UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

ESTUDOS DA CHAPERONA MOLECULAR HSP70
MITOCONDRIAL HUMANA – MORTALINA: ELUCIDANDO
ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS

Paulo Roberto das Dores da Silva

São Carlos,
2015

PAULO ROBERTO DAS DORES DA SILVA

**ESTUDOS DA CHAPERONA MOLECULAR HSP70 MITOCONDRIAL
HUMANA – MORTALINA: ELUCIDANDO ASPECTOS ESTRUTURAIS
E FUNCIONAIS**

*TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DE
SÃO CARLOS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS*

Área de concentração: Química Orgânica e Biológicas

ORIENTADOR: JÚLIO CÉSAR BORGES

SÃO CARLOS

2015

“Dedico esta tese ao meu escudo intransponível, àquela que chorou minhas lágrimas e sonhou meus sonhos, à pessoa que derramou gotas de sangue para cada gota de suor que suei.

Há muito, erroneamente, acreditei que havia deixado de lado os próprios sonhos para sonhar os nossos, talvez, hoje eu entenda, pelo menos um pouco, que seus únicos sonhos sempre fomos nós três. À minha melhor AMIGA, CONSELHEIRA e HEROÍNA, ao anjo com o qual Deus me abençoou: MINHA MÃE”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado. Com destaque a todos os professores que ao longo destes anos dispensaram tempo e dedicação para que minha formação fosse a melhor possível e, em especial:

Ao Prof^o Dr. **Júlio César Borges** pelo apoio, confiança, dedicação, e principalmente paciência que tem dispensado a mim, desde o início de meu trabalho de doutorado em seu laboratório até os dias atuais. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Espero um dia ser um profissional com um nível próximo ao seu;

À Prof^a Dr^a. **Lisandra** pela ajuda quando precisei, pelo incentivo e momentos de descontração durante esse tempo de convívio. PS: Não quero mais tentar achar a Anhanguera (risos);

Ao Prof^o Dr. **Leandro Barbosa** do IF de São Paulo, por tudo que me ensinou sobre a técnica de SAXS. Obrigado pelo tempo disposto a mim ao longo destes anos;

Ao Prof^o Dr. **Carlos Ramos** do IQ da UNICAMP em Campinas por disponibilizar seu laboratório sempre que necessário;

A Prof^a Dr^a **Rosângela Itri** pela contribuição a este trabalho cedendo muitas vezes uma parte de seu tempo de SAXS no LNLS para que eu pudesse realizar alguns experimentos;

Como não agradecer minha grande amiga Prof^a Dr^a. **Maria Olímpia de Oliveira Rezende**, responsável por me inserir no meio acadêmico e com quem muito aprendi durante minha IC, TODAS AS PALAVRAS QUE EU PUDESSE UTILIZAR SERIAM POUCAS PARA LHE AGRADECER POR TUDO, muito obrigado.

Às técnicas do lab que muito me ajudaram, **Camila** que no início teve muita paciência me passando protocolos e me ensinando a utilizar os equipamentos, e posteriormente, a minha eterna amiga e companheira de trabalho, **Juliana Tamara**, muito trabalho e muitas risadas nos momentos do “lanche”.

À **Marcella** que com seu brilho todo singular tornou o trabalho e os dias no laboratório especiais e descontraídos. Muito obrigado amiga por ter feito parte dessa jornada;

Como não agradecer ao **Thiago Seraphim**, companheiro de início e final de jornada, pelas longas noites na linha de luz do LNLS, ou pelas noites sanitizando as colunas de cromatografia, ou purificando proteínas, tratando e apreendendo a interpretar os dados de SAXS... É meu amigo o tempo passou rápido e cheguei ao final da estrada (com bem menos

cabelo, diga-se de passagem), lembra-se como costumávamos divagar sobre isso e filosofar tentando entender como seria, então ainda não vejo a luz ao final do Túnel! Agradeço muito sua amizade e colaboração;

Meu agradecimento especial a cinco meninas que tive a oportunidade de acompanhar, auxiliar, **Érika, Karine, Beatriz, Dayane e Letícia**, em especial a **Karine** que começou a trabalhar comigo logo no início de meu doutorado e por quem ao longo dos anos adquiri um carinho quase paternal. Espero que vocês tenham aprendido algo comigo como muito aprendi com vocês;

A **Amanda** por ter se tornado uma grande amiga e conselheira, me aguentar quando algo da errado não é fácil e você conseguiu fazê-lo com maestria, meu muito obrigado por tudo;

A **Kelly**, pela companhia e ajuda nos momentos de dificuldade, agradeço pelo convívio, é amiga já passaram os 3 anos (risos);

À todos que passaram pelo grupo e com quem tive a oportunidade de trabalhar, companheiros do início e final de jornada, **Sábrina, Nathalia, Vandinha, Edvan, Fernanda, Lilian, Carol, Paula, Camila, Laís**, e em especial ao meu amigo **Glessler**, muitas conversas e divagações ao longo desses anos, pessoas especiais e a quem guardo muito carinho e apreço;

Agradeço ao **Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNLS)** e ao **Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)**, ambos do **Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM)**, em Campinas, pela estrutura oferecida para a realização de grande parte dos experimentos;

À central de análises químicas do instituto de química de São Carlos CAQI/IQSC pela infra estrutura disponibilizada;

Aos órgãos financiadores **CNPq** pela bolsa concedida e **FAPESP** pelo financiamento dos experimentos e do projeto;

À minha mãe *Dona* **Terezinha**, que tem me guiado durante toda a vida, meu farol e porto seguro, quem me apoia em minhas decisões e oferece todo o carinho que apenas PAIS poderiam oferecer;

Aos meus amados irmãos **Alexandra e Éder** e a meus sobrinhos **Tatiana e Euclides neto**;

Ao **Rodrigo Vida** por suportar meu bipolarismo ao longo dessa jornada, eu sei que sou muito difícil de lidar, obrigado por estar ao meu lado durante esse percurso;

A meus amados Tios **Garcia e Leda** que me adotaram não como sobrinho, mas como filho, pessoas responsáveis em grande parte pela minha formação durante a adolescência e até

os dias atuais e que eu muito admiro e AMO, não tenho palavras para descrever o quão importantes vocês são para mim;

Aos meus amigos, **Stefane, Jean, André, Gustavo, Ronaldo, Fernando, Daniel, Mônica, Rosa, João, Diego, Renan, Kelly, Marcello, Rafael, Cyntia, Cíntia, Guilherme (Guerço), Érique (EMO), Junia, Pimpão, Fernanda Beneti, Indjara, Tamires, Priscila, Roseli, Jéssica, Bia, Julia** e tantos outros a quem tenho muito carinho. Agradeço e me DESCULPO pelas inúmeras vezes que tive que negar algum programa com vocês para priorizar meu trabalho, perdoem-me pelo meu egoísmo;

Em especial a **Maria da Conceição Dunk**, (PIA) sem a ajuda da qual nunca teria ingressado em um curso universitário, muito obrigado por acreditar em mim e fazer sacrifícios para que eu chegasse nesse ponto, espero de coração ter merecido e aproveitado tudo o que fez por mim e minha família ao longo de minha vida, sem dúvida um anjo com o qual fomos agraciados;

Agradeço ao programa de pós graduação do IQSC, pelo suporte e ajuda durante o doutorado, em especial a **Silvia, Andreia e Gustavo**;

As meninas da secretaria, **Claudinha, Verô e Gislei**, muito obrigado por serem tão maravilhosas comigo;

E, finalmente, agradeço a **DEUS** por estar ao meu lado e me presentear com pessoas tão maravilhosas ao longo de minha vida.

*“Porque Deus há de trazer a juízo toda a obra, e até tudo o
que está encoberto, quer seja bom, quer seja mau”*

Eclesiastes 12:14

RESUMO

A Hsp70 mitocondrial humana (mtHsp70 ou mortalina) está envolvida em diversos processos celulares: na matriz mitocondrial atua na importação de proteínas produzidas no citoplasma; no citoplasma, pode atuar sequestrando a p53, estando assim envolvida na proliferação de alguns tipos de câncer. A literatura ainda aponta que a mortalina participa na manutenção de várias doenças causadas pelo envelhecimento, como mal de Parkinson e de Alzheimer. Desse modo, o estudo estrutural e a investigação das principais funções da mortalina *in vivo e in vitro*, além de sua interação com outras chaperonas e co-chaperonas é de grande relevância científica, podendo proporcionar um maior entendimento de seu papel celular e da maquinaria bioquímica nas doenças onde ela está inserida. Apesar de ser conhecida há bastante tempo, as tentativas de expressão heteróloga da mortalina recombinante resultam na sua produção na forma insolúvel, inviabilizando estudos estruturais e funcionais *in vitro*. Assim, as informações estruturais e funcionais desta proteína permaneceram limitadas até então. Em 2005, foi descrita uma co-chaperona da mortalina que atua auxiliando o seu enovelamento correto e em sua manutenção na fração solúvel, esta proteína mitocondrial foi denominada de hHep1 (*Hsp70-escort protein 1*) e por meio de sua co-expressão com a mortalina foi possível obter esta última na sua forma monomérica, solúvel e estável. Isso possibilitou realizar ensaios de caracterização estrutural e funcional da mortalina, sendo o foco principal deste trabalho de doutorado. Os resultados obtidos sugerem que a mortalina se apresenta como um monômero ligeiramente alongado em solução, sendo formada por 2 domínios com estabilidades distintas. Os ensaios funcionais revelaram uma constante de dissociação (K_D) para interação com nucleotídeos adenosina da ordem de 1 μM . A mortalina apresenta atividade ATPásica com valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M da ordem de 0,21 pmol de ATP por min e $190 \pm 20 \mu\text{M}$, respectivamente. Este trabalho é pioneiro na caracterização estrutural e funcional da mortalina humana e espera-se que estudos posteriores, elucidem mais detalhadamente os mecanismos de interação da mortalina com proteínas clientes nos diversos compartimentos celulares onde ela atua.

ABSTRACT

The human mitochondrial Hsp70 (mtHsp70 or mortalin) is involved in many cellular processes: in the mitochondrion matrix, mortalin acts in the process of protein importation from cytoplasm; in the cytoplasm may act by sequestering p53, protein involved in the proliferation of some kinds of cancer. The literature also shows that mortalin participates in the maintenance of various diseases caused by aging, such as Parkinson's and Alzheimer's. Thus, the structural study and research of the main functions of mortalin *in vivo* and *in vitro*, and its interaction with other chaperones and co-chaperones is of great scientific importance and may provide a greater understanding of their role and cellular biochemical machinery in diseases where it is inserted. Despite being known for a long time, the expression of heterologous mortalin resulted in an insoluble form of the protein, which precludes its *in vitro* structural and functional studies. Thus, structural and functional information of this protein, along with its interaction with chaperones, co-chaperones and client proteins, remained unknown. By 2005, it was described co-chaperone that acts on mortalin helping its correct folding and its maintenance in the soluble fraction, this mitochondrial protein was called hHep1 (Hsp70-escort protein 1) and through its co-expression with mortalin it was possible to obtain the recombinant mortalin in its monomeric, soluble and stable. With this protein, it was possible to perform tests of structural and functional characterization of recombinant mortalin, the main focus of this doctoral work. The results suggest that mortalin behaves as a slightly elongated monomer in solution, formed by two domains with different stabilities. Functional assays showed that the dissociation constant for interaction with adenosine nucleotide of the order of 1 μM . Mortalin has ATPase activity with V_{max} and K_{M} values of 0.21 pmol ATP per min and $190 \pm 20 \mu\text{M}$, respectively. It is expected that these results provide information for further studies, such as for elucidating the mechanisms that mortalin interacts with client proteins in various cellular compartments in which it operates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -Domínios estruturais das Hsp70 e seus subdomínios.....	9
Figura 1.2 – Ciclo esquematizando a atividade ATPásica das Hsp70.....	11
Figura 1.3 – Múltiplas funções e múltiplas localizações da mortalina.....	13
Figura 1.4 – Rede de interação de proteínas, funcional ou quimicamente, relacionadas à mortalina (gene HSPA9 em humanos).....	15
Figura 1.5 – Modelo para o enovelamento da mtHsp70.....	18
Figura 4.1 A hHep1 foi eficaz na solubilização da mortalina humana recombinante.....	33
Figura 4.2 – Gel de SDS-PAGE 12% para a expressão, indução e purificação da mortalina na presença e na ausência da hHep1.....	34
Figura 4.3 – Cromatografia de exclusão molecular (CEMa).....	35
Figura 4.4 – Espectros de CD e Fluorescência.....	37
Figura 4.5 – Mortalina se comporta como um monômero alongado em solução.....	39
Figura 4.6 – Dados de SAXS para a mortalina.....	40
Figura 4.7 – Modelo <i>ab initio</i> para a mortalina.....	43
Figura 4.8 - Percentagem de conformação aberta e fechada da mortalina em solução.....	44
Figura 4.9 – Curvas p(r) na presença de ADP-Mg ²⁺ e ATP-Mg ²⁺	46
Figura 4.10 - Espectros de CD e fluorescência para a mortalina na presença e ausência de nucleotídeos de adenosina e Mg ²⁺	47
Figura 4.11 – Estabilidade química e térmica.....	49
Figura 4.12 – Perfil de eluição da mortalina antes e após o processo de concentração.....	52
Figura 4.13 – Interação da mortalina com nucleotídeos de adenosina.....	53
Figura 4.14 – Atividade ATPase da mortalina.....	55
Figura 4.15 – Atividade chaperona da mortalina.....	58
Figura 4.16 – Perfil de Agregação da mortalina em diferentes temperaturas e concentrações.....	60
Figura 4.17 – Constantes cinéticas de reação de primeira ordem para a agregação da mortalina.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Sumário das principais Hsps: localização na célula, funções e aumento no nível de expressão quando submetida a stress.....	6
Tabela 1.2 - Proteínas que interagem com a mortalina e suas respectivas funções.....	14
Tabela 4.1 - Propriedades Hidrodinâmicas previstas, obtidas experimentalmente e calculadas para o modelo ab initio proposto por SAXS.	41
Tabela 4.2 - Alterações conformacionais da mortalina devido a adição de nucleotídeos de adenosina, na presença e na ausência do co-fator Mg^{2+}	45
Tabela 4.3 - Sumário das Tms das transições determinadas para a mortalina por CD222 nm na presença de nucleótidos de adenosina e/ou Mg^{2+}	50
Tabela 4.4 - Determinação das constantes cinéticas para a mortalina humana e Hsp70-1A humana comparadas com dados apresentados na literatura para outras Hsp70 homologas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ : coeficiente de extinção molar;
 λ : Comprimento de onda;
 λ_{max} : Comprimento de onda máximo;
 $[\Theta]$: elipticidade molar residual;
 $\langle\lambda\rangle$: Centro de massa espectral;
 Σ : Somatório;
 μg : Micrograma (10^{-6} gramas);
 μL : Microlitros (10^{-6} Litros);
 μM : Micromolar (10^{-6} molar);
A: leitura de absorbância;
ADP: Adenosina difosfato;
ATP: Adenosina trifosfato;
AUC: Analytical ultracentrifugation;
BSA: Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin);
CD: circular dichroism;
CEM: Cromatografia de exclusão molecular;
cm: Centímetros;
Cm: Concentração média de transição;
CNPEM: Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais;
D.O.: Densidade óptica;
 $D_{\text{máx}}$: distância máxima;
DNA: Deoxyribonucleic acid;
DSC: differential scanning calorimetry;
E. coli: *Escherichia coli*;
 f/f_0 : Razão friccional;
g: gramas;
Gdn-HCl: cloridrato de guanidina;
Hep1: Hsp70-escort protein (proteína de “escolta” da Hsp70);
HSP: Heat shock protein (proteína de choque térmico);
IPTG: *Isopropyl β -D-1-thiogalactopuranside*;
ITC: Calorimetria de Titulação Isotérmica;

K_A: constante de associação;

K_D: Constante de dissociação;

kDa: QuiloDalton;

K_M: Constante de Michaelis-Menten;

LB: Lysogeny Broth;

LNBio: Laboratório Nacional de Biociências;

m/v: massa volume;

M: Molar;

MESG: 2-amino-6-mercaptop-7metilpurina ribosídeo;

min: Minutos;

mL: Mililitro;

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

MM: Massa Molecular;

MM_{app}: Massa molecular aparente;

°C: Graus Celcius;

p(r): função de distribuição de distâncias;

PDB: banco de dados de estrutura em alta resolução de proteínas (Protein Data Bank);

pH: Pontencial Hidrogeniônico;

Pi: Fosfato Inorgânico;

PNP: Purina nucleosídeo fosforilase;

q: ângulo de espalhamento;

R_g: Radius of gyration;

rpm: Rotações por minuto;

R_s: Raio de Stokes;

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*;

***s*_{0,20,w}**: standard sedimentation coefficient at 0 mg mL⁻¹ of protein;

***s*_{20,w}**: sedimentation coefficient at standard conditions;

SAXS: small angle X-ray scattering;

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;

TKP: Tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 50 mM, KCl 5 mM, Na₃PO₄ 5 mM e 1 mM de β-mercaptoetanol;

Tm: Temperatura média de transição;

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano;

Tris-HCl: Tris hidrocloreto;
u.a.: Unidade arbitrária;
V: Volume;
V₀: Volume da fase móvel;
V_{bar}: Volume parcial específico;
V_e: Volume de eluição da proteína;
V_{max}: velocidade máxima;
V_t: Volume total;
ΔG: Variação de energia livre de Gibbs;
ΔH: Variação de entalpia;
ΔS: Variação de entropia;
Θ = Elipticidade em graus;
ρ: densidade eletrônica;
IF : Intensidade de fluorescência;
λ : Comprimento de onda.

LISTA DE SÍMBOLOS

Å: Angstrom (10^{-6} metros)
α: Alfa;
β: Beta;
Δ: Delta;
ε: Épsilon;
θ: Tetha;
λ: Lambda.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
1.1 Chaperonas Moleculares (Heat Shock Protein)	1
1.2 As Hsp70: Fundamentos Estruturais e Funcionais	6
1.2.1 Afinidade a Proteínas Clientes ou Peptídeo Substrato	7
1.2.2 Domínio de Ligação de nucleotídeos adenosina.....	7
1.2.3 Domínio de Ligação de peptídeos/proteínas	7
1.2.4 Atividade ATPásica das Hsp70	8
1.3 Co-chaperonas da Hsp70: Modulares e Mediadoras	9
1.4 Mortalina: A Hsp70 mitocondrial	10
1.4.1 Mortalina: uma proteína multifuncional	11
1.5 Hsp70 escort Protein (Hep1)	16
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 Material e Métodos	20
3.1 Expressão e Purificação da Mortalina	20
3.2 Estudos biofísicos: Caracterização Estrutural	20
3.2.1 Determinação da Concentração da Proteína	20
3.2.2 Dicroísmo Circular: Estrutura Secundária, Efeitos da presença de Nucleotídeos Adenosina, Estabilidade Química e Térmica	21
3.2.3 Fluorescência Intrínseca do Triptofano: Estrutura Terciária, Estabilidade Química e Térmica	22
3.2.4 Cromatografia de exclusão molecular analítica: Determinação da massa molecular aparente e raio de Stokes	23
3.2.5 Ultracentrifugação analítica	24
3.2.6 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	25
3.3 Ensaios Funcionais.....	27
3.3.1 Calorimetria de titulação isotérmica	27
3.3.2 Atividade ATPásica	28
3.3.3 Atividade chaperona da mortalina	29
3.3.4 Cinética de Agregação da mortalina.....	29

4 Resultados.....	30
4.1 Indução, Expressão e Purificação da Mortalina.....	30
4.2 Avaliação da presença de estruturas secundária e terciária	33
4.3 Ensaios Hidrodinâmicos.....	35
4.4 Espalhamento de Raios-X a baixo Ângulo e Modelagem	37
4.5 Alterações da estrutura secundária e terciária da mortalina devido à presença nucleotídeos de adenosina	44
4.6 Investigando a estabilidade da mortalina.....	45
4.7 Interações com nucleotídeos de adenosina ATP e ADP	49
4.8 Determinação da atividade ATPase.....	52
4.9 DETERMINAÇÕES DA ATIVIDADE CHAPERONA DA MORTALINA SOBRE A LUCIFERASE	55
4.10 Ensaio de auto-agregação da mortalina em diferentes temperaturas e diferentes concentrações	56
5 Conclusões.....	62
6 Publicações em periódicos científicos referentes ao doutorado:.....	64
6.1 Artigos científicos em preparação referentes ao doutorado:.....	64
7 Referências.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Chaperonas Moleculares (Heat Shock Protein)

A atividade biológica das proteínas está relacionada com a estrutura 3D que as mesmas são capazes de obter no meio solúvel. Há cerca de 60 anos, CHRISTIAN ANFINSEN demonstrou que a estrutura terciária das proteínas esta codificada em sua sequencia de aminoácidos (ANFINSEN et al., 1955, DEUERLING E BUKAU, 2004), e este processo de enovelamento, onde uma proteína recém-sintetizada adquire sua estrutura nativa recebe o nome de enovelamento proteico. Por meio de testes de desnaturação química, Anfinsen observou que proteínas poderiam readquirir sua estrutura nativa quando fossem submetidas a um ambiente livre do agente desnaturante, ou em concentrações muito diluídas do mesmo (ANFINSEN et al., 1955, DOBSON E KARPLUS, 1999). No entanto, o enovelamento proteico em um ambiente celular apresenta muitas peculiaridades, sendo assim, o sistema de enovelamento observado por Anfinsen se distancia do sistema de enovelamento celular, não representando as complicações encontradas *in vivo* para que as proteínas atinjam seu estado estrutural nativo de maneira adequada.

Dentre essas complicações, há de se ressaltar diversos fatores que são, responsáveis pelo enovelamento correto das proteínas, tais como: força iônica do meio, pH, presença de pontes de dissulfeto, etc.. Deve-se ainda considerar as altas concentrações de macro-moléculas (tais como: proteínas, lipídios e ácidos nucléicos) que estão presentes nas células, podendo algumas dessas biomoléculas interagir umas com as outras em condições não adequadas, como em soluções de elevada concentração ou em condições de desnaturação (como uma variação abrupta na temperatura, pH, etc.). Esses fatores podem levar às proteínas a obterem estruturas que se distanciam da estrutura nativa, tais como: proteínas mal enoveladas, agregados proteicos e agregados amilóides. Tais interações fazem com que as proteínas tendam a agregar e precipitar tanto *in vivo* quanto *in vitro* (JAENICKEET et al., 1999; BEISSINGER E BUCHNER, 1998; ELLIS, 2001). Os agregados proteicos podem, por muitas vezes, representar um perigo para a homeostase celular, devido a um caráter tóxico que apresentam no ambiente onde estão inseridos (CHAUDHURI E PAUL, 2006; TRZESNIEWSHA et al., 2004).

A formação de agregados proteicos ou o aparecimento de proteínas enoveladas incorretamente podem estar relacionados com algumas doenças humanas, tais como: mal de Alzheimer, mal de Parkinson, doença de Creutzfeld-Jacob (príon), fibrose cística, alguns tipos

de câncer, entre outras (RUDDON e BEDOWS, 1997; BEISSINGER e BUCHNER, 1998; CHAI et al., 1999; HARTL e HAYER-HARTL, 2002; WIDODO et al., 2007). Os agregados proteicos podem se formar dentro das células ou em tecidos causando danos aos órgãos ao ativar resposta inflamatória, por exemplo. Neste sentido um dos pontos principais é como prevenir tais patologias e em casos onde a prevenção não seja possível, como reverter a agregação proteica.

Em contraste com a situação *in vitro*, todas as proteínas têm de enovelar-se sob o mesmo conjunto de condições de uma célula viva. Estas condições parecem ser contraproducentes para o enovelamento eficiente. Avaliando todas as miríades de condições químicas, físicas e físico-químicas, encontradas no meio celular parece surpreendente que as células são, geralmente, desprovidas de agregados proteicos. Neste caso, WALTER e BUCHNER (2002) apresenta duas explicações possíveis para essa observação: em primeiro lugar, pode-se considerar que a agregação proteica ocorre *in vivo* naturalmente, mas os seus produtos são rapidamente removidos por proteases celulares. Isto implicaria que as células teriam de desperdiçar uma grande quantidade de energia, para a produção de tais proteínas, que em suma, nunca iriam tornar-se funcionais. A segunda hipótese levaria em consideração que as células teriam encontrado uma estratégia para minimizar a agregação de proteínas recém-sintetizadas.

A segunda hipótese é a confirmada, e isso foi conseguido pela evolução por meio da seleção de uma complexa maquinaria proteica: as chaperonas moleculares (chaperonas: palavra derivada do francês que significa: damas de companhia ou acompanhantes), que atuam diretamente na reação espontânea de enovelamento de proteínas, prevenindo, assim, a agregação.

É importante notar que estas chaperonas moleculares não fornecem informações estéricas específicas para o enovelamento da proteína alvo, mas sim inibem interações inter e intra-moleculares ligando-se a regiões hidrofóbicas das proteínas não nativas e, assim, permitindo que a proteína se enovele de forma mais eficiente, obtendo sua estrutura nativa (WALTER e BUCHNER, 2002). Deve-se ressaltar ainda que as chaperonas moleculares não são parte das estruturas finais das proteínas enoveladas. Em vez disso, as proteínas cliente são liberadas a partir de suas chaperonas, proporcionando, assim, as proteínas não nativas, uma nova oportunidade para um enovelamento profícuo (BUCHNER, 1996; BUKAU e HORWICH, 1998; ELLIS e HARTL, 1999; WALTER e BUCHNER, 2002) ou o encaminhamento para a degradação.

As chaperonas moleculares podem também ser conhecidas com o nome de proteínas de choque térmico ou HSPs, do inglês: “Heat Shock Proteins”. Os primeiros relatos do sistema Hsps datam de 1962, quando o então geneticista italiano FERRUCCIO RITOSSA observou que o calor e o desacoplador metabólico 2,4-dinitrofenol induziu um padrão característico de puffing nos cromossomos de *Drosophila*. (RITOSSA, 1962; RITOSSA, 1996). Esta descoberta levou à identificação das proteínas de choque térmico (HSP) ou proteínas de estresse térmico, cuja expressão estes puffs representavam. Sendo que o aumento da síntese de proteínas específicas em células de *Drosophila*, devido ao aumento do estresse celular, tais como o choque térmico, foi relatada pela primeira vez em 1974 (RITOSSA, 1996).

A partir de meados dos anos 60, os pesquisadores reconheceram que muitas HSPs funcionam como chaperonas moleculares e, assim, desempenham um papel fundamental no enovelamento de proteínas, tráfego intracelular, e auxiliando proteínas desnaturadas pelo calor e outros tipos de estresses a obter sua estrutura nativa. Por conseguinte, o estudo das HSPs tem sofrido, desde então, um aumento exponencial, sendo alvo de diversas revisões: BEISSINGER e BUCHNER, 1998; FINK, 1999; MIERNYK, 1999; HARTL e HAYER-HARTL 2002; WEGELE et al., 2004, BORGES e RAMOS 2005, PEARL e PRODROMOU 2006 e LONDONO et al., 2012. Ademais, as chaperonas moleculares e seus mecanismos de regulação têm sido considerados excelentes alvos terapêuticos para tratamentos de diversos tipos de doenças (WESTERHEIDE e MORIMOTO, 2005; EBRAHIMI-FAKHARI et al., 2011).

As chaperonas moleculares são proteínas ubíquas, sendo assim, existem em todos os organismos e em todos os compartimentos celulares. As Hsps foram classificadas em seis grandes famílias de acordo com sua massa molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e small proteínas de choque térmico (Tabela 1.1). Dentro de cada família de genes existem membros que são constitutivamente expressos, por indução regulada e/ou encaminhadas a diferentes compartimentos da célula. A Hsp90, por exemplo, atua, tanto no citosol, quanto em compartimentos nucleares, ao passo que a Grp94 executa uma função análoga, no retículo endoplasmático. Da mesma forma, os membros da família Hsp70 apresentam padrões complexos de crescimento e regulação na expressão de genes induzidos por estresse e, após indução são dirigidos para diferentes compartimentos celulares, a Tabela 1.1 apresenta um resumo das principais HSPs, bem como, o nível de aumento em sua expressão devido ao aumento do stress celular. As Hsc70 e as proteínas Hsp70 são nucleares e citosólicas, respectivamente, ao passo que Grp78 está localizada no retículo endoplasmático e a mtHsp70 é mitocondrial. Assim, está bem estabelecido que uma célula possa expressar vários membros

da mesma família de chaperonas moleculares. A levedura *S. cerevisiae*, por exemplo, produz 14 versões diferentes da chaperona Hsp70 (CRAIG et al., 1999). As proteínas da mesma família de chaperonas moleculares apresentam alta identidade entre suas sequências primárias, em contraste há baixa identidade entre chaperonas de famílias diferentes. Apesar dessa diversidade, no entanto, a maioria das chaperonas moleculares partilham características funcionais comuns (SMITH et al., 1998; JOLLY e MARIMOTO, 2000; WALTER e BUCHNER, 2002; DEUERLING e BUKAU, 2004).

DEUERLING e BUKAU (2004) descrevem que a função das chaperonas como “holders” (seguradoras) e “folders” (enoveladoras) dependem da habilidade das chaperonas em prevenir a agregação proteica e/ou fornecer suporte apropriado para o (re)enovelamento proteico. A função “holder” pode ser dependente da hidrólise de ATP, sendo assim ATP-dependentes, como é o caso das chaperonas Hsp70 e Hsp60, ou ainda ATP-independente, como por exemplo, as small HSPs e as Hsp40. Por outro lado, a assistência ativa no enovelamento (como “folder”) de proteínas, pelas chaperonas Hsp70 e Hsp60, por exemplo, é considerada estritamente dependente da hidrólise do ATP (BUKAU & HORWICH, 1998).

Tem sido firmemente estabelecido que muitas proteínas recém sintetizadas necessitam da assistência das chaperonas moleculares para atingirem sua estrutura nativa (BUKAU et al., 2000; FRYDMAN, 2001; HARTL e HAYER-HARTL, 2002; WELCH et al., 1999). Essas chaperonas podem ser divididas em duas classes levando em consideração sua localização. A primeira classe é composta por chaperonas do citosol que estão associadas à co- e pos-tradução de proteínas recém-sintetizadas, estão inclusos membros em procarióticos e eucarióticos das famílias das Hsp70 e Hsp90. A segunda classe de chaperonas formam o que a literatura descreve com sendo um “comitê de boas vindas” e atuam nas cadeias nascentes de proteínas recém produzidas nos ribossomos, ligando-se em ambos: nos ribossomos e nas cadeias nascentes, talvez, auxiliando às etapas iniciais de enovelamento das proteínas. A existência de ribossomos associados à chaperonas tem sido amplamente observado em eucariotos e procariotos (BUKAU et al., 2000; FRYDMAN, 2001; HARTL e HAYER-HARTL, 2002).

Tabela 1.1 - Sumário das principais Hsps: localização na célula, funções e aumento no nível de expressão quando submetida a stress

Família	Organismo	Chaperonas	Localização	Funções
Hsp100	<i>E. coli</i>	ClipA,B,C	Citosol	Desenvolve papel na tolerância ao stress. Auxilia no re-enovelamento de proteínas inativadas e agregados solúveis.
	<i>S. cerevisiae</i>	Hsp104	Citosol	
Hsp90	<i>E. coli</i>	HtpG	Citosol	Atua na transdução de sinal; re-enovelamento e manutenção de proteínas in vivo; auto-regulação da resposta ao stress térmico; no ciclo celular.
	<i>S. cerevisiae</i>	Hsp83	Citosol	
	Animais	Hsp90	Citosol	
		Grp94	R. E.	
Hsp70	<i>E. coli</i>	DnaK	Citosol	Papel na auto-regulação da resposta ao stress térmico; interação com cadeias polipeptídicas nascentes; funções no transporte inter-organela; na transdução de sinal; re-enovelamento e manutenção de proteínas desnaturadas in vivo; no ciclo celular; atividade anti-apoptótica.
	<i>S. cerevisiae</i>	Ssa	Citosol	
		Ssb	Citosol	
		Kar2	R. E.	
		Ssc1	Mitocôndria	
	Animais	Hsc70	Citosol /núcleo	
		Hsp70	Citosol /núcleo	
		BIP	R. E.	
Hsp60	<i>E. coli</i>	mtHsp70	Mitocôndria	Re-enovelamento e prevenção de proteínas desnaturadas ou agregados proteicos in vitro; pode facilitar a degradação proteica agindo como co-fator em sistemas proteolíticos.
	<i>S. cerevisiae</i>	GroEL	Citosol	
	Plantas	Hsp60	Mitocôndria	
	Animais	Cpn60	Cloroplastos	
Hsp40	<i>E. coli</i>	Hsp60	Mitocôndria	Co-chaperona essencial para a atividade da Hsp70 atuando no ciclo da atividade ATPasica da Hsp70.
	<i>S. cerevisiae</i>	DnaJ	Citosol	
	Animais	Ydj1	Citosol /núcleo	
		Hdj1 e Hdj2	Citosol /núcleo	
Small Hsps	<i>E. coli</i>	LbpA e B	Citosol	Previne a agregação e a inativação de proteínas devido ao calor, conforme termo-tolerância por meio da estabilização de microfilamentos, atividade antiapoptótica.
	<i>S. cerevisiae</i>	Hsp27	Citosol	
	Animais	α A cristalina	Citosol	
		α B cristalina	Citosol	
		Hsp27	Citosol	

FONTE: Adaptado de JOLLY C, MORIMOTO RI (2000) **Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.** J Natl Cancer Inst 92:1564–1572.

Finalmente, cabe ressaltar que, as chaperonas moleculares estão envolvidas não apenas na assistência ao enovelamento proteico, mas atuam também como transportadoras, translocadoras, reguladoras, sinalizadoras, dentre outras muitas funções que são atribuídas a esta classe de proteínas, fazendo com que este grupo de proteínas seja, de modo geral, um grupo chave para diversos processos que garantem o bom funcionamento celular, bem como, a homeostase da célula (TAIPALE et al., 2014).

1.2 As Hsp70: Fundamentos Estruturais e Funcionais

Possuindo cerca de 40-60% de identidade entre seus membros eucarióticos e procarióticos, a super-família das Hsp70 corresponde a uma família de proteínas altamente conservadas biologicamente (HUNT e MARIMOTO, 1985; KARNAS e BROCCHER, 1998; SILVA e BORGES 2011; CUSTER et al., 2012). Essas chaperonas moleculares também são estritamente requeridas em todos os organismos e em todos os compartimentos celulares, sendo assim, uma família de proteínas ubíquas. Apesar de sua diversidade, tem sido observado que cada tipo apresenta características funcionais peculiares. Em levedura, apesar de sua alta identidade, cerca de 60-80%, nenhum de seus membros pode ser funcionalmente trocado por outro (CUSTER et al., 2012).

A família das Hsp70 age como pivô, recebendo e distribuindo proteínas clientes (ou substratos) entre as demais chaperonas moleculares (BORGES e RAMOS, 2005; SILVA e BORGES, 2011). O sistema Hsp70 e suas co-chaperonas (Hsp40 e os fatores de troca de nucleotídeos – Nucleotide Exchange Factors ou NEFs, como as GrpEs e Bag (Tabela 1.1) formam uma das famílias de chaperonas moleculares mais importantes, participando de funções essenciais para o metabolismo proteico. Elas estão envolvidas no enovelamento de proteínas como na ligação de polipeptídeos recém-sintetizados auxiliando seu enovelamento; na prevenção da agregação induzida por diferentes tipos de estresses e na recuperação de proteínas de agregados (MAYER et al., 2001; WEGELE et al., 2004). As Hsp70 também estão envolvidas em outras funções na célula, nas quais o enovelamento de proteínas não está necessariamente envolvido, como o transporte de proteínas por membranas e para a degradação proteica, na estabilização de fatores de transcrição celular, entre outras (MAYER et al., 2001; HARTL e HAYER-HARTL, 2002; WEGELE et al., 2004).

As Hsp70 exercem funções de controle de qualidade sobre proteínas enoveladas incorretamente (GOLOUBINOFF et al., 1999) e em proteínas recém-sintetizadas (FRYDMAN et al., 1994; MAYER et al., 2001), interagem indiscriminadamente com uma grande variedade de proteínas nascentes, proteínas não enoveladas e/ou parcialmente enoveladas. São exemplos

de substratos das Hsp70: fatores de transcrição, receptores de hormônios corticoides, proteínas quinases, proteínas de replicação de DNA e a p53 (MAYER et al., 2001; WEGELE et al., 2004).

1.2.1 Afinidade a Proteínas Clientes ou Peptídeo Substrato

A afinidade das Hsp70 pelas proteínas clientes ou peptídeo substrato é regulada pela presença do nucleotídeo adenosina no DLN (domínio de ligação de nucleotídeo) (MAYER et al., 2000, SILVA e BORGES 2011). O DLP (domínio de ligação do peptídeo) apresenta alta afinidade por proteínas clientes ou peptídeo substrato quando o nucleotídeo adenosina 5' difosfato (ADP) está ligado ao DLN, apresentando baixa taxa de liberação de substratos. A baixa afinidade do DLP pelo peptídeo substrato ocorre quando o nucleotídeo adenosina 5' trifosfato (ATP) está ligado ao DLN, sendo a taxa de liberação de substratos alta nesta condição (MAYER et al., 2000; 2001; SILVA e BORGES 2011).

1.2.2 Domínio de Ligação de nucleotídeos adenosina

As Hsp70 apresentam massa molecular de aproximadamente 70 kDa e são divididas em dois domínios conservados: o DLN (~45 kDa), que possui atividade ATPase, e o DLP (~25 kDa), capaz de ligar sequências de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (ZHU et al., 1996; RÜDIGER et al., 1997, RÜDIGER et al., 2001, DEOCARIS et al., 2012). O DLN consiste de dois domínios globulares (I e II), cada um sendo dividido em dois subdomínios A e B (ver Figura 1.1). Os subdomínios são separados por uma grande depressão que consiste no bolsão de interação com nucleotídeos adenosina, sendo assim, o DLN funciona como uma “concha”, existindo, no seu interior o sítio de ligação para os nucleotídeos (DEOCARIS, KAUL e WADHWA, 2012).

1.2.3 Domínio de Ligação de peptídeos/proteínas

O DLP também pode ser subdividido em dois subdomínios: um formado principalmente de estrutura em folha β -pregueada, que funciona como uma “cama” para o substrato (DLP β) de aproximadamente 18 kDa e outro composto por uma longa estrutura em α -hélice que funciona como uma “tampa” (DLP α ou Lid) com cerca de 10 kDa (Figura 1.1), (ZHU et al., 1996; MAYER et al., 2000; SILVA e BORGES, 2011). O DLP α é capaz de se fechar sobre a DLP β através de uma dobradiça (ZHU et al., 1996; MAYER et al., 2000) e, por conseguinte, sobre o peptídeo substrato. Assim, duas principais conformações da Hsp70 (“aberta” e outra “fechada”) poderiam ser descritas na presença de diferentes nucleotídeos adenosina em relação ao sítio de ligação ao substrato (Figura 1.2). Na ausência de nucleotídeos de adenosina, foi descrito a existência de um estado de equilíbrio entre estas duas possíveis conformações do DLP α (MAYER et al., 2000).

Um motivo de aminoácidos reconhecido para DnaK foi identificado por meio de uma biblioteca de fagos, consistente com as características observadas das sequências de sinal de proteínas destinadas à compartimento mitocondrial. GRAGEROV e GOTTESMAN (1994) descrevem que os peptídeos que contêm resíduos internos alifáticos, como NRLLLTG, e aqueles que contêm resíduos (não ácidos) básicos favorecem a ligação à Hsp70 procariótica.

Figura 1.1 - Domínios estruturais das Hsp70 e seus subdomínios. *A esquerda apresenta-se um modelo esquemático para o domínio (N-terminal) de ligação de nucleotídeos de adenosina (DLN) com destaque para seus subdomínios bem como para o bolsão de interação com ATP e ADP. A direita apresenta-se um modelo esquemático para o domínio de troca de peptídeos /proteínas, com destaque para seus subdomínios.*

FONTE: Autoria própria.

1.2.4 Atividade ATPásica das Hsp70

Evidências genéticas e bioquímicas demonstram claramente que a hidrólise do ATP é essencial para a atividade chaperona de todas as proteínas Hsp70 testadas até então (Mayer e Bukau, 2004). A ligação de ADP ao DLN provoca mudanças conformacionais neste que são transmitidas ao DLP, deslocando o equilíbrio para a conformação fechada, caracterizada por baixa taxa de ligação/liberação de substratos. A ligação de ATP causa um efeito oposto, no qual o equilíbrio seria deslocado para a conformação aberta e caracterizada por alta taxa de ligação/liberação de substratos (MAYER et al., 2000, 2001; WEGELE et al., 2004). Vários trabalhos sugerem que as Hsp70 são proteínas modulares e que seus domínios funcionam independentemente como uma proteína bilobular (MAYER et al., 2001; WEGELE et al., 2004).

Dentre as diversas proteínas que atuam como co-chaperonas das Hsp70, existem duas classes que merecem destaque por atuar diretamente na modulação da atividade ATPásica: os NEFs que atuam no DLN como por exemplo as GrpEs e Bags; e as proteínas com domínio J (Hsp40) que podem atuar “entregando” proteínas clientes para as Hsp70 no DLP, estimulando a atividade ATPase das Hsp70 e deslocando o equilíbrio do ciclo para uma conformação de alta afinidade (Figura 1.2) (DEOCARIS, KAUL e WADHWA, 2012).

1.3 Co-chaperonas da Hsp70: Modularas e Mediadoras

As Hsp70 realizam diferentes tarefas no ambiente celular, sendo assim, a regulação do acesso destas proteínas ao substrato parece ser essencial. Neste sentido muitas co-chaperonas tem como parceiras as Hsp70 selecionando as proteínas clientes ou mediando à ligação das proteínas alvo com a Hsp70. Esta regulação na atividade possibilita a estas co-chaperonas conectar as Hsp70 com suas proteínas alvo, incluindo substratos e outras chaperonas (como as Hsp90), por meio de uma associação física com ambos, chaperona e alvo.

Figura 1.2 – Ciclo esquematizando a atividade ATPásica das Hsp70. *A região dita de baixa afinidade refere-se à afinidade do domínio DLP ao substrato, que pode ser peptídeos ou proteínas, nesse caso, o domínio DLP apresenta baixa afinidade ao substrato. Enquanto no DLN a molécula de ATP permanece ligada no bolsão de interação com nucleotídeos, a presença desta leva a proteína a obter um arranjo conformacional onde o DLN se “fecha” e o DLP se abre permitindo a entrada ou saída do substrato. Em contrapartida, a hidrólise do ATP causa uma alteração conformacional na proteína levando o DLN a assumir uma conformação aberta enquanto por sua vez o subdomínio DLP se fecha sobre o substrato fazendo com que a proteína assuma uma conformação de alta afinidade ao substrato. O ciclo funcional da Hsp70 depende da hidrólise do ATP, bem como, a saída do ADP formado para continuar seu funcionamento. Existem proteínas que auxiliam a Hsp70 modulando sua atividade ATPásica e sua função, atuando em momentos específicos do ciclo. As Hsp40, que possuem como característica principal um domínio J, atuam entregando substratos para as Hsp70 acelerando a hidrólise do ATP no domínio DLN e levando a proteína a adquirir um estado conformacional de alta afinidade ao substrato. Por sua vez, as proteínas GrpEs e Bag, atuam facilitando a saída de ADP do bolsão de interação localizado no DLN promovendo a entrada de ATP e o retorno da proteína na conformação de baixa afinidade permitindo a saída do substrato e a entrada de um novo, levando ao retorno do ciclo na posição inicial.*

FONTE – Autoria própria

1.4 Mortalina: A Hsp70 mitocondrial

A Hsp70 mitocondrial, também denominada proteína mitocondrial de choque térmico (mtHsp70) (BHATTACHARYYA et al., 1995), proteína de ligação de peptídeo 74 (PBP74) (DOMANICO et al., 1993), ou proteína reguladora de glucose (Grp75) (WEBSTER et al., 1994), ou ainda mortalina em mamíferos (WADHWA et al., 1993), nome recebido devido estar ligada a senescência celular, é uma chaperona molecular da família das Hsp70 e tem sido demonstrado que possui características funcionais únicas nos diferentes compartimentos celulares onde atua. O papel funcional da mortalina pode ser classificado em duas principais classes baseado em sua localização na célula. A primeira classe de funções envolve todas aquelas que ocorrem na mitocôndria, incluindo sua participação na importação de proteínas sintetizadas no citosol para a matriz mitocondrial, enovelamento de proteínas nascentes, degradação de proteínas dentro da mitocôndria e interação com constituintes mitocondriais. A segunda classe envolve funções extra mitocondriais incluindo interações com a proteína p53, centrôsomos, fatores de crescimento, constituintes do sistema imune e proteínas do retículo endoplasmático (BASELER et al., 2012).

Desde sua identificação em ratos em 1993 (WADHWA et al., 1993a,b), numerosas pesquisas tem focado na elucidação dos papéis funcionais da mortalina nos diferentes compartimentos celulares onde ela possui funcionalidade (LONDONO et al., 2012). Além disso, à sua influência em algumas patologias, tem feito com que a mortalina receba continuamente mais atenção por parte dos pesquisadores, os quais tem se concentrado em identificar o impacto da mortalina sobre doenças e um possível potencial para sua utilização como uma ferramenta terapêutica e/ou como biomarcador patológico (BASELER et al., 2012).

1.4.1 Mortalina: uma proteína multifuncional

Apesar de ser predominantemente localizada na mitocôndria (WADHWA et al., 1993; YOKOYAMA et al., 2002; YANG et al., 2011), a presença da mortalina tem sido descrita em outros compartimentos celulares, incluindo o retículo endoplasmático (RAN et al., 2000), vesículas citoplasmáticas (WADHWA et al., 2003; LONDONO et al., 2012) e no citosol (BHATTACHARYYA et al., 1995). A atividade e função da mortalina são determinadas pela sua localização na célula e pelos seus interatores (Tabela 1.2 e Figura 1.3 e Figura 1.4). Diversas modificações pós traducionais tem sido reportadas para a mortalina, tais como: fosforilação, oxidação e ubiquitinação (DEOCARIS et al., 2008). No entanto, a confirmação da fosforilação da mortalina, bem como, dos sítios específicos de fosforilação e a elucidação dos efeitos biológicos desse processo para a funcionalidade da proteína ainda não foram descritos (LONDONO et al., 2012).

Dependendo de sua localização e seus parceiros as seguintes funções tem sido atribuídas a mortalina: controle da proliferação celular (KAUL et al., 2007); tráfego intracelular (MIZUKOSHI et al., 1999; SACHT et al., 1999); guia de outras proteínas até sua localização final (KAUL et al. 2007); processamento de antígeno (DOMANICO et al., 1993; PILZER e FISHELSON 2005); regulação da resposta celular sob condições de estresse (CARETTE, LEHNERT e CHOW 2002); inativação da proteína de supressão tumoral p53 (KAUL et al., 2007) e inibição da apoptose (morte programada da célula) (TAURIN et al., 2002). A Figura 1.3 e a Tabela 1.2, adaptadas de LONDONO (2012), assim como a Figura 1.4, apresentam as principais funções da mortalina, bem como, os principais parceiros de ligação dessa proteína nos diversos compartimentos celulares onde ela atua.

Figura 1.3 – Múltiplas funções e múltiplas localizações da mortalina. *Mortalina esta envolvida em processos na mitocôndria, núcleo, membrana plasmática e no retículo endoplasmático. A distribuição a mortalina é altamente dependente das condições celulares. 1. A mortalina interage com a Hsp60 e com a TIM23 na matrix mitocondrial promovendo a força motriz para a importação de proteínas do citosol para a matrix mitocindrial e nesse*

processo age também como chaperona molecular auxiliando no enovelamento correto da proteína recém translocada; 2. Mortalina interage com a VDAC1 e modula as propriedades do canal; 3. p66Shc localizada na mitocôndria e forma complexo com a mortalina que modula a rota mitocondrial da apoptose; 4. A mortalina liga a MVD1 (que inibe a p21) que pode representar outro caminho para a imortalização celular, podendo ser uma parte dos mecanismos da proliferação celular; 5. A mortalina se associa com a IL-1R (receptor de interleucina-1) proteína que leva a internalização do receptor e cascatas de sinalização; 6. Mortalina se liga a p53 levando a inativação desta última e impedindo o início do processo de apoptose e 7. Mortalina promove tráfego intracelular da FGF-1.

Fonte: Adaptada de Londono C, Osorio C, Gama V, Alzate O. **Mortalin, Apoptosis, and Neurodegeneration.** Biomolecules. 2012; 2(1):143-164.

A Figura 1.4 apresenta uma rede de interação da mortalina com outras proteínas e foi gerada através da plataforma Strings. O cruzamento dessas informações revelou que a mortalina apresenta forte interação com outras proteínas, em especial proteínas regulatórias, dentre as quais se destacam as proteínas GRPEL1 e GRPEL2 (GrpE#1 e GrpE#2, respectivamente). Componentes do complexo de reconhecimento e internalização de proteínas entre a membrana interna e a matriz mitocondrial; TOMM20, TOMM70A e TIMM23.

Tabela 1.2 - Proteínas que interagem com a mortalina e suas respectivas funções

Proteína	Localização Celular	Função	Referência
Proteína precursora de amiloides (APP)	Membrana. APP é uma proteína integral de membrana expressa em muitos tecidos e concentrada na sinapse de neurônios.	Induz um subconjunto específico de genes neuroprotetores e anti-oxidante. Ativa a expressão da mortalina.	KOGEL et al., 2005
Proteína Dj-1	Predominantemente localizada no citosol, núcleo e mitocôndria	Dj-1 protege a célula contra o stress oxidativo e a morte celular. Associada com mal de Parkinson.	BURBULLA et al., 2010; CANET-AVILES et al., 2004; JIN et al., 2006.
Fator de crescimento Fibroblasto 1 (FGF-1)	Núcleo, citosol e vesícula citoplasmática	FGF-1 esta envolvida na regulação da proliferação celular, diferenciação e migração.	MIZUKOSHI et al., 2001; MIZUKOSHI et al., 1999.
Heat shock protein 60 kDa Hsp60	Matriz mitocondrial	Hsp60 atua juntamente com a mortalina na importação de proteínas do citosol para a matriz mitocondrial. Pode também atuar prevenindo o mal enovelamento e promovendo o re-enovelamento adequado de polipeptídeos desenovelados gerados sob condições de stress na matriz mitocondrial.	WADHWA et al., 2005.
Interleucina-1 (IL-1)-receptor- α	secretada	Citocina pró-inflamatória importante mediadora de respostas locais e sistêmicos do sistema imunológico. Uma proteína importante durante processos de neuroinflamação e neurodegeneração.	SACHT et al., 1999.
p53	Citosol	p53 é uma proteína suppressora tumoral, participa nos processos de apoptose e estabilidade genômica.	IOSEFSON E AZEM, 2010; WADHWA et al., 1998.
descarboxilase phosphomevalonato (MVD1); inicialmente conhecido como MPD	Citosol	MVD1 está envolvida na biossíntese do colesterol, fornecendo grupos prenilo necessários para a prenilação de proteínas (adição de moléculas hidrofóbicas às proteínas).	WADHWA et al., 2003.
Proteína SHC-transformadora 1 - isoforma p66, p66Shc	Mitocôndria	A isoforma da proteína SHC-transformadora 66 kDa é um componente crítico da resposta apoptótica para estresse oxidativo.	PELLEGRINI et al., 2005; ORSINI et al., 2004
Proteína Ubiquitina E3 ligase, Parkin	Principalmente citosol, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria	Parkin está envolvida na regulação da morfologia mitocondrial, antagonizando o dano oxidativo ao DNA mitocondrial e ativando mecanismos de auto-reparação mitocondriais.	YANG et al., 2011; GRUNEWALD et al., 2010.
Tid1 (DnaJ (Hsp40) homólogo, subfamília A, membro 3)	Matriz mitocondrial	Fator de troca de nucleotídeos. Proteína de choque térmico (co-chaperona).	GOSWAMI et al., 2010.
Canal de ânion seletivo dependente de voltagem (VDAC)	Membrana mitocondrial externa e membrana celular	Participa no metabolismo energético, homeostase mitocondrial e apoptose. Também pode participar da formação do complexo do poro de transição de permeabilidade (PTPC), responsável pela liberação de produtos mitocondriais que desencadeiam o processo de apoptose.	SCHWARZER et al., 2002.

FONTE: Adaptado de LONDONO C, OSORIO C, GAMA V, ALZATE O. Mortalin, Apoptosis, and Neurodegeneration. **Biomolecules**. 2012; 2(1):143-164.

Interage também com proteínas receptoras das membranas interna e externa que regulam a translocação e o enovelamento de proteínas em direção à mitocôndria; a proteína p53 (TP53), importante reguladora do ciclo celular; e a proteína PMPCB, localizada na matriz mitocondrial e constituinte do complexo heterodimérico que cliva peptídeos-sinal de proteínas recém-importadas para que se tornem funcionais dentro da organela, dentre outras inúmeras proteínas.

Figura 1.4 – Rede de interação de proteínas, funcional ou quimicamente, relacionadas à mortalina (gene HSPA9 em humanos). As interações proteína-proteína da mortalina com possíveis parceiros foi realizada na plataforma STRINGS. Foram realizadas duas pesquisas em banco de dados: uma a partir do **Gene name** da mortalina (HSPA9, mortalin), e outra a partir da sequência de aminoácidos da proteína. Em ambos os casos a rede de interação retornou os mesmos parceiros com altos índices de correlação ($p < 0,05$ para todos os parceiros preditos).

FONTE: Plataforma Strings, acessada em 2014.

Na mitocôndria, a mortalina está envolvida em múltiplos processos mitocondriais, tais como: o metabolismo de energia, a geração de radicais livres (XU et al., 2009) e a manutenção da integridade de proteínas mitocondriais (DEOCARIS et al., 2008). Além disso, a mortalina

desempenha um papel na biogénese mitocondrial, na translocação de proteínas citosólicas, bem como a importação dessas para a matriz mitocondrial por meio das duas membranas mitocondriais (IOSEFSON e AZEM, 2010) (Figura 1.3). A mortalina é o único componente com atividade ATPasica do sistema de importação mitocondrial de proteínas para a matriz mitocondrial (BRUNNER et al., 1995) onde se liga a translocase de membrana interna (TIM), para formar um motor dependentes de ATP, fornecendo parte da força motriz para a importação de proteínas do citosol (YANG et al., 2011). Na matriz mitocondrial, a mortalina age livremente, uma vez que participa dos processos de importação e, no enovelamento de proteínas, em associação com Hsp60 (DEOCARIS et al., 2006).

Como descrito a mortalina se destaca por apresentar três funções principais, sendo estas:

- 1) Função de “Governanta”: envolvida na importação mitocondrial, geração de energia e de reenovelamento de proteínas enoveladas incorretamente;
- 2) Função Guarda: guardião do estresse que tem vários fatores relacionados;
- 3) Função Assassina: por um lado contribui para a carcinogénese e por outro lado para transtornos de idade, com mal de Parkinson e Alzheimer (KAUL, DEOCARIS e WADHWA, 2007).

A mortalina é de grande interesse científico por estar relacionada com um possível tratamento de determinados tipos de câncer (SOTI e CSERMELY, 2000, 2002; SOTIET al., 2003; LONDONO et al., 2012). A observação de que tumores celulares frequentemente elevam os níveis de Hsp podem estar associados a uma resposta das células cancerígenas ao processo de seleção que ocorre durante a tumorigenesis. Descobriu-se que o nível de expressão da mortalina é elevado em muitos tumores humanos e em células estudadas *in vitro*, células-clone com aumento espontâneo dos níveis de expressão da mortalina tornaram-se independentes e adquiriram a habilidade de formar tumores em ratos de laboratório. Ademais, a superexpressão da mortalina foi suficiente para aumentar o câncer de mama sugerindo que um aumento na expressão da mortalina contribui significativamente para a formação de tumores (WADHWA, 2006; KAUL, DEOCARIS e WADHWA, 2007).

Apesar de ser conhecida há bastante tempo (desde 1993), e de sua grande importância celular, a mortalina recombinante não é obtida facilmente por técnicas de expressão heteróloga devido um processo de auto-agregação que resulta na sua produção heteróloga de forma insolúvel (DORES-SILVA et al., 2013). A obtenção de proteínas via expressão heteróloga é de grande interesse, pois, esta técnica permite a obtenção de proteínas de maneira mais rápida, e desta forma, o estudo pode ser desenvolvido em um menor intervalo de tempo. No entanto, para a realização dos estudos de caracterização a proteína deve estar em um estado solúvel, ou seja,

em sua conformação nativa, permitindo assim, avaliar de maneira efetiva as interações que ocorrem em nível celular.

LUO et al. (2010) descreve a obtenção da mortalina por meio de reenovelamento químico a partir de corpos de inclusão, no entanto, os dados apresentados, como por exemplo o espectro de CD, sugerem que a proteína recombinante obtida não se apresentava na forma nativa, sendo que estudos similares foram reportados por BOSWELL-CASTEEL (2014). Ademais, experimentos abordando o estado oligomérico da mortalina, nos trabalhos em questão, não foram apresentados. Sendo assim, as características estruturais e funcionais dessa proteína multifuncional ainda permanecem não elucidados.

1.5 Hsp70 escort Protein (Hep1)

A proteína de “escolta” da Hsp70 (Hep1, do inglês *Hsp70-escort protein* - Zim17/TIM15/DNLZ / YNL310c), foi inicialmente descoberta em estudos de bioinformática que buscavam uma triagem no genoma de *S. cerevisiae* por genes que codificavam domínios relacionados ao domínio dedo de zinco encontrado em co-chaperonas da *E. coli* como as DnaJ (BURRI et al., 2004). Estudos posteriores mostraram que a Hep1 de levedura era importante para a importação de proteínas para a matriz mitocondrial (BURRI et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2005). Posteriormente, estudos identificaram que a Hep1 interage com a mtHsp70 e que o complexo formado é instável na presença de ATP (SICHTING et al., 2005). Evidências apresentadas por imunoblotting quantitativo mostraram que em levedura a Hep1 esta presente em concentrações cerca de 5% das concentrações de Ssc1 e Ssq1 (SICHTING et al., 2005). Estes dados sugerem que a Hep1 pode ser requerida para formação de complexos com a Hsp70 em concentrações sub-estequiométricas. A Hep1 apresenta uma dupla ação sob a mtHsp70: 1) impedindo a sua auto-agregação e 2) controlando sua atividade ATPase (GOSWAMI, CHITTOR e D´SILVA, 2010).

Hep1 é essencial para a maquinaria de importação mitocondrial, localizada na matriz mitocondrial (BURRI et al., 2004; SICHTING et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005). A supressão da Hep1 de levedura (yHep1) leva a um mal funcionamento no sistema de importação de pré-proteínas dependentes do complexo TIM23. Sendo que também foi mostrado que ela é necessária para o crescimento das leveduras em temperaturas elevadas (SICHTING et al., 2005). No entanto, a Hep1 age protegendo a mtHsp70 de processos de agregação, logo os efeitos observados devem ser um reflexo do mal funcionamento da mtHsp70 e não diretamente ligados à atividade Hep1 (BOHNERT et al., 2007). Em levedura, Hep1 se liga especificamente

ao DLN de mtHsp70 (Figura 1.5) impedindo a sua auto-agregação de uma forma subestequiométrica (SICHTING et al., 2005; ZHAI et al., 2008; ZHAI et al., 2010).

Hep1 contém um domínio dedo de zinco, que é crítico para a sua função *in vivo*, tanto em células de levedura quanto em células de humanos (YAMAMOTO et al. 2005; VU et al. 2012). Experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN), mostraram que a estrutura da yHep1 (um mutante truncado da yHep1 de levedura) apresenta o cluster dedo de zinco completamente enterrado e constituindo o maior componente da proteína (MAMOSE et al. 2007). A exclusão ou modificação do motivo dedo de zinco da Hep1 humana (hHep1) leva a perda de ação em evitar a agregação da mortalina, o que sugere que o domínio dedo de zinco da hHep1 também é essencial para a sua interação com mortalina (VU et al. 2012).

Figura 1.5 – Modelo para o enovelamento da mtHsp70. O domínio de atividade ATPase bem como o linker e o domínio de troca de substrato\peptídeo se enovelam independentemente formando a mtHsp70 enovelada. O DLP se enovelava sobre si próprio; o DLN não. O domínio de troca de nucleotídeos e o linker adotam um estado intermediário que é reconhecido pela Hep1. A ligação com a Hep1 induz modificações conformacionais que permitem a ligação com nucleotídeos de adenosina (ATP/ADP). O complexo mortalina-Hep1 é então desfeito. O domínio DLN, corretamente enovelado, e DLP formam juntos a mtHsp70 nativa e cataliticamente ativa. O modelo também retrata a transição da mtHsp70 nativa em seu estado livre de nucleotídeos em um conformero propenso a agregação. A Hep1 liga-se ao conformero prevenindo a agregação e permitindo que a mtHsp70 recupere a sua estrutura nativa.

FONTE: Adaptada de M. Blamowska, W. Neupert, K. Hell. **Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone.** J Cell Biol, 199 (2012), pp. 125–135.

Apesar da hHep1 poder suplementar *in vivo* a deleção da yHep1 (VU et al. 2012), estas proteínas não são funcionalmente equivalentes. Foi demonstrado que hHep1 aumenta a atividade ATPasica da mortalina humana (GOSWAMI, CHITTOOR e D´SILVA, 2010; ZHAI et al., 2008; ZHAI et al., 2010; VU et al., 2012), porém esta funcionalidade não foi observada para yHep1 (VU et al., 2012). Também foi relatado que hHep1 interage com o domínio lid no DLP da mortalina e também com o DLN pelo qual estimula a atividade ATPase de mortalina de uma forma mutuamente exclusiva com as proteínas Hsp40 (GOSWAMI, CHITTOOR e D´SILVA, 2010). Curiosamente, a yHep1 previne a agregação da mortalina humana o que sugere que o mecanismo de ação da Hep1 é conservado nessas proteínas (ZHAI et al. 2008). Além disso, também foi demonstrado que a atividade de chaperona presente na hHep1 é intrínseca (GOSWAMI, CHITTOOR e D´SILVA, 2010).

Este trabalho de doutoramento também envolveu a caracterização estrutural da hHep1 gerando um trabalho publicado no periódico *International Journal of Biological Macromolecules* (DORES-SILVA et al., 2013) que é apresentado como anexo a esta tese (Anexo 1). Entretanto, somente a parte funcional da hHep1 sobre a mortalina é explorada nesta tese de doutorado. Outro trabalho publicado durante o doutoramento foi a caracterização estrutural da Hsp70-Interacting protein (HIP) de *Leishmania braziliensis*, sendo parte componente desta tese. Porém, este tópico não está diretamente relacionado ao estudo da mortalina, como proposto nesta tese, portanto este trabalho é somente apresentado como anexo (Anexo 2).

No que concerne a caracterização estrutural da hHep1 (DORES-SILVA et al., 2013), foi observado que a mesma é composta por estrutura secundária tipo folha β -pregueada, assim como observado para a ortóloga de levedura. A hHep1 possui um domínio *zinc finger* capaz de coordenar um íon zinco e a retirada deste usando EDTA como agente quelante reduz a estabilidade térmica e química da hHep1. A caracterização hidrodinâmica sugeriu fortemente que a hHep1 é uma mistura de pelo menos três espécies oligoméricas em equilíbrio com uma espécie monomérica em solução. Os experimentos de ultracentrifugação analítica (AUC) e de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), apontaram que a hHep1 apresenta um processo de oligomerização que é dependente da concentração de proteína. Além disso, os dados revelaram que o monômero foi a principal espécie encontrada em solução. O estudo também apontou que o motivo dedo de zinco presente na hHep1 é fundamental para a estabilidade estrutural da proteína (DORES-SILVA et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi à caracterização estrutural e funcional da mortalina humana monomérica em solução em comparação a Hsp70-1A, que é a homóloga citoplasmática da mortalina.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterização estrutural:

- Avaliar a estrutura secundária da proteína recombinante produzida utilizando a técnica de Dicroísmo circular (CD);
- Avaliar a estrutura terciária local por meio da fluorescência intrínseca do triptofano;
- Determinação de parâmetros hidrodinâmicos da proteína recombinante recém-produzida por Cromatografia de gel filtração analítica (CEMa);
- Determinação de parâmetros hidrodinâmicos e de forma da mortalina por Ultracentrifugação analítica (UCA);
- Ensaios de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) para determinação de parâmetros de forma e reconstrução de um modelo *ab initio* da mortalina;
- Ensaios de estabilidade química e térmica por CD e fluorêscencia, para investigar a organização de domínios da proteína;

Caracterização funcional:

- Determinação de parâmetros termodinâmicos da interação da mortalina com nucleotídeos de adenosina por Calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- Determinação da atividade ATPásica e do incremento desta (por alosteria) na presença do peptídeo substrato NRLLLTGY;
- Ensaios de agregação térmica monitorada por UV-Vis, visando investigar os parâmetros que influenciam a agregação da mortalina com o incremento da temperatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão e Purificação da Mortalina

Para a obtenção da mortalina em sua forma solúvel foi realizada uma estratégia de co-expressão com sua co-chaperona hHep1 para os ensaios estruturais e funcionais da mortalina (DORES-SILVA et al., 2013). As células transformadas em BL21(DE3) com os vetores pET23a::hHep1 e pET28a::Mortalina foram então crescidas à 37 °C em meio LB (Lysogeny Broth), contendo ampicilina 50 µg/mL e 50 canamicina µg/mL até OD_{600nm} (difração óptica à 600 nm) de 0,6-0,8 onde a expressão da proteína foi induzida por 0,2 mM of isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG). Após 18 horas de indução à 23 °C e 200 rpm, as células foram sedimentadas por centrifugação por 20 min à 8.000 rpm e 4 °C. Para a lise celular o pellet foi ressuspenso em 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, (15 mL para cada 200 mL de meio LB) e incubadas com 5 U de DNase (Promega) e 30 µg/mL de lisozima (Sigma) por 30 min em gelo. O pellet foi então lisado por sonicação e centrifugado à 15.000 rpm por 30 min à 4 °C. Os sobrenadantes foram então filtrados e submetidos à cromatografia de afinidade ao níquel em coluna HiTrap Chelating (GE Healthcare LifeSciences) acoplada a um ÄKTA Prime plus (GE Healthcare LifeSciences) equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio (pH 7.5), 100 mM de NaCl e 20 mM de imidazol, sendo eluída no mesmo tampão contendo 500 mM de imidazol. Imediatamente após a eluição o material foi incubado com fosfatase alcalina (NewEngland BioLabs) e em gelo por 4 horas para eliminação de traços de nucleotídeos adenosina (Borges & Ramos, 2006), posteriormente, o material foi submetido a cromatografia de exclusão molecular preparativa, realizada em coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Healthcare LifeSciences) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento ÄKTA Prime plus (GE Healthcare LifeSciences), para eluição utilizou-se tampão TKP (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio e 5 mM de KCl, 2 mM de β-mercaptoethanol) sendo que um banho térmico de circulação foi acoplado a jaqueta da coluna para manter a temperatura constante de 4 °C. Para acompanhar a eficácia do processo todos os passos de expressão e purificação da proteína foram acompanhados por SDS-PAGE.

3.2 Estudos biofísicos: Caracterização Estrutural

3.2.1 Determinação da Concentração da Proteína

Para determinação da concentração da mortalina utilizou-se espectroscopia segundo método descrito por EDELHOCK (1967) que utiliza a proteína desnovelada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5) e clorohidrato de guanidina 6 M. A solução contendo a proteína foi

incubada por 30 min a temperatura ambiente e seguiu-se a leitura do espectro de absorvância entre os comprimentos de onda 250 e 320 nm. A concentração foi calculada utilizando a lei de Beer-Lambert (Equação 2.1):

$$A = \epsilon \times l \times c \quad \text{[Equação 3.1]}$$

Onde;

A = leitura de absorvância;

ϵ = coeficiente de extinção molar;

l = comprimento do caminho ótico em centímetros;

c = concentração em M.

A concentração molar foi determinada a partir da absorvância encontrada para λ de 280 nm. O coeficiente de extinção molar em 280 nm ($20431 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi estimado usando o programa Sednterp (www.jphilo.mailway.com/download.htm) a partir da sequencia de aminoácidos da mortalina humana (código de acesso GII24234688).

3.2.2 Dicroísmo Circular: Estrutura Secundária, Efeitos da presença de Nucleotídeos Adenosina, Estabilidade Química e Térmica

Para estimativa da estrutura secundária da proteína, averiguação de possível alteração estrutural frente a nucleotídeos de adenosina (ATP e ADP), estabilidade química e, finalmente estabilidade térmica utilizou-se como ferramenta, ensaios de dicroísmo circular (CD) que foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 com temperatura controlada por um sistema Peltier PFD 425S (Jasco).

Para os ensaios de CD a mortalina foi mantida em tampão TKP com concentrações entre 5 e 10 μM . Os espectros de CD foram coletados com 50 acumulativas, tempo de resposta de 2 segundos e em cubeta de 0,2 mm de caminho óptico. Os espectros foram então convertidos para elipticidade molar residual ($[\Theta]$) (Equação 2.2) e a estrutura secundária da proteína foi estimada pelo programa de CDNN Deconvolution (BOHM et al., 1992). Os mesmos ensaios foram realizados mantendo a concentração da proteína entre 5-10 μM e adicionando 200 μM de ATP ou 200 μM de ADP como ligantes na presença e ausência de 2 μM de MgCl_2 , estes ensaios foram realizados para verificar possíveis alterações na estrutura secundária da proteína devido a presença desses ligantes.

$$[\Theta] = (\Theta.MM).(10.c.l.n)^{-1} \quad \text{[Equação 3.2]}$$

Onde:

$[\Theta]$ = Elipcidade residual molar;

Θ = Elipcidade em graus (Deg);

MM = Massa molecular da proteína (g/mol);

c = Concentração da proteína (mg/mL);

l = Comprimento do caminho óptico (cm);

n = Número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Para investigar a estabilidade química da proteína por CD utilizou-se o comprimento de onda de 222 nm e uma cubeta de caminho óptico de 1 mm, na presença de concentrações crescentes de ureia (0-8 M), preparada em tampão TKP, e concentração de proteína de 1,5 μ M. As C_m (ponto médio da transição) foram calculadas para as transições de desenovelamento químico ajustadas pela Equação de Boltzmann.

O desenovelamento térmico da mortalina foi acompanhado por CD com uma taxa de aquecimento de 1°C/min em 222 nm, usando uma cubeta de caminho óptico de 1 mm e com a proteína em concentração final de 1,5 μ M, preparada em tampão TKP. Os valores de T_m equivalem ao ponto médio de transição de desenovelamento térmico e foram determinados por meio de um ajuste sigmoidal, da transição de desenovelamento. O efeito de nucleotídeos adenosina (200 μ M), na presença e ausência de Mg^{2+} (200 μ M), na estabilidade estrutural da mortalina também foi investigado utilizando o desenovelamento térmico acompanhado por $CD_{222\text{ nm}}$. Sendo que as soluções estoques de todos os ligantes utilizados foram preparadas em tampão TKP.

3.2.3 Fluorescência Intrínseca do Triptofano: Estrutura Terciária, Estabilidade Química e Térmica

Para investigar a estrutura terciária local, estabilidade térmica e estabilidade química da mortalina utilizou-se como sonda a fluorescência intrínseca do triptofano. As medidas foram realizadas em um fluorímetro F4500 Hitachi em cubeta de 10x2 mm de caminho óptico. Para determinação da estrutura terciária utilizou-se comprimento de onda de excitação de 280 nm e acompanhou-se a emissão em um espectro de 295 à 420 nm, os ensaios foram realizados em tampão TKP, temperatura ambiente e, a concentração de proteína usada ficou entre 1 e 5 μ M.

O desenovelamento químico da proteína foi realizado com concentração de 1 μ M para a mortalina e concentrações crescentes (0-8 M) de ureia, preparada em tampão TKP, após 30

min de incubação procedeu-se a leitura com excitação de 280 nm e emissão entre 295 à 420 nm.

Para o desenovelamento térmico acompanhado por fluorescência um banho térmico foi acoplado ao fluorímetro e seguiu-se as leituras com excitação de 295 nm e emissão entre 310 a 400 nm de 4 à 90°C e concentração de proteína de 2 µM, preparada em tampão TKP. Como controle, foi monitorada a fluorescência do aminoácido N-acetil triptofanamida na concentração de 2 µM em TKP.

Os resultados foram analisados pelo comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{\max}$) e centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$) (equação 2.3):

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum IF \cdot \lambda}{\sum IF} \quad [\text{Equação 3.3}]$$

Onde:

$\langle \lambda \rangle$ = Centro de massa espectral;

λ = Comprimento de onda;

IF = Intensidade de fluorescência.

3.2.4 Cromatografia de exclusão molecular analítica: Determinação da massa molecular aparente e raio de Stokes

A cromatografia de exclusão molecular analítica (CEMa) foi realizada em coluna Superdex 200 GL 10/30 (GE Healthcare LifeSciences) acoplada a um ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences) e equilibrada com tampão TKP. Para a determinação da massa molecular aparente (MM_{app}) e do raio de Stokes (R_s) da mortalina, uma mistura de padrões proteicos constituído por Apoferritina (480 kDa/ R_s 67 Å), γ -Globulina (160 kDa/ R_s 48 Å), BSA (67 kDa/ R_s 36 Å), Ovoalbumina (45 kDa/ R_s 29 Å), anidrase carbônica (29 kDa/ R_s 24 Å) e Citocromo C (12 kDa/ R_s 14 Å) (todos de procedência Sigma-Aldrich) foi utilizado. A razão friccional (f/f_0) foi estimada pela razão do raio de Stokes experimental R_s e o raio de uma esfera de mesma massa (LEBOWITZ et al., 2002). Para determinação do raio de Stokes utilizou-se os valores correspondentes ao volume de eluição das proteínas padrão e da proteína de interesse, para tanto calculou-se o coeficiente de partição (K_{AV}):

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde,

K_{AV} = coeficiente de partição;

V_e = Volume de eluição;

V_0 = Volume da fase móvel;

V_t = Volume de coluna total

Para calcular o R_s , foram graficados os valores de R_s das proteínas padrão *versus* – $\text{Log}K_{AV}^{1/2}$ realizando-se um ajuste linear na curva obtida de forma que:

$$Rs = a(-\log K_{AV}^{1/2}) + b \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde,

R_s = Raio de Stokes;

a = Coeficiente angular;

K_{AV} = coeficiente de partição;

b = Coeficiente linear;

Assim, o valor experimental de R_s pôde ser comparado ao valor teórico para uma esfera de mesma massa, que é calculado por meio da sequencia de aminoácidos (LEBOWITZ, LEWIS, SCHUCK, 2002) pelo programa Sednterp. Dessa forma o valor do coeficiente friccional (f/f_0) pode ser determinado pela razão do raio de Stokes experimental pelo raio de Stokes teórico para uma esfera de mesma massa, esse valor permite avaliar a assimetria da proteína, quanto maior que 1 for esse valor mais assimétrica ou alongada é a proteína.

3.2.5 Ultracentrifugação analítica

Os ensaios de ultracentrifugação analítica usando o método de velocidade de sedimentação, foram realizados em um equipamento Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge (BECKMAN COULTER) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/Campinas), em temperatura constante de 7 °C, utilizando o rotor AN-60Ti (BECKMAN COULTER). A absorbância em função do raio posicional da amostra foi medida em comprimento de onda de 236 nm e concentração de proteína de 300 à 580 µg/mL. A velocidade utilizada no experimento foi de 30.000 rpm em tampão TKP.

O software SedFit (Versão 12.1) foi usado para ajustar a curva de absorbância *versus* raio posicional do rotor, que gerou uma curva de distribuição continua $c(S)$ em função do coeficiente de sedimentação (SCHUCK et al., 2002). O coeficiente de sedimentação em condições padrão ($s_{20,w}$) foi determinado para todas as curvas referentes a cada concentração de

proteína utilizada, admitindo a viscosidade do tampão ($\eta = 1.0 \times 10^{-2}$ poise), densidade ($\rho = 0.99823$ g/mL) e volume parcial específico da mortalina ($V_{\text{bar}} = 0.7336$ mL/g), todos esses parâmetros determinados pelo programa Sednterp. Utilizando o $s_{20,w}$ para cada concentração da proteína foi possível calcular o coeficiente de sedimentação padrão ($s_{20,w}^0$), que é um parâmetro intrínseco da partícula, para tanto, extrapolou-se a concentração da proteína por regressão linear à 0 mg/mL (Borges & Ramos, 2011).

Com os dados de $s_{20,w}^0$ e usando o valor de R_s pode-se calcular a MM da mortalina (BORGES e RAMOS, 2011), utilizando a seguinte expressão:

$$MM = \frac{sR6\pi\eta R_s}{k_B(1 - V_{\text{bar}}\rho)} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

onde,

R = constante dos gases;

R_s = raio de Stokes;

K_B = constante de Boltzmann;

η = é a viscosidade;

V_{bar} = volume parcial específico da partícula;

ρ = densidade do solvente;

s = coeficiente de sedimentação.

3.2.6 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A técnica de SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo – Small angle X-ray scattering) foi empregada para averiguação da monodispersividade do sistema, determinação de parâmetros de forma e reconstrução de um modelo *ab initio* da mortalina. A técnica pode fornecer parâmetros ligados a forma da partícula espalhadora, bem como, parâmetros relacionados a interação, no caso, proteína-proteína, como pode ser observado pela equação geral simplificada (BARBOSA et al., 2013):

$$I(\vec{q}) = P_{\text{eff}}(\vec{q})S_{\text{eff}}(\vec{q}) \quad \text{(Equação 3.7)}$$

onde,

$P_{\text{eff}}(\vec{q})$ = Parâmetro relacionado com o espalhamento da partícula (proteína), permite determinação de parâmetros de forma;

$S_{eff}(\vec{q})$ = Parâmetro relacionado com interações partícula-partícula ou proteína-proteína);

Em caso de sistemas monodispersos e diluídos podemos considerar a fração $S_{eff}(\vec{q})$ como sendo 1, e nesse caso pode-se utilizar a curva de SAXS para determinação de parâmetros de forma, e a equação pode ser descrita da seguinte forma (BARBOSA et al., 2013):

$$I(q) = n(\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q) \quad \text{(Equação 3.8)}$$

onde,

$(\Delta\rho)$ = densidade eletrônica da proteína menos a densidade eletrônica do solvente;

V_p = Volume de dispersão das partículas.

Assim, podemos utilizar a aproximação de Guinier para determinar o raio de giro (R_g) e o $I(0)$ que pode ser utilizado para calcular a massa molecular da partícula espalhadora (BARBOSA et al., 2013). O R_g pode ser definido como sendo a raiz quadrada da distância quadrática média entre os elétrons da partícula e o centro de massa eletrônico do objeto espalhador, e é dado pela seguinte equação:

$$I(q \rightarrow 0) = I(0) e^{\frac{-R_g^2 q^2}{3}} \quad \text{(Equação 3.9)}$$

Ainda com as curvas de SAXS é possível obter a curva da $p(r)$ que consiste em uma “função de distribuição de distâncias” que fornece dados sobre a dimensão total da proteína (D_{max}). Além de possibilitar a reconstrução de modelos de baixa resolução para o sistema espalhador de raios-X.

Alguns programas fornecem uma interface “amigável” para cálculo da $p(r)$ a partir das curvas de espalhamento no espaço recíproco (SVERGUN, 1992). Em geral os programas se utilizam de ferramentas matemáticas (transformada de Fourier) para o cálculo da $p(r)$ (BARBOSA et al., 2013):

$$p(r) = \left(\frac{1}{2\pi^2}\right) \int_0^\infty I(q)(qr)^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad \text{(Equação 3.10)}$$

Assim, os experimentos SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP, Brasil) utilizando um feixe de raios-X monocromático (comprimento de onda de $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) da linha D02A-SAXS1. A distância amostra para o detector utilizada foi de $\sim 1000 \text{ mm}$, que corresponde a um vetor de espalhamento numa escala de $0.15 < q < 0.35 \text{ \AA}^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor- q definido por $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ (com 2θ como o ângulo de espalhamento). As amostras foram colocadas em um porta amostra de caminho óptico de 1 mm sendo a cela formada por duas janelas de mica. As curvas de espalhamento foram obtidas com a proteína em uma concentração de $(0,6 \text{ mg/mL})$, na presença e ausência de ligantes (ATP e ADP na presença e ausência de 2 mM MgCl_2), preparadas em tampão TKP. As amostras e tampões foram submetidas a medidas de espalhamento de raios-X de 100 s , as curvas de espalhamento obtidas foram corrigidas para escala absoluta (cm^{-1}) e, posteriormente, descontou-se os respectivos brancos de cada amostra. Utilizando a aproximação de Guinier foi possível determinar o raio de giro (R_g) e extrapolar o valor de $I(0)$, e com esse valor foi possível estimar a MM da mortalina, tendo assim um parâmetro que indica o estado de dispersão do sistema evidenciando a presença de oligômeros ou agregados.

O programa GNOM (SVERGUN, 1992) foi utilizado para conversão dos dados para o espaço real e a criação da $p(r)$ que posteriormente foi utilizada como arquivo de entrada para o programa DAMMIN (SVERGUN, 1999) utilizado na construção de modelos *ab initio* para a mortalina. Foram construídos 20 diferentes modelos *ab initio* para a mortalina e utilizou-se o pacote de programas DAMAVER para criar a média desses modelos (VOLKOV e SVERGUN, 2003). O modelo final foi finalmente analisado pelo software HydroPro (DE LA TORRE et. al., 2000) para predição das propriedades hidrodinâmicas do modelo proposto e comparação com os dados experimentais.

3.3 Ensaios Funcionais

3.3.1 Calorimetria de titulação isotérmica

A interação da mortalina com nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) foi investigada por calorimetria de titulação isotérmica (*isothermal titration calorimetry*, ITC) usando um microcalorímetro iTC200 (GE Healthcare LifeSciences). A mortalina foi preparada em TKP assim como os ligantes. Vinte e Seis alíquotas de $1,5 \text{ \mu L}$ de nucleotídeos adenosina ($100\text{-}200 \text{ \mu M}$) foram injetados em $203,8 \text{ \mu L}$ de mortalina à $10\text{-}15 \text{ \mu M}$. A variação na entalpia aparente (ΔH_{app}) para cada injeção foi calculada pela integração da área do pico de cada injeção obtido para um dado período de tempo. Os resultados foram analisados pelo software Microcal Origin, fornecido pela fabricante, usando um sítio de ligação para ajustar a curva, calculando assim a

ΔH_{app} , coeficiente estequiométrico (n) e, constante de associação (K_A). O calor envolvido com a injeção do titulante no tampão foi subtraído do termograma para cada interação. A energia livre de Gibbs de ligação aparente (ΔG_{app}) e a variação de entropia de ligação aparente (ΔS_{app}) foi calculado pela equação 2.11:

$$\Delta G_{app} = -RT \ln K_A = \Delta H_{app} - T\Delta S_{app} \quad \text{(Equação 3.11)}$$

3.3.2 Atividade ATPásica

As medidas da atividade ATPásica da mortalina foram realizadas por espectrofotometria usando o Kit de ensaio de fosfato livre EnzChek® (Invitrogen). Este kit permite a determinação da quantidade de fosfato inorgânico (P_i) após a hidrólise do ATP promovida pela mortalina, e isso pode ser medido de acordo com uma curva de calibração contendo P_i variando de 10 à 100 μM . A mortalina (2 μM), foi preparada em tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de β -mercaptoetanol e 2 mM de $MgCl_2$, em presença de ATP (0 à 2 mM) por 90 min à 37 °C. O controle negativo foi realizado na presença de ATP apenas no tampão descrito acima. As amostras contendo P_i hidrolisado a partir do ATP foram incubadas com 0,2 U de purina nucleosídeo fosforilase (PNP) e 0,2 μM de MESG, um substrato cromogênio. Após 30 min de incubação da solução com PNP e MESG a 23 °C, a absorbância foi medida em 360 nm. A quantidade de fosfato liberado por minuto pela mortalina foi graficada contra a concentração de ATP (μM), e um ajuste de a Michaelis–Menten foi aplicado para obtenção dos parâmetros cinéticos usando o software Origin 8.1.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{(Equação 3.12)}$$

Onde,

v = Velocidade da reação;

V_{max} = Velocidade máxima;

$[S]$ = Concentração do substrato;

K_m = Constante de Michaelis-Menten.

O efeito da estimulação de uma proteína cliente na atividade ATPásica da mortalina e da Hsp70-1A foi testada na presença do peptídeo NR (NRLLLTGY). As proteínas foram incubadas na presença de 2 mM de $MgCl_2$ por 15 min a temperatura ambiente e posteriormente incubadas com 1 mM ATP por 90 min à 37 °C na presença de concentrações crescentes do peptídeo NR, e a concentração de P_i liberado foi mensurado como mencionado acima. A

concentração do peptídeo foi determinada pela absorbância do aminoácido tirosina (Y) estrategicamente adicionado ao no C-terminal da construção do peptídeo.

3.3.3 Atividade chaperona da mortalina

A atividade chaperona da mortalina foi testada analisando a habilidade da mesma em prevenir a agregação da Luciferase. As amostras contendo luciferase a 0,8 μM na ausência e presença de concentrações crescentes de mortalina, foram incubadas por 2 h à 37°C, em tampão TKP. Como controle para os experimentos, a luciferase à 0,8 μM foi incubada à 37°C com albumina de soro bovino (BSA) à 0,8 μM . A propensão de agregação da mortalina (0,8 μM) também foi testada na temperatura descrita na presença e ausência de BSA.

Os dados foram analisados pela modificação da absorbância relativa ao espalhamento de luz à 340 nm, que representa a prevenção da agregação da proteína molelo pela mortalina.

3.3.4 Cinética de Agregação da mortalina

Os ensaios de agregação da mortalina foram realizados analisando a propensão da mesma em agregar em diversas temperaturas 30, 34, 37, 42 e 47°C, variando também a concentração de proteína de 2 à 10 μM em tampão TKP, o mesmo teste foi realizado com sua homóloga citoplasmática, a Hsp70-1A. As amostras contendo a mortalina, variando a concentração de 2 à 10 μM , foram submetidas a temperaturas supra citadas durante um intervalo de 200 min. O comprimento de onda monitorado foi em 340 nm em UV-Vis. As amostras, após submetidas a 200 min em diversas temperaturas, foram imediatamente analisadas por gel filtração analítica para observar o aparecimento de outras espécies oligoméricas em solução.

Segundo KURGANOV (2002) a agregação pode ser considerada como um processo de reação irreversível onde existe a participação de n moléculas de proteína não agregada, podendo ser descrita pela reação que segue:

Onde, P_{agg} representa a forma da proteína agregada e k a constante da reação de ordem n .

Se a agregação é monitorada pelo aumento da absorbância (A), esse aumento é acompanhado pelo aumento da quantidade de proteína agregada em solução. Se A é proporcional a quantidade de proteína agregada, as proporções de proteína agregada e não agregada podem ser dadas por A/A_{lim} e $(1-A/A_{lim})$ (onde A_{lim} representa a A quando o tempo $t \rightarrow \infty$), assumindo essas suposições é possível descrever o processo cinético de agregação como se segue (Kurganov, 2002):

$$\frac{d(A)}{d(t)} = nk \frac{[P]_0^{n-1} (A_{lim} - A)^n}{A_{lim}^{n-1}} \quad \text{(Equação 3.13)}$$

Onde,

$[P]_0$ = concentração molar inicial de proteína não agregada.

Analisando a equação 2.13 observamos que existe um caso especial para a expressão para reações que seguem uma cinética de ordem 1 ($n = 1$) nesse caso a expressão pode ser descrita como:

$$A = A_{lim} \{ 1 - \exp^{[k_1(t - t_0)]} \} \quad \text{Equação (3.14)}$$

Onde,

t_0 = valor de t quando $A = 0$.

Sendo assim, curvas que admitem um ajuste matemático que siga a equação 2.14 permitem que a constante observada da reação de agregação estudada (k_1) seja estimada, em diversas concentrações e diversas condições experimentais e, a partir desses dados, outras constantes podem ser calculadas.

4 RESULTADOS

4.1 Indução, Expressão e Purificação da Mortalina

A Figura 4.1 representa a coexpressão da mortalina com sua co-chaperona hHep1, os dados apresentados na Figura 4.1 resumam a necessidade da hHep1 para a solubilização da mortalina.

Nota-se que a mortalina na ausência da hHep1 é induzida em alta quantidade, no entanto, apresenta-se na fração insolúvel do lisado bacteriano (canaleta 4), enquanto a canaleta que representa a fração sobrenadante (5) não mostra a presença de mortalina solúvel (ou em quantidade muito baixa). Quando coexpressa na presença da hHep1 pode-se observar que, tanto a hHep1 quanto a mortalina são induzidas e que a fração pellet (8) apresenta baixa quantidade de mortalina, em contrapartida a fração sobrenadante apresenta grande quantidade de mortalina solúvel. Esses dados revelam a importância da co-chaperona hHep1 para a expressão e manutenção da mortalina na fração solúvel (SICHTING et al. 2005; BOHNERT et al. 2007; GOSWAMI, CHITTOR e D´SILVA, 2010; DORES-SILVA et al., 2013).

Figura 4.1 A hHep1 foi eficaz na solubilização da mortalina humana recombinante. A Mortalina foi expressa sozinha (canaletas 2–5) e coexpressa com a hHep1 (canaletas 6–9). (1) padrão de MM; (2) fração não induzida; (3) fração induzida; (4) pellet; e (5) sobrenadante; (6) fração não induzida da coexpressão; (7) fração induzida da coexpressão; (8) fração pellet da coexpressão; (9) fração sobrenadante da coexpressão.

FONTE: Retirado de: DORES-SILVA, P. R., MINARI, K., RAMOS, C. H. I., BARBOSA, L. R. S., AND BORGES, J. C. (2013) Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: An essential mortalin co-chaperone. *Int. J. Biol. Macromol.* 56, 140-148.

Uma vez provado a necessidade da hHep1 para a obtenção da mortalina na fração solúvel do induzido bacteriano seguiu-se como descrito em 3.2.1, onde a mortalina recombinante foi co-expressa na presença da hHep1, sendo esta expressa pelo vetor de expressão pET23a::hHep1, para facilitar a purificação da mortalina. A mortalina foi expressa com uma His-Tag fusionada ao N-terminal, e dessa maneira, a purificação se realizou primeiramente por cromatografia de afinidade ao níquel. Após a cromatografia de afinidade ao níquel houve adição de fosfatase alcalina para eliminar traços de nucleotídeos de adenosina (BORGES e RAMOS, 2006) e seguiu-se a cromatografia de exclusão molecular preparativa. A identificação e o sucesso da purificação da mortalina recombinante foram acompanhados por SDS-PAGE (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Gel de SDS-PAGE 12% para a expressão, indução e purificação da mortalina na presença e na ausência da hHep1. 1) Padrão de massa molecular; 2) fração não induzida mtHsp70; 3) fração induzida mtHsp70; 4) pellet mtHsp70; 5) sobrenadante mtHsp70; 6) purificação por afinidade ao níquel da mtHsp70; 7) purificação por exclusão por tamanho da mtHsp70.

FONTE: Autoria própria

Como observado pela Figura 4.2, obteve-se sucesso na purificação da mortalina. A co-expressão levou a obtenção da proteína na fração solúvel com um alto grau de pureza (acima de 95%) e, ainda, possibilitou a obtenção da mortalina na fração monomérica e em outras frações oligoméricas como mostrado na Figura 4.3. Segundo ZHAI et al. (2008), a hHep1 expressa na ausência de proteína de fusão ocorre com baixo rendimento, entretanto permite a solubilização e purificação da mortalina. Como pode ser observado na Figura 4.2, a superexpressão da hHep1 a partir do vetor pET23a não foi detectável assim como a sua presença nas amostras puras de mortalina (canaleta 6 e 7).

Nota-se na Figura 4.3 que a mortalina após o passo de afinidade ao níquel elui na CEMa como diversas frações oligoméricas, representadas pela linha vermelha, sendo que a fração monomérica (4), descrita como fração ativa das Hsp70 e que promove interação com nucleotídeos adenosina (BORGES e RAMOS, 2009; BORGES e RAMOS, 2006), foi usada nos ensaios estruturais e funcionais. Também foi observada a presença de possíveis frações triméricas e diméricas (2) e (3), respectivamente, além da fração (1) que eluiu no volume morto da coluna e deve representar agregados proteicos da mortalina. Cabe salientar que as frações representantes dos picos (1), (2) e (3) também foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12% os resultados obtidos para essas análises apontam que estas frações apresentam mais de 95% de pureza. Esses dados revelam que todas as frações obtidas na CEMa (bem como na cromatografia de exclusão molecular preparativa) são referentes a mortalina recombinante e que esta proteína, assim como outras proteínas dessa família, apresenta um perfil de formar oligômeros em solução (BORGES e RAMOS, 2006).

O fato de formar oligômeros em solução torna a purificação dessa proteína um processo nada trivial, sendo esse processo de oligomerização é concentração dependente e para controlá-

lo foi necessário um controle de temperatura durante todos os passos de purificação bem como lise de volumes menores de pellet bacteriano (ver seção 3.1).

Figura 4.3 – Cromatografia de exclusão molecular (CEMa) realizada para a mortalina após cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} (linha vermelha), mostrando o perfil de eluição em quatro frações, sendo que a fração 4 representa a fração monomérica. A linha azul representa a mortalina na fração 4 que foi recolhida e posteriormente re-injetada. O padrão de MM está representado pela linha preta. A linha pontilhada na vertical representa o volume de eluição para a mortalina na fração monomérica.

FONTE: Autoria própria

Observa-se ainda na Figura 4.3 o perfil de migração na CEMa da fração (4), fração monomérica (linha azul), mostrando que a proteína após separação cromatográfica preparativa permanece em solução na forma de monômero, eluindo similarmente à BSA que apresenta MM_{app} de 67 kDa. Os resultados apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3 inferem o sucesso da purificação da proteína e fornece suporte para afirmar que a fração selecionada para estudos estruturais e funcionais apresenta-se com alto grau de pureza e como uma única fração, possivelmente monomérica.

4.2 Avaliação da presença de estruturas secundária e terciária

O próximo passo foi realizar a confirmação de que a proteína recombinante havia sido expressa e purificada enovelada corretamente, apresentando estrutura secundária e terciária. Para essa confirmação usou-se como técnicas o CD e a fluorescência intrínseca do triptofano.

A Figura 4.4 apresenta um espectro de CD para a proteína bem como espectros de fluorescência intrínseca do triptofano, com excitação a 280 nm, na presença e ausência de 8 M de ureia, ambos na concentração de 5 μ M de mortalina. Os resultados apresentados fornecem informações sobre a quantidade de estrutura secundária da mortalina e do ambiente químico do único resíduo de triptofano que a ela possui.

A Figura 4.5 (A) representa o espectro de CD para o mortalina normalizado para $[\Theta]$ onde dois mínimos podem ser observados um em 208 e o outro em 222 nm e um máximo em 192 nm, que é característico para proteínas contendo hélices α e folhas- β como estrutura secundária. O programa CDNN foi utilizado para realizar a deconvolução do espectro de CD e obter as percentagens de estrutura secundária da mortalina que foram: 33% de α -hélice, 15% de folha- β , 18% de voltas e 35% de estrutura desordenada (erro < 5%). Valores similares são reportados para a Hsp70 citosólica humana (BORGES e RAMOS, 2006) mostrando a viabilidade do processo proposto LUO et al. (LUO et al., 2010) reportam a obtenção da mortalina por meio de reenovelamento químico a partir de corpos de inclusão. Os dados obtidos, como por exemplo, o espectro de CD, diferem dos espectros característicos encontrados para as Hsp70, sugerindo que a proteína recombinante obtida, pela técnica então empregada, não se apresentava em sua forma nativa, sendo que estudos similares foram reportados por BOSWELL-CASTEEL (2014). Ademais, experimentos abordando o estado oligomérico da mortalina, no trabalho em questão, não foram apresentados, o que dificulta a afirmação da obtenção da proteína recombinante nativa, livre de formas oligoméricas. Neste sentido, este trabalho é o primeiro, no que tange nosso conhecimento, a trazer a luz a aspectos estruturais e funcionais da mortalina.

A mortalina possui um único triptofano localizado no DLN. A emissão de fluorescência da proteína nativa e na presença de 8 M de ureia (Figura 4.4 B) foi investigada. Em condições nativas observa-se que a proteína possui um λ_{max} e $\langle\lambda\rangle$ de 337 ± 1 nm e $346,1 \pm 0,2$ nm, respectivamente. No entanto, quando da presença de 8 M ureia a mortalina apresentava-se desnaturada, assim observou-se uma supressão na fluorescência e uma alteração no espectro de emissão para o vermelho, com λ_{max} e $\langle\lambda\rangle$ mudando para 349 ± 1 nm e $351,8 \pm 0,2$ nm, respectivamente.

Esses resultados sugerem que o único triptofano presente na mortalina se apresenta parcialmente exposto ao solvente. Juntos os resultados apresentados nas Figuras 4.4 (A) e 4.4 (B) indicam que a mortalina foi obtida no estado enovelado.

Figura 4.4 – Espectros de CD e Fluorescência. (A) Espectro de CD mostrando que a proteína apresenta estrutura secundária formada por 33% de α -Hélice e cerca de 15% de estrutura β . (B) Espectros de fluorescência: comprimento de onda de excitação em 280 nm, os dados mostram que o único resíduo de triptofano (Trp) se apresenta parcialmente exposto ao solvente, apresentando λ_{max} e $\langle\lambda\rangle$ de 337 ± 1 e $346,1 \pm 0,2$ nm, respectivamente. Na presença de 8 M ureia, o espectro de fluorescência intrínseca muda e λ_{max} e $\langle\lambda\rangle$ passam a ser de 349 ± 1 e $351,8 \pm 0,2$ nm, respectivamente.

FONTE: Autoria própria

4.3 Ensaios Hidrodinâmicos

A próxima pergunta a ser respondida era se a fração da proteína selecionada se apresentava apenas como monômero, ou na forma de outras espécies oligoméricas, para responder a esta pergunta optou-se primeiramente por se realizar uma CEMa (Figura 4.3) e posteriormente por realizar análises de UCA para determinar com precisão o estado oligomérico da proteína.

A Figura 4.5 (A) apresenta a curva de raio de Stokes (R_s) para o padrão de proteínas *versus* o coeficiente de partição (K_{av}) obtido por CEMa para este padrão. Por meio de interpolação neste gráfico do valor de K_{av} obtido para a mortalina foi possível calcular R_s de 35 ± 2 Å para a mesma. Utilizando esse valor com o valor encontrado para uma partícula esférica de mesmo tamanho estimou-se o coeficiente friccional f/f_0 de 1,3. Esses resultados sugerem que a proteína seria um monômero ligeiramente alongado em solução.

Para melhor compreender as propriedades hidrodinâmicas da mortalina realizaram-se ensaios de velocidade de sedimentação por UCA. A Figura 4.5 (B) representa as curvas de

função de distribuição $c(S)$ para a fração monomérica da mortalina. Essas espécies se comportaram principalmente como um monômero de 76 ± 4 kDa, com um valor de $s_{20,w}^0$ de $4,8 \pm 0,1$ S (Figura 4.5 (B) – *inserto*), nas condições testadas. O valor do f/f_0 foi estimado pelo software SedFit sendo $1,36 \pm 0,04$, este valor está de acordo com o sugerido experimentalmente por CEMa. Dados similares foram reportados para a Hsp70-1 (BORGES e RAMOS, 2009). Finalmente, os ensaios hidrodinâmicos confirmam que a fração purificada da mortalina representa sua fração monomérica em solução e sugerem que a proteína tem formato ligeiramente alongado em solução. Entretanto, existe a presença de frações oligoméricas nos dados de UCA, que podem ser devido ao longo tempo experimental.

Utilizando a Equação 3.6 foi possível determinar a MM da mortalina com grande precisão sendo esta de $69,7 \pm 0,3$ kDa muito próximo ao valor teórico de 70,7 kDa. Confirmando assim que a principal espécie encontrada em solução se refere a da mortalina na forma de monomérica.

Figura 4.5 – Mortalina se comporta como um monômero alongado em solução. A) Estimativa do R_s baseado nos resultados de CEMa Figura 4.3. O gráfico apresenta os R_s do padrão de proteínas em função do coeficiente k_{av} , por interpolação obtivemos o valor R_s para a mortalina de 35 ± 2 Å. B) Os dados de velocidade de sedimentação forneceram a distribuição $c(S)$ da mortalina em cada concentração de proteína testada. A proteína se comportou, principalmente, como uma espécie monomérica de 76 ± 4 kDa e fator friccional f/f_0 de $1,36 \pm 0,04$ nas condições testadas (ver secção 2.2.5). Como inserto: determinação do $s_{20,w}^0$ da mortalina por meio da dependência da $s_{20,w}$, com a concentração de proteína. A Mortalina apresentou um valor de $s_{20,w}^0$ de $4,8 \pm 0,1$ S.

FONTE: Autoria própria

4.4 Espalhamento de Raios-X a baixo Ângulo e Modelagem

Para obter mais informações sobre a estrutura da mortalina em solução foram utilizados ensaios de SAXS. Cabe ressaltar que para esses ensaios a purificação da proteína foi realizada no laboratório do Profº Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos, no IQ da UNICAMP em Campinas, e após a purificação a proteína recém-purificada foi imediatamente levada a linha de SAXS

para coleta de dados. Isso se fez necessário para garantir que a proteína a ser analisada estivesse em seu estado nativo, pois essa proteína possui grande propensão a formar espécies oligoméricas, que afetam diretamente as medidas de SAXS em um intervalo de tempo curto (24-48 horas). Dessa forma, a proteína recém-obtida também não foi concentrada, uma vez que esse procedimento também dispara processos de oligomerização (Figura 4.12). A Figura 4.6 (A) mostra a curva de espalhamento experimental da mortalina na concentração de 0,5 mg/mL com o ajuste do GNOM.

Figura 4.6 – Dados de SAXS para a mortalina. (A) Curva de SAXS experimental da mortalina (círculos abertos), sugerindo que se comportava como um sistema monodisperso, que pode também ser avaliada pela região da curva de Guinier (inserto). O ajuste GNOM é representado pela linha preta. Através de lei, o gráfico de Guinier (linha vermelha - inserção), a mortalina apresentou um R_g de $36 \pm 2 \text{ \AA}$ (ver texto para detalhes). (B) A curva de SAXS para a mortalina foi usada para gerar a $p(r)$ (curva de distribuição de distâncias) que indicou que a mortalina possui forma alongada e D_{max} de $130 \pm 10 \text{ \AA}$.

Fonte: Autoria própria.

É bem conhecido que alguns importantes parâmetros sobre as partículas em solução podem ser obtidos diretamente da curva de espalhamento tais como: raio de giro (R_g), e MM, admitindo $I(q \rightarrow 0)$ da curva de espalhamento pela lei de Guinier (Equação 4.9). Os resultados revelam que o R_g para a mortalina foi de $36 \pm 2 \text{ \AA}$. Utilizando ainda a Lei de Guinier foi possível estimar o $I(0)$ da mortalina (Figure 4.6 (A) inserto) e usando este valor foi possível calcular a MM que foi de $66 \pm 2 \text{ kDa}$. Esse resultado está de acordo com a MM da mortalina como

monômero tal como pode ser observado pela Tabela 4.1. Portanto, os experimentos de SAXS sugerem que existe um sistema monodisperso correspondente a mortalina como um monômero em solução, o que se encontra de acordo com os demais dados experimentais.

Utilizando o programa GNOM foi possível obter a $p(r)$ e, o resultado está apresentado na Figura 4.6 (B), como pode ser observado o ajuste do GNOM forneceu uma excelente aproximação com a curva de espalhamento experimental (Figura 4.6 (A)), o valor de $D_{\max}$ da mortalina foi de 130 ± 10 Å, mostrando que a mortalina possui um formato ligeiramente alongado, como já descrito em 3.3.

Por meio da $p(r)$ calculada pelo programa GNOM e admitindo um sistema monodisperso, pode-se propor um modelo *ab initio* da mortalina, que seria um modelo em baixa resolução da estrutura nativa da proteína. Para criação dos modelos *ab initio* foi utilizado o software DAMMIN (SVERGUN, 1999). Foram criados 20 modelos independentes que foram então submetidos ao pacote de programas DAMAVER, permitindo a criação de um modelo global ou final utilizando os modelos DAMMIM gerados (Figura 4.7), sendo que os modelos utilizados na somatória para criação do modelo final apresentaram discrepância espacial normalizada (NSD) de 0,7, sugerindo a qualidade dos 20 modelos individuais. O modelo final gerado pelo DAMAVER foi então submetido ao programa Hydropro que forneceu as propriedades hidrodinâmicas do mesmo.

Tabela 4.1 - Propriedades Hidrodinâmicas previstas, obtidas experimentalmente e calculadas para o modelo *ab initio* proposto por SAXS.

Propriedades Estruturais e Hidrodinâmicas da Mortalina	Predição para uma Esfera		Determinação Experimental			
	Monômero	Dímero	CEM	UCA	SAXS	HydroPro
M (kDa)	70,7	141,4	75 ± 4	76 ± 4	66 ± 2	-
$s_{20,w}^0$ (S)	6,1	9,6	-	$4,8 \pm 0.1$	-	$4,9 \pm 0.2$
R_s (Å)	27	34	34 ± 2	-	-	34(3)
f/f_0	-	-	1,26	1,36	-	$1,3 \pm 0.1$
R_g (Å)	-	-	-	-	36 ± 2	33 ± 2
$D_{\max}$ (Å)	-	-	-	-	130 ± 10	116 ± 3

FONTE: Adaptado de *Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CHI, Borges JC (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS ONE 10(1): e0117170.*

A Tabela 4.1 apresenta as propriedades hidrodinâmicas obtidas por meio das diversas técnicas empregadas e para o modelo *ab initio* proposto, nota-se que todos os parâmetros hidrodinâmicos estão de acordo, tanto para as diversas técnicas quanto para o modelo em baixa

resolução proposto, sugerindo assim uma boa concordância do modelo obtido com a proteína encontrada em solução.

A Figura 4.7 apresenta o ajuste manual das estruturas cristalográficas da mortalina DLN (acc. no. 4KBO), obtidos no estado apo (AMICK et. al., 2014), e DLP da DnaK de *E. coli* (acc. no. 1DKX) ligado a um peptídeo sintético no sítio de ligação do peptídeo (ZHU et al., 1996), sobreposto ao modelo *ab initio*. Este ajuste sugere que o modelo *ab initio* é adequado para acomodar tanto DLN quanto o DLP da Hsp70, mesmo considerando que o modelo foi gerado a partir da curva de SAXS na condição da proteína apo. A estrutura cristalográfica completa da DnaK de *E. coli* (PDB acc. n. 4B9Q), obtida ligada a ATP e com o PDB em conformação aberta, foi utilizada para o ajuste manual no modelo *ab initio* (Figura 4.7 (C)), indicando que ambos têm dimensões semelhantes. No entanto, como pode ser visto na Figura 4.7 (C), o modelo *ab initio* para a mortalina não acomoda perfeitamente algumas porções da estrutura cristalográfica. Esta discrepância é provavelmente devido à dinâmica da proteína em solução.

Vale a pena ressaltar que, do ponto de vista de SAXS, a curva de espalhamento é uma média ponderada de todas as conformações da proteína presentes em solução, sendo assim uma média de todas as conformações que a proteína pode adquirir em solução (BARBOSA et. al., 2013).

Figura 4.7 – Modelo *ab initio* para a mortalina. A curva de SAXS da mortalina foi utilizada para o cálculo de 20 modelos de baixa resolução por meio do programa DAMMIM, que foram sobrepostos pelo pacote DAMAVER. O modelo *ab initio* final é apresentado em várias orientações. (A). Superposição manual da estrutura cristalográfica do domínio DLN da mortalina (PDB acc. nº. 4KBO - magenta) e DLP da DnaK de *E. coli* (PDB acc. nº. 1DKX - azul) com o modelo *ab initio*. (B). Superposição manual da estrutura cristalográfica da DnaK de *E. coli* (PDB acc. nº. 4B9Q - azul) com o modelo *ab initio* proposto. (C). Figuras geradas pelo software UCSF Chimera (version 1.9).

FONTE: *Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CHI, Borges JC (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS ONE 10(1): e0117170.*

Além disso, não é possível negligenciar a possibilidade de que ambas as estruturas, representada por DnaK de *E. coli*, em que o PBD na conformação aberta (APO acc. n. 4B9Q) (Figura 4.7 (B)) e na conformação fechada (APO acc. n. 2KHO) (Figura 4.7 (A)) estejam simultaneamente presentes na solução em equilíbrio dinâmico. Assim, a fim de verificar a existência de tal possibilidade, utilizou-se as estruturas da DnaK (Figura 4.7 (C)) e o software Genfit para averiguar se as combinações destas estruturas estão presentes na solução. A curva

de SAXS para a mortalina também foi ajustada supondo esta metodologia (Figura 4.7 (D)), sendo que, a curva em destaque na Figura 4.7 (D) representa o ajuste encontrado pelo Genfit (SPINOZZI, 2014), considerando as curvas de SAXS obtidas a partir dos PDBs da DnaK, que melhor descreve os dados experimentais obtidos.

Figura 4.8 – Percentagem de conformação aberta e fechada da mortalina em solução. (A) PDB DnaK conformação fechada 2KOH; (B) PDB DnaK conformação aberta 4B9Q; (C) Curvas de espalhamento obtidas a partir dos PDB da DnaK na conformação aberta e fechada; (D) Ajuste do Genfit utilizando as curvas de espalhamentos dos molelos PDP sobreposta com os dados experimentais mostrando que a mortalina se apresenta em um equilíbrio dinâmico em solução entre suas duas principais conformações, sendo que esse equilíbrio é deslocado para a conformação fechada (cerca de 85%), enquanto 15% permanece na conformação aberta.

Conformação aberta (2KOH)

(A)

Conformação fechada (4B9Q)

(B)

(C)

(D)

Fonte: Autoria própria.

Os dados sugerem que cerca 85% das moléculas assumiriam a conformação fechada, ao passo que 15% estariam na conformação aberta. Por conseguinte, nas condições testadas, a mortalina humana em solução comporta-se como um sistema em equilíbrio de, pelo menos, duas conformações em que o equilíbrio é deslocado para a conformação fechada.

Investigou-se também as alterações conformacionais da mortalina decorrentes da presença de nucleotídeos adenosina ADP e ATP na concentração de 200 μM , com adição e sem adição de 2 mM de Mg^{2+} por SAXS. Os parâmetros estruturais encontrados estão sumarizados na Tabela 4.2. A Figura 4.9 representa as curvas $p(r)$ na presença de ADP- Mg^{2+} e ATP- Mg^{2+} . Como pode ser observado não houveram variações significativas nos parâmetros analisados, porém as curvas $p(r)$ mostram pequenas alterações no seu perfil. Isso sugere que as condições experimentais empregadas (como concentração de proteína ou ainda o set up do equipamento) não permitiram detectar as alterações conformacionais causadas pelos ligantes (na faixa do vetor q utilizada), ou ainda, que a presença dos ligantes provavelmente desloca o equilíbrio conformacional dos domínios, porém sem modificar significativamente as curvas de SAXS, nas condições testadas.

Tabela 4.2 - Alterações conformacionais da mortalina devido a adição de nucleotídeos de adenosina, na presença e na ausência do co-fator Mg^{2+}

	R_g (Å)	D_{max} (Å)
Mortalina	36 ± 2	130 ± 10
Mortalina + ATP	38 ± 2	160 ± 10
Mortalina + ADP	36 ± 2	160 ± 10
Mortalina + Mg^{2+}	37 ± 2	140 ± 10
Mortalina + ATP-Mg^{2+}	36 ± 2	140 ± 10
Mortalina + ADP-Mg^{2+}	37 ± 2	140 ± 10

FONTE: Autoria própria

Figura 4.9 – Curvas $p(r)$ na presença de ADP- Mg^{2+} e ATP- Mg^{2+} . As curvas $p(r)$ mostram pequenas alterações no seu perfil, no entanto, os parâmetros avaliados permanecem inalterados, sugerindo a técnica não possui resolução suficiente para detectar as alterações conformacionais causadas pelos ligantes, ou ainda, que a presença dos ligantes provavelmente desloca o equilíbrio conformacional dos domínios, porém sem modificar significativamente as curvas de SAXS, nas condições testadas.

FONTE: Autoria própria

De maneira geral os dados de SAXS aqui apresentados permitem concluir que a proteína se comporta como um monômero monodisperso em solução. Além disso, o modelo *ab initio* proposto apresenta elevada concordância com os parâmetros hidrodinâmicos obtidos experimentalmente, como por exemplo, os dados obtidos por UCA (Figura 2.5(B)).

4.5 Alterações da estrutura secundária e terciária da mortalina devido à presença nucleotídeos de adenosina

Investigou-se a alteração na estrutura secundária da mortalina causada pela presença de 200 μM de ligante (ATP ou ADP) com e sem adição do cofator Mg^{2+} 200 μM , os resultados estão apresentados nas Figuras 4.10 (A) e (B). Em adição avaliou-se a alteração na estrutura terciária na presença dos mesmos ligantes e nas mesmas condições descritas anteriormente, os resultados estão apresentados nas Figuras 4.10 (C) e (D).

Figura 4.10 - Espectros de CD e fluorescência para a mortalina na presença e ausência de nucleotídeos de adenosina e Mg^{2+} . (A) Os espectros de CD para a mortalina mostram que a presença de nucleotídeos de adenosina causa uma alteração na estrutura secundária da mesma, o mesmo comportamento se observa para a proteína na presença de nucleotídeos e Mg^{2+} (B). (C) Espectros de fluorescência da mortalina com excitação em 295 nm e presença de Mg^{2+} revelam uma supressão de fluorescência. O mesmo se observa para excitação à 280 nm na presença de Mg^{2+} (D). Dados corrigidos pelo efeito de filtro interno.

(A)

(B)

(C)

(D)

FONTE: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 4.10 (A) e (B), a adição de ATP e ADP causa uma ligeira alteração na estrutura secundária da proteína na presença e ausência de Mg^{2+} , como previamente reportado para a Hsp70-1A citoplasmática humana (BORGES e RAMOS, 2006). Para os espectros de fluorescência observa-se que houve supressão da mesma causada pela presença dos nucleotídeos de adenosina tanto na presença de Mg^{2+} (Figura 4.10 (C) e (D)), como na ausência do cofator.

4.6 Investigando a estabilidade da mortalina

Como outras Hsp70s, a mortalina é formada por dois domínios, como já visto. Para estudar a estabilidade e organização da mortalina, estratégias de desenovelamento foram utilizadas. Investigou-se o desenovelamento químico e térmico seguindo a estrutura secundária, por CD_{222nm}, e a estrutura terciária pela emissão de fluorescência intrínseca do triptofano. A Figura 4.11 (A) representa o desenovelamento químico seguido por CD sugerindo que a mortalina se desenovela em pelo menos três estágios com a primeira transição com $C_{m1} = 1,1 \pm 0,1$ M, segunda $C_{m2} = 3,2 \pm 0,1$ M e terceira $C_{m3} = 5,5 \pm 0,1$ M de ureia. Os resultados para o desenovelamento químico seguido por fluorescência sugere que a proteína desenovela em pelo menos dois estágios (Figura 4.11 (B)), com a primeira transição com $C_{m1} = 3,0 \pm 0,1$ M e a segunda transição com $C_{m2} = 5,5 \pm 0,1$ M de ureia. Interessantemente, a C_{m1} observada para o desenovelamento químico da mortalina monitorado por CD_{222nm} não foi observada no desenovelamento químico seguido por fluorescência. Esta aparente discrepância pode ser explicada devido ao tipo de sonda usada em cada experimento. A sonda CD_{222nm} constitui uma sonda global, enquanto que, a fluorescência intrínseca do triptofano constitui uma sonda local referente ao ambiente químico ao qual o triptofano está exposto. Como descrito anteriormente o único triptofano que a mortalina encontra-se no DLN. O DLP possui um subdomínio α -hélice denominado DLP α , os dados encontrados sugerem que a primeira transição ocorre possivelmente devido ao desenovelamento do DLP α , tal transição pode não ter aparecido nos ensaios de fluorescência devido a falta de uma sonda local nessa região.

A Figura 4.11 (C) e (D) apresentam o desenovelamento térmico da mortalina seguido por CD_{222nm} e seguido por fluorescência com excitação de 295 nm. Na Figura 4.11 (C) observamos duas transições sendo que a primeira representa uma perda de sinal de CD_{222nm} de 20% com T_{m1} centrada em 40,1 °C, que é de 5-6 °C menor do que a reportada para a Hsp70 citoplasmática humana, que possui três transições térmicas (Borges e Ramos, 2006). A segunda transição representa uma perda de aproximadamente 30% de sinal e uma T_{m2} por volta de 72 °C. Interessantemente o sinal de CD_{222nm} mesmo a 95 °C permanece em torno de - 5.000 Deg cm²/dmol, sugerindo que a mortalina ainda apresenta estrutura secundária nesta temperatura mostrando uma alta estabilidade térmica relativa. Alternativamente, isso pode sugerir que a proteína, ao invés de se desenovelar, poderia se reorganizar na forma de espécies oligoméricas ou agregados proteicos. Essa hipótese é suportada pela Figura 4.11 (D) onde observa-se um deslocamento no $\langle\lambda\rangle$ para o azul, de aproximadamente 347 nm para 339 nm. Este dado sugere que o ambiente químico do triptofano se altera e que o mesmo se torna menos exposto ao solvente à medida que a temperatura aumenta.

Avaliou-se ainda o efeito de nucleotídeos de adenosina (200 μM), na presença e ausência de Mg^{2+} (200 μM), na estabilidade térmica da mortalina acompanhada por $\text{CD}_{222\text{nm}}$. A Tabela 4.3 sumariza as T_{ms} estimadas na presença de diferentes combinações de ligante em comparação com a ausência Mg^{2+} . Pode-se observar que ADP ou ATP sozinhos não induziram alterações significativas nas T_{m1} e T_{m2} . Esses resultados estão em contraste com o observado para a Hsp70 citoplasmática humana (BORGES e RAMOS, 2006) onde os nucleotídeos adenosina sozinhos aumentavam a primeira transição térmica seguida por $\text{CD}_{222\text{nm}}$ em condições similares em quase 4 °C. No entanto, a combinação de ATP- Mg^{2+} ou ADP- Mg^{2+} aumentam a T_{m1} da mortalina para 46 °C e 44 °C, respectivamente, um incremento de 4-6 °C na T_{m1} (Tabela 4.3). Esses resultados sugerem que os nucleotídeos adenosina se ligam e estabilizam a estrutura do DLN.

Figura 4.11 – Estabilidade química e térmica. (A) Ensaio de desenovelamento químico acompanhado por $\text{CD}_{222\text{ nm}}$, mostrando que a mortalina apresenta pelo menos três transições bem definidas com C_{ms} de $1,1 \pm 0,1$; $3,2 \pm 0,1$ e $5,5 \pm 0,1\text{ M}$ de ureia respectivamente. (B) Ensaio de desenovelamento químico acompanhado por fluorescência apresentando pelo menos duas transições bem definidas com C_{ms} de $3,0 \pm 0,1$ e $5,5 \pm 0,1\text{ M}$ de ureia, respectivamente. (C) desenovelamento térmico da mortalina em dois estágios com T_{ms} de $40,1 \pm 0,6$ e $73,1 \pm 0,9$ °C, respectivamente. (D) Desenovelamento térmico acompanhado por fluorescência com excitação à 295 nm mostrando que o único triptofano fica menos exposto ao solvente durante o aumento da temperatura. Inserto: os espectros de fluorescência da mortalina à 4 °C e à 90 °C.

FONTE: Autoria Própria.

Tabela 4.3 - Sumário das Tms das transições determinadas para a mortalina por CD222 nm na presença de nucleótidos de adenosina e/ou Mg^{2+}

Mortalina + Aditivos			T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
ATP	ADP	Mg ²⁺		
-	-	-	40,1 ± 0,6	73,1 ± 0,9
200 μM	-	-	41,4 ± 0,8	71,8 ± 1,0
-	200 μM	-	40,4 ± 0,8	71,1 ± 0,6
-	-	200 μM	40,5 ± 0,7	73,9 ± 0,8
200 μM	-	200 μM	46,4 ± 0,6	71,6 ± 0,2
-	200 μM	200 μM	43,7 ± 0,7	70,0 ± 1,1

FONTE: Adaptado de *Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CHI, Borges JC (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS ONE 10(1): e0117170.*

Juntos os experimentos de desenovelamento térmico da mortalina na presença e ausência de nucleotídeos adenosina e do cofator Mg^{2+} indicam que a mortalina apresenta afinidade por nucleotídeos de adenosina e que esta afinidade deve ser similar da Hsp70 citoplasmática humana. No entanto, existem diferenças, a interação da mortalina com ligantes adenosina, aparentemente, é dependente da presença de íons de magnésio. Além disso, a mortalina não atinge a terceira transição térmica reportada para a Hsp70 citoplasmática humana (BORGES e RAMOS, 2006).

4.7 Interações com nucleotídeos de adenosina ATP e ADP

Como membro da família das Hsp70 a mortalina apresenta o DLN com atividade ATPase. Para melhor compreender a dinâmica da interação com nucleotídeos de adenosina, foram realizados ensaios de ITC, visando obter parâmetros termodinâmicos, estequiométricos e de afinidade para interação da mortalina com ADP e ATP.

Para obter a mortalina a 15 μM , concentração necessária para os ensaios por ITC, foi necessário concentrá-la. Mesmo realizando o processo lentamente e com controle de temperatura foi observado que a mortalina sofreu um processo de oligomerização (Figura 4.12). Os dados sugerem que a mortalina após concentração se apresenta com cerca de 80% de fração monomérica e 20% de outras espécies e, sendo assim, o processo de concentração foi sempre monitorado por CEMa. Adicionalmente, a concentração de mortalina para os dados de interação com nucleotídeos adenosina foi ajustada admitindo-se 80% da concentração de mortalina como monômero, sendo esta a fração funcional da mortalina.

Figura 4.12 – Perfil de eluição da mortalina antes e após o processo de concentração. *O calculo da área abaixo do pico mostrou que a mortalina se apresenta com cerca de 80% de fração monomérica e 20% como outras espécies oligoméricas.*

FONTE: Autoria própria

Os termogramas obtidos foram então analisados para cálculo do ΔH , ΔS , constante de afinidade e coeficiente estequiométrico, e os dados obtidos estão sumarizados na Figura 4.12.

Analisando a Figura 4.13, observa-se que ambos os parâmetros entalpia e entropia governam a interação da mortalina com o ADP e com o ATP. O cálculo das K_D mostram que seu valor é de $2,2 \pm 0,1 \mu M$ para o ADP e de $1,1 \pm 0,1 \mu M$ para o ATP, evidenciando assim a alta afinidade da mortalina por esses nucleotídeos. No que tange o coeficiente estequiométrico observamos um valor de 0,9 para a o ADP e 0,8 para o ATP. Sabe-se da literatura que este mesmo coeficiente para outros membros da família das Hsp70 é 1, o que está de acordo devido a existência de um único sítio de interação com nucleotídeos presente na proteína. O valor encontrado de 0,9 e 0,8 pode ser explicado devido ao fato de que uma fração da proteína possivelmente não se encontrava funcional (Figura 4.12), o que é plausível para essa classe de proteínas, que apresenta um grande perfil de agregação. Quanto às diferenças encontradas nos parâmetros ΔH e ΔS , essas diferenças podem ser explicadas pela modificação estrutural da proteína na presença dos ligantes testados.

Figura 4.13 – Interação da mortalina com nucleotídeos de adenosina. (A) Interação com ADP e (B) Interação com ATP.

Fonte: Adaptado de *Dores-Silva, P. R., Barbosa, L. R. S., Ramos, C. H. I., and Borges, J. C. (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLOS ONE, 2015.*

Sabe-se que a presença de ADP desloca o equilíbrio da proteína para uma conformação no qual os DLN e DLP estão desacoplados (Figura 1.2). Tal deslocamento leva a liberação de moléculas de água de solvatação, influenciando diretamente no valor de ΔS , que neste caso foi de aproximadamente 14 cal/mol/deg. Em contrapartida a presença de ATP desloca o equilíbrio conformacional acoplado, liberando uma maior quantidade de moléculas de água, o que faz com que o valor de ΔS seja da ordem de 22 cal/mol/deg, cerca de 60% maior do que o obtido para a interação com ADP, sendo assim, a presença dos nucleotídeos adenosina influenciam diretamente na parcela entrópica da lei termodinâmica. Quanto à entalpia observa-se que esta se apresenta maior na interação com ADP quando comparada com ATP, quase 2,5 vezes maior, o que sugere que o processo de interação com ADP libera uma maior quantidade de energia na forma de entalpia, nesse sentido a ΔG do processo se mantém na mesma ordem de grandeza, sendo de aproximadamente 7600 cal/mol para a interação com ADP e, de aproximadamente 7900 cal/mol para a interação com ATP.

4.8 Determinação da atividade ATPase

A investigação da atividade ATPase da mortalina foi realizada utilizando-se o kit EnzChek® Phosphate Assay Kit (Invitrogen) e após a padronização das condições experimentais (ver item 3.3.1) foi possível obter os parâmetros cinéticos através do tratamento dos dados por meio de um ajuste de Michaelis-Menten (Equação 4.12; Figura 4.14).

Aqui se apresenta a atividade ATPase da mortalina humana e da Hsp70-1A na ausência de co-chaperonas. A Figura 4.13 (A) apresenta a atividade ATPase em função da concentração de ATP assim como a curva ajustada para um ajuste de Michaelis-Menten dos pontos experimentais, tanto para a mortalina quanto para a Hsp70-1A. Pode-se observar que a mortalina apresenta uma atividade ATPase ligeiramente maior do que a Hsp70-1A, como indicado pelo número de renovação molecular (kcat) of $0,151 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ e $0,093 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4.4). No entanto, ambas as proteínas apresentam baixa taxa de hidrólise de ATP. A Tabela 4.4 apresenta diferentes valores para a atividade ATPase de diferentes membros das Hsp70 em diferentes organismos presentes na literatura. Analisando a Tabela 4.4 pode-se observar que a mortalina e a Hsp70-1A apresentam taxas de hidrólise de ATP muito próximas às apresentadas na literatura para outras Hsp70, este fato é absolutamente relevante, uma vez que, indica que essas proteínas devem ser reguladas por co-chaperonas, proteínas clientes e ligantes (SILVA e BORGES, 2011).

Figura 4.14 – Atividade ATPase da mortalina. A mortalina a $2\ \mu\text{M}$ foi incubada com ATP (0 a $2.000\ \mu\text{M}$) durante 90 minutos e a seguir submetida à reação com o substrato do kit para determinação da taxa de fosfato liberado que é proporcional à hidrólise de ATP. A partir do ajuste de Michaelis-Menten foi possível obter os parâmetros cinéticos para a atividade ATPase da mortalina.

Fonte: DORES-SILVA PR, BARBOSA LRS, RAMOS CHI, BORGES JC (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. *PLoS ONE* 10(1): e0117170.

Tabela 4.4 - Determinação das constantes cinéticas para a mortalina humana e Hsp70-1A humana comparadas com dados apresentados na literatura para outras Hsp70 homologas.

Proteína	Atividade Específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Ref.
<i>E. coli</i> DnaK	-	-	$0,087 \pm 0,007$	37	PALLEROS et. al., 1993
		-	0,15	37	MCCARTY E WALKER 1991
<i>E. coli</i> Hsc66	-	12,7	0,083	23	SILBERG E VICKERY 2000
Bovine Hsc70	1,14	1,37	0,15	37	SADIS E HIGHTOWER 1992
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Hsp70B	~ 9	118	-	30	VEYEL et. al., 2014
Yeast Ssa	-	$0,11 \pm 0,04$	$0,031 \pm 0,004$	37	LOPEZ-BUESA; PFUND e CRAIG 1998
Yeast Ssb	-	147 ± 42	$0,81 \pm 0,13$	37	LOPEZ-BUESA; PFUND e CRAIG 1998
Hsp701A humana	$0,62 \pm 0,02$	270 ± 40	$0,093 \pm 0,002$	37	ARAUJO et. al., 2014; DORES-SILVA et al., 2015
Mortalina humana	$0,86 \pm 0,02$	190 ± 20	$0,151 \pm 0,002$	37	DORES-SILVA et al., 2015

Fonte: Adaptado de *Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CHI, Borges JC (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS ONE 10(1): e0117170.*

Especificamente o ciclo funcional das Hsp70 é controlado pelos ligantes ATP/ADP presentes no DLN por um sistema de alosteria bidirecional heterotrópica. Para testar esta alosteria para a mortalina humana e Hsp70-1A foi utilizado o peptídeo NR como um fator estimulante da atividade ATPase. A Figura 4.14 (B) apresenta a atividade ATPase observada para a mortalina e Hsp70-1A em concentrações crescentes do peptídeo NR. Para mortalina, houve um aumento de cerca de 25% na estimulação, alcançado em 100 μ M do peptídeo NR indicando meia concentração efetiva máxima (EC_{50}) de 7 μ M de peptídeo NR. O peptídeo NR estimulou a atividade ATPase da Hsp70-1A cerca de 15%, atingida a 500 μ M de peptídeo NR, resultando em um EC_{50} de 170 μ M. Portanto, ambas as proteínas tiveram a sua atividade ATPase estimulada em níveis semelhantes relatados para a DnaK de *E. coli* (PELLECCHIA et. al., 2000), o que em suma, indica a presença da alosteria acima mencionada. Possivelmente o estímulo realizado pelo peptídeo NR foi relativamente baixo devido a ausência das co-chaperonas que atuam regulando o ciclo de atividade ATPásica (ver Figura 1.2), tais como proteínas de domínio-J (ou Hsp40), que atuam acelerando a hidrólise do ATP, e fatores de troca de nucleotídeos (NEFs), tais como proteínas GrpE (SILVA e BORGES, 2011).

No entanto, as diferenças nos valores de EC_{50} e na estimulação máxima indicam que mortalina e a Hsp70-1A devem apresentar diferenças em termos de especificidade por proteínas clientes.

4.9 DETERMINAÇÕES DA ATIVIDADE CHAPERONA DA MORTALINA SOBRE A LUCIFERASE

A determinação da atividade chaperona da mortalina foi avaliada investigando sua habilidade de prevenir a agregação da luciferase, o ensaio seguiu-se como descrito em 3.3.3, os dados estão sumarizados na Figura 4.15.

Figura 4.15 – Atividade chaperona da Mortalina. *Os dados para a atividade chaperona da mortalina sugerem que ela não é capaz de prevenir a agregação da luciferase sendo que quando se eleva a concentração da mortalina em solução observa-se um aumento no percentual de agregação o que sugere que a própria mortalina pode estar precipitando juntamente com a luciferase.*

FONTE: Autoria própria

Os resultados obtidos para a atividade chaperona da mortalina sobre a luciferase sugerem que ela não é capaz de prevenir a agregação da proteína modelo, sendo que, quando aumentamos a concentração da mortalina em solução observa-se um aumento no percentual de agregação o que sugere que a própria mortalina pode estar agregando juntamente com a luciferase. Isso pode ter ocorrido por diversas razões: ausência de nucleotídeos de adenosina na solução, a mortalina pode necessitar de outras co-chaperonas para exercer sua função, e/ou ainda porque a chaperona em questão pode sofrer um processo de auto agregação concentração dependente.

4.10 Ensaio de auto-agregação da mortalina em diferentes temperaturas e diferentes concentrações

Para melhor compreender o processo de agregação da mortalina em diversas concentrações e temperaturas realizamos ensaios similares ao de atividade chaperona, onde foi monitorado o espalhamento de luz em 340 nm durante cerca de 200 min. Como controle para observar a formação de outras espécies foi realizada, após o tempo de exposição da proteína às diversas temperaturas, o ensaio de gel filtração analítica (ver seção 3.3.4). Os dados para estes ensaios estão sumarizados na Figura 4.16.

A Figura 4.16 mostra que a mortalina apresenta um perfil de agregação que se assemelha a uma exponencial em todos os casos testados (exceção à 30 °C), observa-se ainda que a

quantidade de proteína agregada depende fortemente da concentração de proteína em solução e também da temperatura de exposição. Nota-se ainda que a proteína à 2 μM exposta à 37 °C não apresenta um perfil de significativo agregação, esses dados são importantes, pois, validam os ensaios de atividade ATPase onde a proteína foi exposta a 37 °C por um período de 90 min.

Ademais ensaios realizados com a Hsp70-1A revelaram que esta apresenta uma maior estabilidade frente à temperatura do que a mortalina humana. Avaliando esses resultados com os dados apresentados para o desenovelamento térmico da mortalina acompanhado por fluorescência (4.6), podemos sugerir fortemente que a mortalina apresenta um perfil de auto agregação à temperaturas próximas à 42 °C, sendo assim, esses ensaios iniciais podem representar um caminho para entender os processos onde a alteração estrutural e formação de agregados da mortalina estão inseridos.

A Figura 4.16 D apresenta o perfil cromatográfico da proteína após ser submetida a diferentes temperaturas, nota-se que há a formação de apenas um agregado que eluí no V_0 da coluna sem a formação de intermediários (pelo menos não detectáveis pela técnica).

Figura 4.16 – Perfil de Agregação da mortalina em diferentes temperaturas e concentrações. (A) Perfil de agregação da mortalina humana à 30°C em concentrações variando de 2 à 10 μM ; (B) Perfil de agregação da mortalina humana à 37°C em concentrações variando de 2 à 10 μM ; (C) Perfil de agregação da mortalina humana à 42°C em concentrações variando de 2 à 10 μM ; (D) Perfil cromatográfico da proteína após ser submetida as diferentes temperaturas, nota-se que há a formação de apenas um agregado que eluí no V_0 da coluna sem a formação de intermediários.

FONTE: Autoria própria

Os valores das constantes observadas foram calculados para todas as curvas de agregação da mortalina nas diferentes condições experimentais avaliadas (nas temperaturas que permitiram um ajuste dos dados experimentais segundo a equação 4.14). A Figura 4.17 representa os valores calculados para as constantes de primeira ordem em função da temperatura e da concentração. Observa-se que os pontos experimentais permitem um ajuste linear e que os coeficientes lineares obtidos a partir dos ajustes representam novas constantes que levam em consideração a temperatura e a concentração da proteína. Esses valores representam, em suma, taxas de agregação com o qual o processo de agregação da mortalina ocorre (Figura 4.17). Logo pode-se concluir que a agregação da mortalina depende, em suma, da temperatura e da concentração da proteína em solução. Observa-se ainda que as constantes cinéticas observadas de agregação obedecem a uma linearidade, tanto quando avaliamos o incremento da temperatura, quando avaliamos o incremento na concentração (Figura 2.17 (B)). No entanto, observa-se na Figura 4.17 (A) que a na concentração de 10 μM à 47 °C a curva perde a linearidade, provavelmente devido a uma saturação do sistema.

Figura 4.17 – Constantes cinéticas de reação de primeira ordem para a agregação da mortalina. (A) Constante cinética observada para um ajuste exponencial das curvas obtidas experimentalmente, em diversas temperaturas e em função da concentração de proteína utilizada; (B) Constante observada levando em consideração a concentração de proteína em função das diversas temperaturas. Em suma, os dados experimentais nos permitiram obter constantes que levam em consideração a taxa de agregação em função do tempo e concentração de proteína.

(A)

(B)

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados aqui mostram que o protocolo desenvolvido, para indução e purificação da mortalina permitiu a produção da mesma em sua forma solúvel e monomérica.

Os testes de CD e fluorescência intrínseca do triptofano mostraram que a mortalina recém purificada possui estrutura secundária e terciária local, mostrando que a mortalina foi produzida enovelada.

Ensaio de CEMA e UCA, provaram que a proteína foi produzida na fração solúvel e monomérica, além de fornecerem importantes parâmetros hidrodinâmicos como raio de Stokes e coeficiente de sedimentação. Estes resultados apontam que todos os demais testes estruturais e funcionais foram realizados com a proteína em sua forma nativa e funcional.

Os dados de SAXS corroboram para validar a afirmação de que a mortalina foi purificada como monômero ligeiramente alongado, no entanto, não foi possível averiguar alterações conformacionais devido à presença de nucleotídeos de adenosina, provavelmente devido à baixa concentração de proteína utilizada para a coleta de dados. As curvas de SAXS possibilitaram ainda a criação de um modelo *ab initio*, modelo este que apresentou concordância com os dados hidrodinâmicos experimentais quando utilizamos o programa HydroPro (DE LA TORRE et. al., 2000) para estimar esses mesmos parâmetros no modelo proposto.

O desenovelamento químico mostrou que a mortalina apresentou ao menos três transições para os ensaios seguidos por CD_{222 nm} e ao menos duas transições para o ensaio seguido por fluorescência intrínseca do triptofano. Esses dados sugerem que a sonda global (CD) foi capaz de fornecer informações sobre o desenovelamento do DLP α , ou outra parte da proteína que não leva a uma alteração no ambiente químico do triptofano, não podendo assim ser percebida por esta sonda (no entanto essa suposição precisa ser confirmada).

A mortalina interage com nucleotídeos adenosina com K_D da ordem de baixo micromolar, sendo que, tanto entropia quanto a entalpia dirigem a termodinâmica de interação com os nucleotídeos de adenosina testados. Os dados de interação também foram monitorados por desenovelamento térmico seguido por CD_{222nm} e sugerem que ATP possui maior afinidade pela mortalina do que ADP e que a interação é dependente de íons magnésio.

A atividade ATPase da mortalina foi determinada e observou-se que ela apresenta baixa atividade de hidrólise do ATP, no entanto, maior do que a apresentada pela Hsp70-1A, isso também foi observado para outras proteínas como a ortóloga da mortalina Dnak e para a Hsc66 de *E coli*. Entretanto, os testes aqui realizados sugerem que a mortalina produzida tem k_{cat} 4

vezes maior do que previamente reportado. Ademais a presença do peptídeo NR causa um aumento na atividade ATPase tanto da mortalina quanto da Hsp70-1A que evidencia o efeito de alosteria que existe entre ambos os domínios das Hsp70 aqui testadas, onde a presença de um ligante no domínio C-terminal causa um aumento na atividade de hidrólise de ATP no domínio N-terminal.

Finalmente os dados revelam que a mortalina não apresenta atividade chaperona sobre a luciferase. Quando testada a propensão da mortalina em agregar em diferentes temperaturas e concentrações observou-se que ela apresenta perfil de agregação concentração dependente nas temperaturas testadas e que, em temperaturas acima de 37°C a cinética de agregação pode ser descrita como uma cinética de ordem 1. Ademais, esses ensaios iniciais podem representar um caminho para entender os processos onde a alteração estrutural e funcional da mortalina, devido a formação de agregados, estão inseridos.

6 PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS REFERENTES AO DOUTORADO:

1. DORES-SILVA, P.R.; BARBOSA, L.R.S.; RAMOS, C.H.I.; BORGES, J.C.. Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. **Plos One**, v. 10, p. e0117170, 2015.

2. DORES-SILVA, P.R.; MINARI, K. ; RAMOS, C.H.I. ; BARBOSA, L.R.S.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: An essential mortalin co-chaperone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 140-148, 2013.

3. DORES-SILVA, P.R.; SILVA, E.R.; GOMES, F.E.R.; SILVA, K.P.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. Low resolution structural characterization of the Hsp70-interacting protein Hip from *Leishmania braziliensis* emphasizes its high asymmetry. **Archives of Biochemistry and Biophysics** (Print), v. 520, p. 88-98, 2012.

6.1 Artigos científicos em preparação referentes ao doutorado:

1. DORES-SILVA, P.R.; BELOTI L.L.; MINARI K.; SILVA, S.M.O.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. mtHsp70-escort protein of *Leishmania braziliensis* (LbHep1): a highly elongated monomer in solution that presents a critical zinc-binding subdomain for its structure and function.

7 REFERÊNCIAS

- A.C.Y. FAN and J.C. Young, Function of Cytosolic Chaperones in Tom70-Mediated Mitochondrial Import, **Prot. Pept. Lett.** 18 pp. 122-131, 2011
- A.V. GOSWAMI, B. CHITTOOR, P. D'SILVA. Understanding the Functional Interplay between Mammalian Mitochondrial Hsp70 **Chaperone Machine Componts** 285 pp. 19472-19482, 2010
- ACHARYA P, KUMAR R, TATU U. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: Heat shock proteins in Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.** 153, 85–94, 2007
- ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J. AND SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling **Bioinformatics**, 22,195-201, 2006.
- BANUMATHY G, SINGH V, PAVITHRA SR, TATU U. Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, 278, 18336-18345, 2003.
- BARBOSA, LEANDRO RAMOS SOUZA; SPINOZZI, FRANCESCO; MARIANI, PAOLO; ITRI, ROSANGELA. Small-Angle X-Ray Scattering Applied to Proteins in Solution. In: Juan Ruso, Ángel Piñeiro. (Org.). **Proteins in Solution and at Interfaces**. 1 ed. NY: John Wiley & Sons, Inc., v., p. 49-72, 2013.
- BEISSINGER M, BUCHNER J. How chaperonas fold proteins. **Biol. Chem.**, 379, 245-259, 1998.
- BERNADO, P., MYLONAS, E., PETOUKHOV, M.V., BLACKLEDGE, M., SVERGUN, D.I. Structural Characterization of Flexible Proteins Using Small-Angle X-ray Scattering. **J. Am. Chem. Soc.** 129(17), 5656-5664, 2007.
- BHATTACHARYYA, T.; KARNEZIS, A.N.; MURPHY, S.P.; HOANG, T.; FREEMAN, B.C.; PHILLIPS, B.; MORIMOTO, R.I. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. **J. Biol. Chem.** 270, 1705–1710, 1995.
- BIANCONI ML. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **J. Biol. Chem.** 278, 18709-18713, 2003.
- BOHM,G., MUHR,R., AND JAENICKE,R. Quantitative-Analysis of Protein Far Uv Circular-Dichroism Spectra by Neural Networks. **Protein Eng.** 5, 191-195, 1992.
- BORGES JC & RAMOS CHI. Protein folding assisted by chaperonas. **Protein Pept. Lett.**, 12, 257-261, 2005.
- BORGES JC & RAMOS, CHI. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Archives Biochem Bioph.** 452, 46-54, 2006.

BORGES JC, FISCHER H, CRAIEVICH AF, HANSEN LD, RAMOS CHI. Free human mitochondrial GrpE is a sym Metric dimer in solution. **J. Biol. Chem.**, 278, 35337-35344, 2003.

BORGES JC, FISCHER H, CRAIEVICH AF, RAMOS CHI. Low-resolution structural study of two human Hsp40 chaperonas in solution. DjA1 from subfamily A and DjB4 from subfamily B, have different quaternary structures. **J. Biol. Chem.** 280, 13671-13681, 2005.

BORGES JC, PEREIRA JH, VASCONCELOS IB. Phosphate induces conformational changes in 5-enol-pyruvylshikimate3-phosphate synthase from Mycobacterium tuberculosis. **Arch Biochem Bioph** 452, 156-164, 2006.

BORGES,J.C. AND RAMOS,C.H.I. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Arch. Biochem. Biophys.** 452, 46-54, 2006.

BORGES,J.C. AND RAMOS,C.H.I. Analysis of molecular targets of mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. *Curr. Med. Chem.* 18, 1276-1285, 2011.

BOSWELL-CASTEEL RC, JOHNSON JM, DUGGAN KD, TSUTSUI Y, HAYS FA. Overproduction and biophysical characterization of human HSP70 proteins. **Protein Expr Purif.** 2015.

BREHMER, D., RÜDIGER, S., GÄSSLER, C.S., KLOSTERMEIER, D., PACKSCHIES, L., REINSTEN, J., MAYER, M.P. AND BUKAU, B. Tuning of chaperona activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. **Nat. Struct. Biol.**, 8, 427-432, 2001.

BUCHNER J. Hsp90 & Co. – a holding for folding. **Trends Biochem. Sci.**, 24, 136-141, 1999.

BURBULLA, L.F.; SCHELLING, C.; KATO, H.; RAPAPORT, D.; WOITALLA, D.; SCHIESLING, C.; SCHULTE, C.; SHARMA, M.; ILLIG, T.; BAUER, P. Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: Functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. **Hum. Mol. Genet.**, 19, 4437–4452, 2010.

C. SOTI, E. NAGY, Z. GIRICZ, L. VIGH, P. CSERMELY, P. FERDINANDY. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets, *Br. J. Pharmacol.* 146 pp. 769-780, 2005.

C.C. DEOCARIS, N. WIDODO, B.G. SHRESTHA, K. KAUR, M. OHTAKA, K. YAMASAKI, S.C. KAUL, R. WADHWA. Mortalin sensitizes human cancer cells to MKT-077-induced senescence, *Cancer Lett.* 252 pp. 259-269, 2007.

C.L.P. OLIVEIRA, J.C. BORGES, I.L. TORRIANI, C.H.I. RAMOS. Low resolution structure and stability studies of human GrpE#2, a mitochondrial nucleotide exchange factor, **Arch. Biochem. Biophys.** 449 pp. 77-86, 2006.

C.M. TORRES-BUGEAU, C.L. ÁVILA, R. RAISMAN-VOZARI, D. PAPY-GARCIA, R. ITRI, L.R.S. BARBOSA, L.M. CORTEZ, V.L. SIM, R.N. CHEHÍN. Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Early Amyloid-like Oligomers and Their Implication in á-Synuclein Aggregation, *J. Biol. Chem.* 287 pp. 2398-2409, 2012.

CANET-AVILES, R.M.; WILSON, M.A.; MILLER, D.W.; AHMAD, R.; MCLENDON, C.; BANDYOPADHYAY, S.; BAPTISTA, M.J.; RINGE, D.; PETSKE, G.A.; COOKSON, M.R. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101, 9103–9108, 2004.

CHO, S., PARK, S. G., LEE, D. H. AND PARK, B. C. Protein-protein interaction networks: from interactions to networks. **J. Biochem Mol Biol** 37(1): 45-52, 2004.

CHOGLAY, A.A., CHAPPLE, J.P., BLATCH, C.L. & CHEETHAM, M.E. Identification and characterization of a human mitochondrial homologue of the bacterial co-chaperone GrpE. **Gene**, 267, 125-134, 2001.

D. MOKRANJAC AND W. NEUPERT. Thirty years of protein translocation into mitochondria: Unexpectedly complex and still puzzling, **BBA-Mol. Cell. Res.** 1793 pp. 33-41, 2009.

D. ORTHABER, A. BERGMANN, O. GLATTER. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard, **J. Appl. Cryst.** 33 pp. 218-225, 2000.

DE LA TORRE, J.G., HUERTAS, M.L., AND CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719-730, 2000.

DE MAIO A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams". *Shock* (Augusta, Ga.) **11** (1): 1–12, 1999.

DEOCARIS, C.C., KAUL, S.C., AND WADHWA, R. Mortalin's Machinery. In *Mortalin biology: life, stress and death*, S.C.Kaul and R.Wadhwa, eds. (New York: **Dordrecht: Springer**, pp. 21-30, 2012.

DOMANICO, S.Z.; DENAGEL, D.C.; DAHLSEID, J.N.; GREEN, J.M.; PIERCE, S.K. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. **Mol. Cell. Biol.** 13, 3598–3610, 1993.

DORES-SILVA, P. R., MINARI, K., RAMOS, C. H. I., BARBOSA, L. R. S., AND BORGES, J. C. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: An essential mortalin co-chaperone. *Int. J. Biol. Macromol.* 56, 140-148, 2013.

E. CRAIG, W. YAN, P. JAMES. *Molecular Chaperones and Folding Catalysts* (Ed.: B. Bukau), **Harwood**, Amsterdam, p. 139 ± 162, 1999.

E. MYLONAS AND D.I. SVERGUN. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering, **J. Appl. Cryst.** 40 p.S245-S249, 2007.

EBRAHIMI-FAKHARI, DARIUS, LARA WAHLSTER, AND PAMELA J. MCLEAN. "Molecular Chaperones in Parkinson's Disease – Present and Future." **Journal of Parkinson's disease** 1.4 299–320, 2011.

- FIAUX J, HORST J, SCIOR A, PREISLER S, KOPLIN A, BUKAU B, DEUERLING E. Structural analysis of the ribosome-associated complex (RAC) reveals an unusual Hsp70/Hsp40 interaction. **J. Biol. Chem.**, 285 (5), 3227-3234, 2010.
- FINK AL. Chaperona-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, 79, 425-449, 1999.
- FRYDMAN J, NIM MESGER E, OHTSUKA K, HARTL FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperonas. *Nature*, 370, 111-117, 1994.
- G. BOHM, R. MUHR, R. JAENICKE. Quantitative-Analysis of Protein Far Uv Circular-Dichroism Spectra by Neural Networks, **Protein Eng.** 5 pp. 191-195, 1992.
- G. FOURNET AND A. GUINIER. Small Angle Scattering of X-Rays. Translated by Walker, C.B. and Yudowitch, K.L., John Wiley & Sons, New York, pp. 7-78, 1995.
- GOLOUBINOFF P, MOGK A, ZVI AVI, TOMOYASU T, BUKAU B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperona network. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96, 13732-13737, 1999.
- GONÇALVES KA, BORGES JC, SILVA JC, PAPA PF, BRESSAN GC, TORRIANI I, KOBARG J. Solution structure of the human signaling protein RACK1. **BMC Structural Biology**, v. 10, p. 15, 2010.
- GOSWAMI, A.V.; CHITTOOR, B.; D'SILVA, P. Understanding the functional interplay between mammalian mitochondrial Hsp70 chaperone machine components. **J. Biol. Chem.** 285, 19472–19482, 2010.
- GRAEFE SE, WIESGIGL M, GAWORSKI I, MACDONALD A, CLOS J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryot Cell.**, 1, 936-943, 2002.
- GRAF C, STANKIEWICZ M, NIKOLAY R, MAYER MP. Insights into the conformational dynamics of the E3 ubiquitin ligase CHIP in complex with chaperonas and E2 enzymes. **Biochemistry**, 49, 2121-2129., 2010.
- GRUNEWALD, A.; VOGES, L.; RAKOVIC, A.; KASTEN, M.; VANDEBONA, H.; HEMMELMANN, C.; LOHMANN, K.; OROLICKI, S.; RAMIREZ, A.; SCHAPIRA, A.H. Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. **PLoS One**, 5, 2010.
- H. YAMAMOTO, T. MOMOSE, Y. YATSUKAWA, C. OHSHIMA, D. ISHIKAWA, T. SATO, Y. TAMURA, Y. OHWA, T. ENDO. Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane, **FEBS Lett.** 579 pp. 507-511, 2005.
- HALL N, PAIN A, BERRIMAN M. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. **Nature** 419, 527-531, 2002.

HARST A, LIN H, OBERMANN WM. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. **Biochem. J.**, 387, 789–796, 2005.

HARTL FU & HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol, from nascent chain to folded protein. **Science**, 295, 1852-1858, 2002.

HAWLE P, SIEPMANN M, HARST A, SIDERIUS M, REUSCH HP, OBERMANN WM. The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. **Mol Cell Biol.** 26, 8385-95, 2006.

IOSEFSON, O.; AZEM, A. Reconstitution of the mitochondrial Hsp70 (mortalin)-p53 interaction using purified proteins—Identification of additional interacting regions. **FEBS Lett.** ,584, 1080–1084, 2010.

IVENS AC, PEACOCK CS, WORTHEY EA. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, 309, 436-442, 2005.

J.C. BORGES AND C.H.I. RAMOS. Analysis of molecular targets of mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation, **Curr. Med. Chem.** 18 pp. 1276-1285, 2011.

JAENICKE R. Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71, 155-241, 1999.

JAKOB U, LILIE H, MEYER I, BUCHNER J. Transient Interaction of Hsp90 with Early Unfolding Intermediates of Citrate Synthase. **J. Biol. Chem.**, 270: 7288 – 7294, 1995.

JELESAROV I & BOSSHARD H. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **J. Mol. Recognit.**, 12, 3-18., 1999.

JIANG J, PRASAD K, LAFER EM, SOUSA R. Structural basis of Interdomain Communication in the Hsc70 Chaperone. **Mol. Cell.**, 20, 513-524, 2005.

JIN, J.; HULETTE, C.; WANG, Y.; ZHANG, T.; PAN, C.; WADHWA, R.; ZHANG, J. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: Relevance to Parkinson disease. **Mol. Cell. Proteomics**, 5, 1193–1204, 2006.

JOLLY C, MORIMOTO RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. **J Natl Cancer Inst** 92:1564–1572, 2000.

K. ARNOLD, L. BORDOLI, J. KOPP, T. SCHWEDE. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, **Bioinformatics** 22 pp. 195-201, 2006.

K.P. DA SILVA AND J.C. BORGES. The Molecular Chaperone Hsp70 Family Members Function by a Bidirectional Heterotrophic Allosteric Mechanism, **Protein Pept. Lett.** 18 pp. 132-142 2011.

KAMAL A, THAO L, SENSINTAFFAR J, ZHANG L, BOEHM MF, FRITZ LC, BURROWS FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature**. 425, 407-410, 2003.

KAUL, S.C, DEOCARIS C.C., WADHWA R. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer, **Experimental Gerontology** 42 263–274, 2007.

KIEFER F, ARNOLD K, KÜNZLI M, BORDOLI L, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 37, D387-D392., 2009.

KOGEL, D.; SCHOMBURG, R.; COPANAKI, E.; PREHN, J.H. Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: Inhibition of the JNK/c-Jun pathway. **Cell Death Differ.** 12, 1–9, 2005.

KOULOV AV, LAPOINTE P, BINGWEN L, RAZVI A, COPPINGER J, DONG M, MATTESON J, LAISTER R, ARROWSMITH C, YATES III JR, BALCH WE. Biological and Structural Basis for Aha1 Regulation of Hsp90 ATPase Activity in Maintaining, Proteostasis in the Human Disease Cystic Fibrosis. **Mol. Biol. Cell.**, 21, 871–884, 2010.

KUMAR R, MUSIYENKO A, BARIK S. The heat shock protein 90 of Plasmodium falciparum and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. **Malaria J.**, 2, 30, 2003.

KURGANOV B. Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation . **Biochemistry (Moscow)**, 67(4): 492-507, 2002.

L. BURRI, K. VASCOTTO, S. FREDERSDORF, R. TIEDT, M.N. HALL, T. LITHGOW. Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria, **J. Biol. Chem.** 279 pp. 50243-50249, 2004.

L.K.S. SZKLARZ, B. GUIARD, M. RISSLER, N. WIEDEMANN, V. KOZJAK, M. VAN DER LAAN, C. LOHAUS, K. MARCUS, H.E. MEYER, A. CHACINSKA, N. PFANNER, C. MEISINGER. Inactivation of the mitochondrial heat shock protein Zim17 leads to aggregation of matrix Hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis, *J. Mol. Biol.* 351 pp. 206-218, 2005.

L.R.S. BARBOSA, M.G. ORTORE, F. SPINOZZI, P. MARIANI, S. BERNSTORFF, R. ITRI. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study, **Biophys. J.** 98 pp. 147-157, 2010.

LANGER, T., LU, C., ECHOLS, H. FLANAGAN, J., HAYER, M.K. & HARTL, F.U. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. **Nature**, 356, 683-689, 1992.

LEBOWITZ, J., LEWIS, M.S., AND SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Sci.** 11, 2067-2079, 2002.

LI Z, SRIVASTAVA P. "Heat-shock proteins". **Current Protocols in Immunology**. Appendix 1: Appendix 1T, 2004.

LIBEREK, K., MARSZALEK, J. ANG, D., GEORGOPOULOS, C. & ZYLICZ, M. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 2874-2878 1991.

- LONDONO C, OSORIO C, GAMA V, ALZATE O. Mortalin, Apoptosis, and Neurodegeneration. **Biomolecules.**; 2(1):143-164, 2012.
- LUO WI, DIZIN E, YOON T, COWAN JA. Kinetic and structural characterization of human mortalin. *Protein Expr Purif* 72:75–81, 2010.
- M. BLAMOWSKA, M. SICHTING, K. MAPA, D. MOKRANJAC, W. NEUPERT, K. HELL. ATPase Domain and Interdomain Linker Play a Key Role in Aggregation of Mitochondrial Hsp70 Chaperone Ssc1, *J. Biol. Chem.* 285 pp. 4423-4431, 2010.
- M. BOHNERT, N. PFANNER, M. VAN DER LAAN. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins, *Febs Lett.* 581 pp. 2802-2810, 2007.
- M. SICHTING, D. MOKRANJAC, A. AZEM, W. NEUPERT, K. HELL. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1, **EMBO J.** 24 pp. 1046-1056, 2005.
- M.G. CLAROS AND P. VINCENS. Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences, **Eur. J. Biochem.** 241 pp. 779-786, 1996.
- M.T. VU, P. ZHAI, J. LEE, C. GUERRA, S. LIU, M.C. GUSTIN, J.J. SILBERG. The DNLZ/HEP zinc-binding subdomain is critical for regulation of the mitochondrial chaperone HSPA9, **Protein Sci.** 21 pp. 258-267, 2012.
- MALONEY A & WORKMAN P. Hsp90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. **Expert Opin. Biol. Ther.**, 2, 3-24, 2002.
- MAYER MP, BREHMER D, GÄSSLER CS, BUKAU B. Hsp70 Chaperona Machines. **Adv Protein Chem** 59, 1-45, 2001.
- MAYER MP, SCHRÖDER H, RÜDIGER S, PAAL K, LAUFEN T, BUKAU B. Multispet mechanism of substrate binding determines chaperona activity of Hsp70. **Nature Struct. Biol.**, 7, 586-593, 2000.
- MIERNYK JA. Protein folding in the plant cell. **Plant Physiol.**, 121, 695-703, 1999.
- MIZUKOSHI, E.; SUZUKI, M.; LOUPATOV, A.; URUNO, T.; HAYASHI, H.; MISONO, T.; KAUL, S.C.; WADHWA, R.; IMAMURA. T. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. **Biochem. J.** 343, 461–466, 1999.
- MIZUKOSHI, E.; SUZUKI, M.; MISONO, T.; LOUPATOV, A.; MUNEKATA, E.; KAUL, S.C.; WADHWA, R.; IMAMURA, T. Cell-cycle dependent tyrosine phosphorylation on mortalin regulates its interaction with fibroblast growth factor-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 280, 1203–1209, 2001.
- MOSSER, D.D., MORIMOTO, R.I. Molecular chaperonas and the stress of oncogenesis. **Oncogene** 23, 2907–2918, 2004.
- NAYLOR, D.J. STINES, A.P., HOOGENRAAD, N.J. & HOJ. P.B. Evidence for the Existence of distinct mam Malian cytosolic, microsomal, and two mitochondrial GrpE-like proteins, the co-chaperonas of specific Hsp70 members. **J. Biol. Chem.** 272, 21169-21177, 1998.

O. GLATTER AND O. KRATKY. Small Angle X-Ray Scattering, **Academic Press Inc. Ltd.**, New York, 1982, pp. 17-50, 1982.

OLIVEIRA CL, BORGES JC, RAMOS CHI, TORRIANI I. Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by small-angle X-ray scattering and analytical ultracentrifugation. **Arch. Biochem. Biophys.** 2008.

OLIVEIRA CL, BORGES JC, TORRIANI I, RAMOS CHI. Low resolution structure and stability studies of human GrpE#2, a mitochondrial nucleotide exchange factor. **Arch. Biochem. Biophys.** 449, 77-86, 2006.

ORSINI, F.; MIGLIACCIO, E.; MORONI, M.; CONTURSI, C.; RAKER, V.A.; PICCINI, D.; MARTIN-PADURA, I.; PELLICCIA, G.; TRINEI, M.; BONO, M. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. **J. Biol. Chem.** 279, 25689–25695, 2004.

P. DOLEZAL, V. LIKIC, J. TACHEZY, T. LITHGOW. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria, **Science** 313 pp. 314-318, 2006.

P. REHLING, K. BRANDNER, N. PFANNER. Mitochondrial import and the twin-pore translocase, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 5 pp. 519-530, 2004

P. SCHUCK, M.A. PERUGINI, N.R. GONZALES, G.J. HOWLETT, D. SCHUBERT. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: Strategies and application to model systems, **Biophys. J.** 82 pp. 1096-1111, 2006.

P. ZHAI, C. STANWORTH, S. LIU, J.J. SILBERG. The human escort protein hep binds to the ATPase domain of mitochondrial Hsp70 and regulates ATP hydrolysis, **J. Biol. Chem.** 283 pp. 26098-26106, 2008.

P. ZHAI, M.T. VU, K.G. HOFF, J.J. SILBERG. A conserved histidine in human DNLZ/HEP is required for stimulation of HSPA9 ATPase activity, **Biochem. Biophys. Res. Co.** 408 pp. 589-594, 2011.

P.R. DORES-SILVA, E.R. SILVA, F.E.R. GOMES, K.P. SILVA, L.R.S. BARBOSA, J.C. BORGES, Low resolution structural characterization of the Hsp70-interacting protein - Hip - from *Leishmania braziliensis* emphasizes its high asymmetry, **Arch. Biochem. Biophys.** 520 pp. 88-98, 2012.

PAVITHRA SR, BANUMATHY G, JOY O, SINGH V, TATU U. Recurrent Fever Promotes *Plasmodium falciparum* Development in Human Erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, 279, 46692-46699, 2004.

PAVITHRA SR, KUMAR R, TATU U. Systems analysis of chaperona networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **PLoS Comput Biol** 3, e168, 2007.

PEARL LH & PRODROMOU C. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperona Machinery. **Annu. Rev. Biochem.**, 75, 271-94, 2006.

- PELLEGRINI, M.; PACINI, S.; BALDARI, C.T. p66SHC: The apoptotic side of Shc proteins. **Apoptosis** 2005, 10, 13–18, 2005.
- PETOUKHOV, M.V. AND SVERGUN, D.I. Global rigid body modelling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. **Biophys. J.**, 89, 1237-1250, 2005.
- PIERCE M M, RAMAN CS, NALL BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods.**, 19, 213-221, 1999.
- POWERS MV & WORKMAN P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. **FEBS Lett.** 581, 3758-3769, 2007.
- R. WADHWA, S. TAKANO, K. KAUR, C.C. DEOCARIS, O.M. PEREIRA-SMITH, R.R. REDDEL, S.C. KAUL. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis, **Inter. J. Cancer** 118 pp. 2973-2980, 2006.
- R. WADHWA, T. SUGIHARA, A. YOSHIDA, H. NOMURA, R.R. REDDEL, R. SIMPSON, H. MARUTA, S.C. KAUL. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function, **Cancer Res.** 60 pp. 6818-6821, 2000.
- R. WADHWA, T. YAGUCHI, K. HASAN, Y. MITSUI, R.R. REDDEL, S.C. KAUL. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein, **Exp. Cell Res.** 274 pp. 246-253, 2002.
- RABOY B, SHARON G, PARAG HA, SHOCHAT Y, KULKA RG. "Effect of stress on protein degradation: role of the ubiquitin system". **Acta biologica Hungarica** 42 (1–3): 3–20, 1991.
- REVINGTON M, ZHANG Y, YIP GN, KUROCHKIN AV, ZUIDERWEG ER. NMR investigations of allosteric processes in a two-domain *Thermus thermophilus* Hsp70 molecular chaperone. **J. Mol. Biol.** 349, 163-83, 2005.
- RIST W, GRAF C, BUKAU B, MAYER M. Amide hydrogen exchange reveals conformational changes in Hsp70 chaperones important for allosteric regulation. **J. Biol. Chem.**, 281 (24), 16493-16501, 2006.
- RITOSSA F. "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*". **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)** 18 (12): 571–573, 1962.
- RITOSSA F. "Discovery of the heat shock response". **Cell Stress Chaperones** 1 (2): 97–8, 2006.
- RUDDON RW & BEDOWS E. Assisted protein folding. **J. Biol. Chem.**, 272, 3125-128, 1997.
- RÜDIGER S, GERMEROTH L, SCHNEIDER-MERGENER J, BUKAU B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. **EMBO J.**, 16, 1501-1507, 1997.

- RÜDIGER S, SCHENEIDER-MERGENER J, BUKAU B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperona as a scanning factor for the DnaK chaperona. **EMBO J.**, 20, 1042-1050, 2011.
- S.C. KAUL, C.C. DEOCARIS, R. WADHWA. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer, *Exp. Gerontol.* 42 pp. 263-274, 2007.
- SACHT, G.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; KIESS, M. SZTAJER, H.; FLOHE, L. ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I. **Biofactors**, 9, 49–60, 1999.
- SAMIZO K, ISHIKAWA A, NAKAMURA A, KOHAMA K. A highly sensitive method for measurement of myosin ATPase activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, 293 (2), 212-215, 2001.
- SCHUCK,P., PERUGINI,M.A., GONZALES,N.R., HOWLETT,G.J. AND SCHUBERT,D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: Strategies and application to model systems. **Biophys. J.** 82, 1096-1111, 2002.
- SCHWARZER, C.; BARNIKOL-WATANABE, S.; THINNES, F.P.; HILSCHMANN, N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1059–1070, 2002.
- SICHTING, M., MOKRANJAC, D., AZEM, A., NEUPERT, W., HELL, K., Maintenance of Structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperonas requires the chaperona Hep1, **The EMBO journal**, Vol. 24, pp. 1046-1056, 2005.
- SILIGARDI G, HU B, PANARETOU B, PIPER PW, PEARL LH, PRODROMOU C. Co-chaperona regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem.* 279, 51989-98, 2004.
- SILVA, KP, BORGES JC. The molecular chaperona Hsp70 works by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein and Peptide Letters**, 2011.
- SOTI C, NAGY E, GIRICZ Z. Hsp as emerging therapeutic targets *Brit. J. Pharm.* 146, 769–780, 2005.
- SOTI, C., CSERMELY, P. Molecular chaperonas and the aging process. *Biogerontology* 1, 225–233, 2000.
- SOTI, C., CSERMELY, P. Chaperonas and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem. Int.* 41, 383–389, 2002.
- SOTI, C., SREEDHAR, A.S., CSERMELY, P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperona occupancy as a potential switch. *Aging Cell* 2, 39–45, 2003.
- SPINOZZI F, FERRERO C, ORTORE MG, DE MARIA ANTOLINOS A, MARIANI P. GENFIT: software for the analysis of small-angle X-ray and neutron scattering data of macromolecules in solution. **J Appl Cryst** 47: 1132–1139, 2014.
- STUDIER WF, ROSENBERG AH, DUNN JJ, DUBENDORFF JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, 185, 60-89, 1990.

- SVERGUN D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Crystallogr.** 25, 495-503, 1992.
- SVERGUN,D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys. J.** 76, 2879-2886, 1999.
- SZABO, A., KORSZUN, R., HARTL, F.U. & FLANAGAN, J. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. **EMBO J.**, 15, 408-417, 1996.
- T. MOMOSE, C. OHSHIMA, M. MAEDA, T. ENDO. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70, **EMBO Rep.** 8 pp. 664-670, 2007.
- TAIPALE M, TUCKER G, PENG J. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. **Cell** 158:434-448, 2014.
- TIROLI AO & RAMOS CHI. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. **Inter. J. Biochem. Cell Biol.** 39, 818–831, 2007.
- VAN DER PLOEG LH, GIANNINI SH, CANTOR CR. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. **Science.** 228, 1443-1446, 1985.
- VOLKOV, V.V. AND SVERGUN,D.I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.** 36, 860-864, 2003.
- WADHWA R, KAUL SC, IKAWA Y, SUGIMOTO Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. **J Biol Chem** 268:6615–6621, 1993a.
- WADHWA R, KAUL SC, SUGIMOTO Y, MITSUI Y. Induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 cells. **J Biol Chem** 268:22239–22242, 1993b.
- WADHWA, R., TAKANO, S., KAUR, K., DEOCARIS, C.C., PEREIRA-SMITH, O.M., REDDEL, R.R., KAUL, S.C. Upregulation of mortalin/mthsp70/ Grp75 contributes to human carcinogenesis. **Int. J. Cancer** 118, 2973–2980, 2006.
- WADHWA, R.; KAUL, S.C.; IKAWA, Y.; SUGIMOTO, Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. **J. Biol. Chem.** 268, 6615–6621, 1993.
- WADHWA, R.; TAKANO, S.; KAUR, K.; AIDA, S.; YAGUCHI, T.; KAUL, Z.; HIRANO, T.; TAIRA, K.; KAUL, S.C. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mthsp70 and hsp60. **Biochem. J.** 391, 185–190, 2005.
- WADHWA, R.; TAKANO, S.; ROBERT, M.; YOSHIDA, A.; NOMURA, H.; REDDEL, R.R.; MITSUI, Y.; KAUL, S.C. Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. **J. Biol. Chem.** 273, 29586–29591, 1998.

- WADHWA, R.; YAGUCHI, T.; HASAN, M.K.; TAIRA, K.; KAUL, S.C. Mortalin-MPD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 302, 735–742, 2003.
- WALTER A. BASELER, TARA L. CROSTON, JOHN M. HOLLANDER. Functional Characteristics of Mortalin. In: Sunil C.Kaul, Renu Wadhwa, editors. *Mortalin Biology: Life, Stress and Death*. Springer. pp. 55-80, 2012.
- WEBSTER, T.J.; NAYLOR, D.J.; HARTMAN, D.J.; HOJ, P.B.; HOOGENRAAD, N.J. cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. **DNA Cell Biol.** 13, 1213–1220, 1994.
- WEGELE H, MÜLLER L, BUCHNER J. Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, 151, 1-44, 2004.
- WESTERHEIDE SD & MORIMOTO RI. Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Diseases of Protein Conformation. **J. Biol. Chem.**, 280, 33097-33100, 2005.
- WIESGIGL M & CLOS J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell.*, 12, 3307-3316, 2001a.
- WU C. "Heat shock transcription factors: structure and regulation". *Annual review of cell and developmental biology* 11: 441–69, 1995.
- YANG, H.; ZHOU, X.; LIU, X.; YANG, L.; CHEN, Q.; ZHAO, D.; ZUO, J.; LIU, W. Mitochondrial dysfunction induced by knockdown of mortalin is rescued by Parkin. **Biochem. Biophys. Res.** 410, 114–120, 2011.
- YOUNG JC, MOAREFI I, HARTL FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell. Biol.*, 154, 267-273, 2001.
- ZHAI,P., STANWORTH,C., LIU,S., AND SILBERG,J.J. The human escort protein hep binds to the ATPase domain of mitochondrial Hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **J. Biol. Chem.** 283, 26098-26106, 2008.
- ZHU X, ZHAO X, BURKHOLDER WF, GRAGEROV A, OGATA CM, GOTTESMAN ME, HENDRICKSON WA. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, 272, 1606-1614, 1996.