o ajuste matemático. **B)** Medidas de interação para determinar o K_D de interação entre FITC-LbSGT e LbHsp90 na presença de 2 mM de $MgCl_2$ e 2 mM de ATP, ADP ou AMP-PNP obtidas por anisotropia de fluorescência. As curvas foram obtidas em concentrações crescentes de LbHsp90 e as medidas de anisotropia de fluorescência foram normalizadas. Os valores de K_D foram obtidos de acordo com o ajuste matemático como o ponto de inflexão das curvas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 19 – Interação LbSGT + Hsp70-1A na presença de nucleotídeos e $MgCl_2$. Medidas de interação para determinar o K_D de interação entre FITC-LbSGT e Hsp70-1A na presença de 2 mM de $MgCl_2$ e 2 mM de ATP, ADP ou AMP-PNP obtidas por anisotropia de fluorescência. As curvas foram obtidas em concentrações crescentes de Hsp70-1A e as medidas de anisotropia de fluorescência foram normalizadas. Os valores de K_D foram obtidos de acordo com o ajuste matemático como o ponto de inflexão das curvas.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de K_D determinados por MST para a interação entre LbSGT e LbHsp90 foram de $6 \pm 1 \mu M$, $7 \pm 1 \mu M$ e $14 \pm 2 \mu M$ na presença de ATP, ADP e AMP-PNP, respectivamente. Por anisotropia de fluorescência os valores de K_D

foram de $3,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ na presença de ATP e ADP e de $3,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ na presença de AMP-PNP. Já os valores de K_D determinados por anisotropia de fluorescência para a interação entre LbSGT e Hsp70-1A foram de $4,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ e $3,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ na presença de ATP, ADP e AMP-PNP, respectivamente. Para fins comparativos, todos os valores de K_D determinados por MST e anisotropia de fluorescência estão dispostos na Tabela 6.

Os resultados obtidos para a interação entre a LbSGT e a LbHsp90 sugerem que a presença de nucleotídeos e magnésio não alterou significativamente a afinidade entre as proteínas. Sendo assim, pode-se dizer que as mudanças conformacionais induzidas pela presença dos nucleotídeos parecem não influenciar a afinidade entre as duas proteínas. Para a interação entre a LbSGT e a Hsp70-1A observou-se também que a presença de nucleotídeos e magnésio não alterou significativamente a afinidade entre as proteínas. Entretanto, nesse caso vale a pena destacar a interação na presença de ADP. O K_D obtido nessa condição foi o menor dentre todas as condições testadas, sugerindo que a afinidade da LbSGT pela Hsp70-1A é ligeiramente maior na presença desse nucleotídeo. Essa observação é interessante, visto que no complexo intermediário a SGT/HOP interage com a Hsp70 no complexo precoce após a hidrólise do ATP, isto é, quando essa proteína encontra-se ligada ao ADP e assume uma conformação fechada.

Tabela 6 – Estudo funcional da LbSGT. Valores de K_D determinados por MST e anisotropia de fluorescência para as interações da LbSGT com a LbHsp90, Hsp70-1A e peptídeo MEEVD na ausência e presença de nucleotídeos e $MgCl_2$.

Parceiros de interação da LbSGT	Aditivos	K_D (em μM)	
		MST	Anisotropia de fluorescência
Peptídeo MEEVD	-	> 100	>100
LbHsp90	-	7 ± 1	$4,0 \pm 0,2$
LbHsp90	ATP + $MgCl_2$	6 ± 1	$3,0 \pm 0,1$
LbHsp90	ADP + $MgCl_2$	7 ± 1	$3,0 \pm 0,1$
LbHsp90	AMP-PNP + $MgCl_2$	14 ± 2	$3,0 \pm 0,3$
Hsp70-1A	-	-	$6,0 \pm 0,3$
Hsp70-1A	ATP + $MgCl_2$	-	$4,0 \pm 0,7$
Hsp70-1A	ADP + $MgCl_2$	-	$1,0 \pm 0,1$
Hsp70-1A	AMP-PNP + $MgCl_2$	-	$3,0 \pm 0,2$

Fonte: Autoria própria.

2.2.8. A LbSGT é estruturalmente uma HIP e funcionalmente uma HOP

Como discutido anteriormente, o papel da LbSGT junto à Hsp90 e à Hsp70 não é bem conhecido. Acredita-se que a SGT seja estruturalmente semelhante à HIP e os dados aqui apresentados corroboram com essa hipótese. Como visto, tanto a LbSGT como a LbHIP são proteínas multi-domínios que se comportam como dímeros alongados em solução (Dores-Silva *et al.*, 2012). Essas duas co-chaperonas compartilham organizações estruturais similares (Figura 4). Entretanto, ao invés de interagir com a Hsp70 via motivo PTIEEVD, a HIP interage ionicamente com o DLN da Hsp70 através de uma hélice α presente na região C-terminal do domínio TPR (Prapapanich *et al.*, 1996; Irmer e Höhfeld, 1997; Nollen *et al.*, 2001).

Do ponto de vista funcional, acredita-se que a SGT seja semelhante à HOP, pois ambas são proteínas adaptadoras capazes de mediar a formação do complexo intermediário do *foldossoma* (Figura 3). Os ensaios de interação aqui apresentados forneceram valores de K_D para a interação entre a LbSGT e a LbHsp90 com mesma ordem de grandeza que o valor de K_D para a interação entre a LbHOP e a LbHsp90 (Batista *et al.*, 2016). Adicionalmente, a LbSGT interagiu com uma Hsp70 com afinidade da mesma ordem de grandeza. Em conjunto, esses dados sugerem que o dímero de SGT interage simultaneamente

(e indiscriminadamente) com a Hsp90 e a Hsp70 através dos domínios TPRs de cada protômero (Tobaben *et al.*, 2003; Liou e Wang, 2005; Worrall *et al.*, 2008).

A HOP utiliza dois domínios TPR independentes para interagir discriminadamente com Hsp90 e Hsp70 (Angeletti *et al.*, 2002). Os domínios TPR1 e TPR2A interagem respectivamente com os motivos PTIEVVD da Hsp70 e MEEVD da Hsp90 através do grampo de dicarboxilato (Scheufler *et al.*, 2000). Esse mecanismo envolve principalmente o dicarboxilato de um resíduo de ácido aspártico do motivo MEEVD ou PTIEVVD e dois resíduos de lisina do domínio TPR (Gava *et al.*, 2011). A interação do TPR1 com a Hsp70 é governada por interações hidrofóbicas e a interação do TPR2A com a Hsp90 é governada por interações de van der Waals. Já o domínio TPR2B da HOP é capaz de acomodar tanto o resíduo de metionina da Hsp90 quanto a conformação energeticamente desfavorável que a Hsp70 adota para interagir com essa região (Demand *et al.*, 1998; Scheufler *et al.*, 2000).

Com a finalidade de compreender o mecanismo que rege a interação entre a SGT e a Hsp90/Hsp70, foi feito um alinhamento sequencial entre o domínio TPR da LbSGT e os domínios TPR de HOPs ortólogas. Os valores de identidade e similaridade obtidos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Identidade e similaridade sequencial entre o TPR_{LbSGT} e os domínios TPR de HOPs ortólogas. Valores de identidade (I) e similaridade (S) em porcentagem obtidos pelo software Lalign

TPR1			TPR2A			TPR2B		
Alinhamento com TPR_{LbSGT}	I (%)	S (%)	Alinhamento com TPR_{LbSGT}	I (%)	S (%)	Alinhamento com TPR_{LbSGT}	I (%)	S (%)
LbHOP	37	78	LbHOP	26	62	LbHOP	36	74
yHOP	39	69	yHOP	30	64	yHOP	32	68
hHOP	28	73	hHOP	29	65	hHOP	38	77

Fonte: Autoria própria.

De um modo geral, os valores de identidade encontrados mostram que os domínios alinhados possuem baixa conservação entre si. Os maiores valores de identidade e similaridade encontrados foram entre o TPR_{LbSGT} e os domínios TPR1 e TPR2B das HOPs ortólogas, com destaque para o domínio TPR1 da LbHOP.

Figura 20 – Comparação entre domínios TPR. A) Alinhamento do domínio TPR da LbSGT com o domínio TPR da ySGT e os domínios TPR1 de HOPs ortólogas **B)** Alinhamento do domínio TPR da LbSGT com o domínio TPR da ySGT e os domínios TPR2A de HOPs ortólogas **C)** Alinhamento do domínio TPR da LbSGT com o domínio TPR da ySGT e os domínios TPR2B de HOPs ortólogas. Abaixo o símbolo * representa aminoácidos idênticos, : aminoácidos com propriedades fortemente similares e . aminoácidos fracamente similares. Em amarelo estão destacados os aminoácidos envolvidos na interação com a Hsp90 e Hsp70 através da formação do grampo de dicarboxilato e em cinza estão destacados os resíduos envolvidos na especificação da interação com a Hsp90/Hsp70 através do mesmo mecanismo.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 20 mostra um alinhamento sequencial do domínio TPR da LbSGT com os domínios TPR da ySGT e de HOPs ortólogas. Pode-se observar que os aminoácidos envolvidos na formação do grampo de dicarboxilato (destacados em amarelo) são conservados entre o domínio TPR_{LbSGT} e os domínios TPR1 e TPR2A das HOPs ortólogas. (Figuras 20A e 20B). A conservação entre o domínio TPR_{LbSGT} e o domínio TPR2B é menor (Figura 20C). Interessantemente, os aminoácidos envolvidos na especificação da interação com a Hsp70 e Hsp90 (destacados em cinza) apresentam um grau de conservação ainda menor. Para o domínio TPR da ySGT essas observações também são válidas.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o domínio TPR da SGT contém todos os resíduos de aminoácidos essenciais para a interação com os motivos C-terminais da Hsp90 e Hsp70, portanto, o mecanismo de interação da SGT com essas chaperonas assemelha-se ao da HOP e envolve a formação do grampo de dicarboxilato (Tobaben *et al.*, 2003; Worrall *et al.*, 2008). Curiosamente, a interação da LbSGT com o peptídeo MEEVD mostrou afinidade

menor do que as observadas para as interações com as proteínas completas, indicando que a interação da LbSGT com a Hsp90/Hsp70 depende, potencialmente, de outras regiões de ambas as proteínas.

Informações adicionais acerca do mecanismo de interação podem ser obtidas estudando a influência da LbSGT sobre a atividade ATPásica da Hsp90 e da Hsp70. A LbHOP, por exemplo, inibe a atividade ATPásica da LbHsp90 porque sua interação com essa chaperona promove a estabilização da conformação aberta da Hsp90 (Batista *et al.*, 2016). Em contrapartida, a HIP é ativadora da atividade ATPásica da Hsp70, pois sua interação com essa chaperona promove a estabilização da conformação ligada ao ADP (conformação fechada). Considerando isto, definir o efeito da LbSGT sobre a atividade ATPásica da Hsp70 e Hsp90 será necessário para melhor delinear o papel desta interessante co-chaperona no sistema *foldossoma*.

3. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostram que:

- A LbSGT, as hSGT e a ySGT compartilham um baixo grau de conservação e alta similaridade. No entanto, o domínio TPR dessas proteínas ortólogas possuem alto grau de conservação e alto grau de similaridade, sugerindo que as proteínas ortólogas interagem com Hsp90 e Hsp70 por meio do mesmo domínio (TPR), porém com algumas peculiaridades.
- A LbSGT recombinante foi expressa nas condições apresentadas. Após dois passos cromatográficos a proteína alvo foi obtida com grau de pureza superior a 95%;
- A LbSGT é formada majoritariamente por estruturas secundárias do tipo hélices α , apresentando assinatura espectral por dicroísmo circular típica de co-chaperonas com domínio TPR;
- A LbSGT se comporta como um dímero alongado e existe como apenas uma espécie em solução;
- A LbSGT é uma proteína modular. Seus domínios apresentam estabilidades química e térmica distintas, comportamento observado para a maioria das chaperonas multidomínios;
- A LbSGT é uma proteína cognata que é expressa constitutivamente em células promastigotas de *Leishmania braziliensis*;
- A LbSGT tem mais afinidade pela LbHsp90 e pela Hsp70-1A (usada como proteína modelo das Hsp70) do que pelo peptídeo MEEVD, sugerindo que outras regiões das proteínas completas estão envolvidas na interação;
- A presença de nucleotídeos e íon magnésio não alterou significativamente a afinidade da LbSGT pela LbHsp90 e pela Hsp70-1A;
- A LbSGT é estruturalmente semelhante à LbHIP, visto que ambas se comportam como dímeros alongados em solução e possuem organização estrutural similar;
- A LbSGT é funcionalmente semelhante à LbHOP, pois ambas possuem os aminoácidos requeridos para a interação com as regiões C-terminais da Hsp90 e Hsp70 via formação do grampo de dicarboxilato. Além disso, LbSGT e LbHOP interagem com a LbHsp90 com K_{Ds} de mesma ordem de grandeza.

4. REFERÊNCIAS

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548> >.

ANGELETTI, P. C.; WALKER, D.; PANGANIBAN, A. T. Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. **Cell Stress Chaperones**, v. 7, n. 3, p. 258-68, Jul 2002. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482202> >.

ARNDT, V.; ROGON, C.; HOHFELD, J. To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 19-20, p. 2525-41, Oct 2007. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565442> >.

ASHRAF, G. M. et al. Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 7, p. 1280-93, 2014. ISSN 1996-3181. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25230234> >.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan 2010. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843604> >.

BATISTA, F. A. et al. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **FEBS J**, v. 282, n. 2, p. 388-406, Jan 2015. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369258> >.

_____. Low sequence identity but high structural and functional conservation: The case of Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop/Sti1) of *Leishmania braziliensis*. **Arch Biochem Biophys**, v. 600, p. 12-22, Apr 2016. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27103305> >.

BATISTA, F. A. H. et al. From conformation to interaction: techniques to explore the Hsp70/Hsp90 network. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 16, n. 8, p. 735-753, 2015.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? **Cell Microbiol**, v. 13, n. 11, p. 1659-67, Nov 2011. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819514> >.

BIAMONTE, M. A. et al. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. **J Med Chem**, v. 53, n. 1, p. 3-17, Jan 14 2010. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055425> >.

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: < <http://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 2006. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806043> >.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. 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, 2006. ISSN 0003-9861. Disponível em: < ISI:000239570800006 >.

_____. Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. **BMB Rep.**, v. 42, n. 3, p. 166-171, 2009. ISSN 1976-6696. Disponível em: < ISI:000264839200008 >.

BORGES, J. C. et al. A review of multi-domain and flexible molecular chaperones studies by small-angle X-ray scattering. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, 2016. ISSN 2.

BOZAYKUT, P.; OZER, N. K.; KARADEMIR, B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 77, p. 195-209, Dec 2014. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236750> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003923> >.

BUCHANAN, G. et al. Control of androgen receptor signaling in prostate cancer by the cochaperone small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha. **Cancer Res**, v. 67, n. 20, p. 10087-96, Oct 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942943> >.

BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Eng**, v. 5, n. 3, p. 191-5, Apr 1992. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409538> >.

CANO, L. Q.; LAVERY, D. N.; BEVAN, C. L. Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v. 369, n. 1-2, p. 52-62, Apr 30 2013. ISSN 1872-8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395916> >.

CANUTO, G. A. et al. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**, Jun 2015. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26095472> >.

CAPLAN, A. J. What is a co-chaperone? **Cell Stress Chaperones**, v. 8, n. 2, p. 105-7, 2003. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627194> >.

CHAI, Y. et al. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. **J Neurosci**, v. 19, n. 23, p. 10338-47, Dec 1999. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575031> >.

CONNELL, P. et al. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 93-6, Jan 2001. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146632> >.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1478-83, Oct 2011. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933306> >.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic 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> >.

DEMAND, J.; LÜDERS, J.; HÖHFELD, J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 4, p. 2023-8, Apr 1998. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528774> >.

DORES-SILVA, P. R. et al. Low resolution structural characterization of the Hsp70-interacting protein - Hip - from Leishmania braziliensis emphasizes its high asymmetry. **Arch Biochem Biophys**, v. 520, n. 2, p. 88-98, Apr 2012. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387434> >.

DUNKER, A. K. et al. Function and structure of inherently disordered proteins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 18, n. 6, p. 756-64, Dec 2008. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952168> >.

FINK, A. L. Natively unfolded proteins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 15, n. 1, p. 35-41, Feb 2005. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718131> >.

FONTE, V. et al. Interaction of intracellular beta amyloid peptide with chaperone proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 14, p. 9439-44, Jul 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089340> >.

FORGET, K. J.; TREMBLAY, G.; ROUCOU, X. p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69242, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844254> >.

GAVA, L. M. et al. Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the C-terminus of human 90kDa heat shock protein Hsp90 and the mitochondrial translocase of outer membrane Tom70. **Arch Biochem Biophys**, v. 513, n. 2, p. 119-25, Sep 2011. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781956> >.

GODING, J. W. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. **J Immunol Methods**, v. 13, n. 3-4, p. 215-26, 1976. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/796385> >.

GONG, H. et al. Amyloidogenicity of p53: a hidden link between protein misfolding and cancer. **Curr Protein Pept Sci**, v. 16, n. 2, p. 135-46, 2015. ISSN 1875-5550 (Electronic) 1389-2037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692950> >.

HAINZL, O. et al. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 34, p. 22559-67, Aug 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553666> >.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-8, Mar 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884745> >.

HIRANO, T. et al. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. **Cell**, v. 60, n. 2, p. 319-28, Jan 1990. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2297790> >.

HOHFELD, J.; MINAMI, Y.; HARTL, F. U. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. **Cell**, v. 83, n. 4, p. 589-98, Nov 17 1995. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585962> >.

IRMER, H.; HÖHFELD, J. Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. **J Biol Chem**, v. 272, n. 4, p. 2230-5, Jan 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8999928> >.

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> >.

KONAREV, P. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 1277-1282, OCT 2003 2003. ISSN 0021-8898.

KRUKENBERG, K. A. et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. **Q Rev Biophys**, v. 44, n. 2, p. 229-55, May 2011. ISSN 1469-8994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414251> >.

LAEMMLI, U. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970 1970. ISSN 0028-0836.

LI, J. et al. Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 3, p. 326-31, Mar 2013. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396352> >.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-35, Mar 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951723> >.

LI, Z.; HARTL, F. U.; BRACHER, A. Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 8, p. 929-35, Aug 2013. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812373> >.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-53, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893976> >.

LIU, S. T.; CHENG, M. Y.; WANG, C. SGT2 and MDY2 interact with molecular chaperone YDJ1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 1, p. 59-70, 2007. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17441508> >.

LIU, S. T.; WANG, C. Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions. **Arch Biochem Biophys**, v. 435, n. 2, p. 253-63, Mar 2005. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708368> >.

LIU, F. H. et al. Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 34425-32, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567422> >.

MAYER, M. P. et al. Hsp70 chaperone machines. **Adv Protein Chem**, v. 59, p. 1-44, 2001. ISSN 0065-3233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11868269> >.

MEYER, P. et al. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. **Mol Cell**, v. 11, n. 3, p. 647-58, Mar 2003. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667448> >.

MICKLER, M. et al. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 281-286, Mar 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263906000010 >.

NOLLEN, E. A. et al. Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 4677-82, Feb 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076956> >.

OMMEN, G.; CHROBAK, M.; CLOS, J. The co-chaperone SGT of Leishmania donovani is essential for the parasite's viability. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, n. 4, p. 443-55, Jul 2010. ISSN 1466-1268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953351> >.

ORTEGA, A.; AMORÓS, D.; GARCÍA DE LA TORRE, J. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. **Biophys J**, v. 101, n. 4, p. 892-8, Aug 2011. ISSN 1542-0086. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843480> >.

PALLAVI, R. et al. Chaperone expression profiles correlate with distinct physiological states of Plasmodium falciparum in malaria patients. **Malar J**, v. 9, p. 236, 2010. ISSN 1475-2875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719001> >.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 271-94, 2006. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756493> >.

PHILP, L. K. et al. SGTA: a new player in the molecular co-chaperone game. **Horm Cancer**, v. 4, n. 6, p. 343-57, Dec 2013. ISSN 1868-8500. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818240> >.

PRAPAPANICH, V. et al. Molecular cloning of human p48, a transient component of progesterone receptor complexes and an Hsp70-binding protein. **Mol Endocrinol**, v. 10, n. 4, p. 420-31, Apr 1996. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721986> >.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 2, p. 111-33, Feb 2003. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563018> >.

RAFATI, S. et al. Building Research and Development Capacity for Neglected Tropical Diseases Impacting Leishmaniasis in the Middle East and North Africa: A Case Study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e0003695, Aug 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26313269> >.

RATZKE, C.; BERKEMEIER, F.; HUGEL, T. Heat shock protein 90's mechanochemical cycle is dominated by thermal fluctuations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 1, p. 161-166, Jan 3 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298876500036 >.

RÜDIGER, S. et al. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. **EMBO J**, v. 16, n. 7, p. 1501-7, Apr 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130695> >.

RÜDIGER, S.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. **EMBO J**, v. 20, n. 5, p. 1042-50, Mar 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230128> >.

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> >.

SCHANTL, J. A. et al. Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT) interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis (UbE) motif of the growth hormone receptor. **Biochem J**, v. 373, n. Pt 3, p. 855-63, Aug 2003. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12735788> >.

SCHEUFLER, C. et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 199-210, Apr 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786835> >.

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> >.

SEIDEL, S. A. et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 301-15, Mar 2013. ISSN 1095-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270813> >.

SEMENYUK, A. V. S.; D.I., S. *GNOM* - a program package for small-angle scattering data processing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 5, p. 537--540, 1991. Disponível em: < <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S002188989100081X> >.

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. e66822, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826147> >.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. 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**: Springer New York, v.1, 2014. cap. 17, p.445-481. (Interactomics and Systems Biology). ISBN 978-1-4939-1129-5.

SHONHAI, A. et al. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 2, p. 143-57, Feb 2011. ISSN 1875-5305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955165> >.

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> >.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 1, p. 351-61, Jan 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910377> >.

SMITH, H. L.; LI, W.; CHEETHAM, M. E. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 40, p. 142-52, Apr 2015. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770416> >.

SOUTHWORTH, D. R.; AGARD, D. A. Species-Dependent Ensembles of Conserved Conformational States Define the Hsp90 Chaperone ATPase Cycle. **Molecular Cell**, v. 32, n. 5, p. 631-640, Dec 5 2008. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261539700005 >.

STRAVOPODIS, D. J.; MARGARITIS, L. H.; VOUTSINAS, G. E. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 29, p. 3122-38, 2007. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220746> >.

SVERGUN, D. I. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p. 495-503, Aug 1 1992. ISSN 0021-8898. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JH63000005 >.

_____. 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> >.

THE, T. H.; FELTKAMP, T. E. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. **Immunology**, v. 18, n. 6, p. 865-73, Jun 1970a. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5310665> >.

_____. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II. A reproducible method. **Immunology**, v. 18, n. 6, p. 875-81, Jun 1970b. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4913804> >.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 2, p. 101-9, Feb 2011. ISSN 1875-5305 (Electronic)

0929-8665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121892> >.

TOBABEN, S. et al. A brain-specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein binds to Hsc70 and the cysteine string protein. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38376-83, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878599> >.

VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 3 Part 1, p. 860--864, 2003. Disponível em: < <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889803000268> >.

WANG, H. et al. Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells. **FEBS Lett**, v. 579, n. 5, p. 1279-84, Feb 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710426> >.

WANG, X. et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 803-15, Nov 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110338> >.

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

WEGELE, H.; MULLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 151, p. 1-44, 2004. ISSN 0303-4240 (Print)

0303-4240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740253> >.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 151, p. 1-44, 2004. ISSN 0303-4240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740253> >.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, May 2008. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896349> >.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-16, Nov 2001a. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694568> >.

_____. The heat shock protein 90 of Leishmania donovani. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, n. 1-2, p. 27-31, Nov 2001b. ISSN 0300-8584 (Print)

0300-8584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770104> >.

WINNEFELD, M. et al. Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 13, p. 2500-14, Aug 2006. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777091> >.

WORRALL, L. J. et al. Cloning, purification and characterization of the Caenorhabditis elegans small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, n. 3, p. 496-503, Mar 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187053> >.

YIN, H. et al. SGT, a Hsp90beta binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, n. 4, p. 1153-8, May 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16580629> >.

YOUNG, J. C.; HOOGENRAAD, N. J.; HARTL, F. U. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. **Cell**, v. 112, n. 1, p. 41-50, 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < ISI:000181191500005 >.

ZHU, X. et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1606-14, Jun 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658133> >.