Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos

Estudos estruturais e funcionais da Hsp90 de *Leishmania* braziliensis e suas co-chaperonas p23

Kelly Pereira da Silva

São Carlos

Kelly Pereira da Silva

Estudos estruturais e funcionais da Hsp90 de Leishmania

braziliensis e suas co-chaperonas p23

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 Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em

acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu irmão e ao meu amor, por vocês serem a razão de tudo o que eu faço, pelo amor infinito e por fazerem com que eu seja uma pessoa melhor a cada dia. Ninguém disse que ia ser fácil, mas eu consegui! É para vocês meus amores!

Agradecimentos

A Deus, por iluminar meu caminho e guiar meu passos durante toda a minha jornada. "Tudo posso naquele que me fortalece".

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges pela oportunidade de realizar meu doutorado em seu laboratório. Obrigada pela orientação em todas as etapas e disponibilidade em ajudar, pela atenção e compreensão em todos os momentos que precisei. Agradeço também a enorme contribuição para a minha formação acadêmica e pessoal, pela aprendizagem e amizade construída ao longo desses anos. Uma pessoa que admiro e respeito e a quem desejo muito sucesso e felicidade!

À Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pela ajuda no início do doutorado em disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento dos experimentos iniciais. E às técnicas do Laboratório de Biofísica do IFSC pela ajuda durante a permanência no laboratório, além dos muitos sequenciamentos durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcel Tabak por disponibilizar o fluorímetro em seu laboratório para os inúmeros ensaios de fluorescência ao longo do desenvolvimento do projeto de doutorado. Ao técnico do laboratório Ézer, pela ajuda todas as vezes que precisei usar o fluorímetro, ao Adriano, Wilson e Patrícia por estarem prontos para oferecer ajuda.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncontron (LNLS) e Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), ambos do Centro de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, pela estrutura oferecida para a realização de parte dos experimentos.

Aos meus pais Edir e Maria do Carmo pelo amor incondicional, pelos ensinamentos de vida, por estar sempre presente compartilhando comigo os momentos mais felizes e sendo meu apoio nas horas mais difíceis, me ajudando a superar minhas dificuldades e a não desistir nunca. Ao meu irmão Kleber pelo amor e apoio em todos os momentos de decisão da minha vida, por acreditar em mim e junto com a Dani ter me dado uma joia preciosa que é a minha sobrinha Lavínia, minha anjinha que fez eu me tornar a tia mais coruja do mundo. Vocês são o meu porto seguro e me faltam palavras para descrever meu amor por vocês e a gratidão que eu sinto nesse momento tão importante da minha vida. Amo vocês é muito pouco para descrever meu sentimento!

Ao meu amor Nelson por estar sempre ao meu lado me fazendo a pessoa mais feliz do mundo! E mesmo quando não entendia nada do que eu estava falando em relação às atividades do laboratório, sempre me ouvia e me aconselhava, fazendo com que eu tivesse forças para seguir em frente. Obrigada meu amor, pela pessoa maravilhosa que você é, pelo companheirismo, amor e atenção em todos os momentos, por me fazer rir quando mais precisava e por ser junto com a minha família o motivo que me fazia voltar para casa toda semana. Te amo infinito!

À minha sogra Laura, meu sogro Nelson e minha cunhadinha Lidi por todo o carinho que sempre tiveram comigo, pelo apoio, atenção, muitas conversas e risadas que sempre me alegram.

Às minhas amigas companheiras que eu amo de coração e de quem sentirei muitas saudades. Vocês são pessoas que merecem muita felicidade sempre e que eu agradeço muito a amizade de cada uma!

À Sabrina, minha primeira amiga do BMB, por me fazer entender alguma coisa de termodinâmica (risos), pelo carinho, atenção, apoio e ajuda sempre que precisei, pelas conversas e por eu poder ter participado de um momento tão especial da sua vida que foi a Beatriz.

À Nath, pelo carinho, atenção, companhia na época de dupla dinâmica (risos), apoio nas horas de cansaço, por ser a fã número 2 da banda Lado Bronx, pela disponibilidade em ajudar e os momentos compartilhados durante esse tempo.

À Camila pelo companheirismo e carinho em todos os momentos, por estar sempre disposta a ajudar e ouvir, pela enorme ajuda quando técnica do laboratório. Obrigada pelas ideias de presentinhos (risos), pelas conversas mil que fazia meu dia no laboratório ser mais alegre.

À Yara pelo carinho e amizade o tempo todo, por ser uma pessoa com um coração enorme que eu tive a sorte de conhecer, principalmente nos últimos meses, obrigada pela força e pelas orações, por estar sempre de braços abertos quando eu mais precisava.

À Simone, pela amizade de longa data, pelos conselhos que sempre me ajudaram muito, obrigada por poder compartilhar os muitos momentos importantes da minha vida com você e com o Diego.

À Érika, pela companhia e atenção em todo o tempo que esteve no BMB, pelas fatias húngaras nas visitas a Ibaté (risos), pelos conselhos e apoio e por estar presente mesmo na distância.

À Vanda, pelo carinho, atenção e auxílio nos momentos de convivência, obrigada por fazer parte do meu círculo de amigos tão queridos.

À Patrícia, pela paciência em dividir o apartamento comigo nos momentos de maior estresse, pela amizade e todo o tempo de convivência, pelas conversas e risadas, pelas caminhadas e guloseimas (risos).

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado nesses anos, me ajudando em todas as etapas do meu doutorado, a quem eu agradeço imensamente.

Ao Edvan, pela acolhida inicial quando cheguei ao grupo, obrigada pela ajuda nos estudos para fazer a prova de ingresso, obrigada pela companhia e pelas risadas durante o tempo de convivência no laboratório.

Ao Glessler, pela enorme ajuda durante o projeto, pela paciência em momentos de estresse e pelo incentivo durante os experimentos. Obrigada por ter sido meu "patinho" (risos) em que pude aprender muito ao ensinar o que sabia. Uma pessoa muito competente e esforçada que tenho a certeza de que vai conseguir alcançar seus objetivos.

Ao Paulo, pela companhia e ajuda quando precisei, pelo incentivo e momentos de descontração durante esse tempo de convívio. Faltam 3 anos (risos).

Ao Thiago, pela amizade e enorme ajuda nos experimentos e tratamento dos dados, pelo aprendizado durante esse tempo, pelo incentivo e parceria no artigo da LbHsp90.

Obrigada a todos os meus amigos do Sertão que sempre estiveram ao meu lado mesmo quando longe e sempre me incentivaram a buscar meus objetivos. Obrigada meus queridos amigos que fazem parte da minha vida e com quem posso compartilhar todos os momentos: Laura, Magali, Marcelinha, Melina, Rafael, Thiago, Paulo e Edmilson.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação do IQSC pelo suporte e ajuda durante o doutorado, principalmente à Andréia e à Sílvia, pela disponibilidade em ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de um mês de bolsa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

Enfim, agradeço a todos que fazem ou fizeram parte da minha vida durante esses anos de doutorado, que com certeza deixaram um pouquinho de si e levaram um pouquinho de mim. A todos obrigada e que venha uma nova fase!

Epígrafe

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."

Albert Einstein

Resumo

As chaperonas moleculares são proteínas que auxiliam no enovelamento correto de outras proteínas, entre outras funções importantes para as células, motivo pelo qual elas têm sido alvo para o combate de várias doenças. As Hsp90 (82-96 kDa) são chaperonas abundantes que interagem com diversas proteínas-cliente. São constituídas por três domínios: N-terminal, intermediário ou central (M) e Cterminal, o qual é responsável pela dimerização da proteína. A atividade da Hsp90 está diretamente relacionada à sua atividade ATPásica. Durante o ciclo funcional, as Hsp90 podem interagir com inúmeras co-chaperonas. Uma delas é a co-chaperona p23 (18-22 kDa) que interage com o dímero da Hsp90 e algumas das suas funções são a inibição da atividade ATPásica e atividade chaperona. O objetivo do trabalho foi obter a proteína recombinante Hsp90 de *Leishmania braziliensi*s e os domínios N e N+M, determinar fatores importantes que relacionam mudanças conformacionais e função da Hsp90 e as bases moleculares da inibição por GA. Também obter as cochaperonas Lbp23A e Lbp23B e investigar a interação com a LbHsp90 e suas funções. As proteínas produzidas foram purificadas e caracterizadas por técnicas biofísicas. Em solução, a LbHsp90 foi caracterizada como dímero assimétrico e as demais proteínas como monômeros assimétricos. A interação da LbHsp90 e domínios com nucleotídeos foi analisada por fluorescência e as constantes de dissociação ficaram em torno de 150 µM. A afinidade por GA foi maior que a verificada para ATP e em ordem crescente para LbHsp90, LbHsp90_NM e LbHsp90 N. A LbHsp90 apresentou grande atividade chaperona em relação à citrato sintase, de maneira independente de ATP. A LbHsp90 mostrou baixa atividade ATPásica, a qual foi inibida pela GA com IC₅₀ de 0,7 µM. Tanto a Lbp23A quanto a Lbp23B inibiram a atividade ATPásica da LbHsp90, porém a Lbp23A aproximou-se de 100% de inibição e a Lbp23B apenas 30%. A interação in vitro entre a LbHsp90 e a Lbp23B foi observada por *pull-down* na presença/ausência de nucleotídeos e essa técnica não se mostrou adequada para a Lbp23A.O pioneirismo do trabalho com a Hsp90/p23 de L. braziliensis oferece uma grande contribuição para futuros trabalhos que visam o entendimento das relações funcionais entre essas proteínas e o contexto das Hsp90 no desenvolvimento da leishmaniose.

Abstract

Molecular chaperones are proteins involved in proper folding of other proteins, and others important cellular functions, why they have been targeted for combating various diseases. The Hsp90 (82-96 kDa) are ubiquitous chaperones that interact with a wide range of client proteins. They are formed by three domains: N-terminal, central or middle (M), and C-terminal, which is responsible by its dimerization. The Hsp90 activity is related to its ATPase activity. During the Hsp90 functional cycle, diverse co-chaperones. One of them is the p23 (18 kDa), that interacts with one Hsp90 dimer, and some p23 functions are the inhibition of Hsp90 ATPase activity and chaperone activity. The aim of this work was obtain the Hsp90 recombinant Leishmania braziliensis Hsp90, the N and N+M domains, to determine the important factors related to conformational changes and Hsp90 function, and the molecular basis of GA inhibition. Also, to obtain the Lbp23A and Lbp23B co-chaperones in order to establish relevant aspects for LbHsp90 interaction and its co-chaperones functions. The recombinant proteins were produced, purified and characterized by biophysics techniques. The LbHsp90 was identified as an asymmetric dimer for whereas the others were identified as asymmetric monomers. The interactions between LbHsp90 and domains with nucleotides were determined by fluorescence and the dissociation constants were about 150 µM. The GA-affinity was greater than ATP one, in increasing order for LbHsp90, LbHsp90_NM, and LbHsp90_N. The LbHsp90 showed large chaperone activity related to citrate synthase independently of ATP. The LbHsp90 presented low ATPase activity, which was inhibited by GA with a IC₅₀ of 0,7. The Lbp23A and Lbp23B inhibited the ATPase activity with different values, the Lbp23A inhibition was closed to 100% whereas the Lbp23B one was 30%. The in vitro interaction between the LbHsp90 and Lbp23B was observed by pull-down, in the absence or presence of nucleotides, and for Lbp23A this technique was not appropriated. The pioneering work with Hsp90/p23 from L. braziliensis offers an important contribution to future studies aimed at understanding the functional relationships between these proteins and the context of Hsp90 in the development of leishmaniasis.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema mostrando o ciclo ATPásico da Hsp9024
Figura 2 - Alinhamento entre as estruturas primárias da LbHsp90 e as Hsp90 ortólogas50
Figura 3 - Alinhamento entre as estruturas primárias da Lbp23A, Lbp23B e p23 humana
Figura 4 - Amplificação dos DNAs alvo por PCR53
Figura 5 - Análise de restrição dos plasmídeos de expressão recombinantes54
Figura 6 - Expressão e purificação das proteínas alvo55
Figura 7 - Espectros de CD das proteínas recombinantes58
Figura 8 - Espectro de CD da proteína LbHsp90 na ausência e presença de MgCl ₂ 59
Figura 9 - Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas recombinantes LbHsp90,LbHsp90_N, LbHsp90_NM
Figura 10 - Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas recombinantes Lbp23A_ΔHis, Lbp23B_ΔHis61
Figura 11 - Ultracentrifugação analítica da LbHsp9063
Figura 12 - Espectros de emissão de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM
Figura 13 - Ensaios de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM para determinação das constantes de dissociação entre as proteínas e os ligantes
Figura 14 - Ensaios de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM com GA67
Figura 15 - Espectros de fluorescência das proteínas Lbp23A_∆His e Lbp23B_∆His
nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295
nm68

Figura	16 -	Atividade	chaperona	a das p	roteínas	LbHsp90,	LbHsp90_	N e
	LbH	sp90_NM						70
Figura		17	-	Ativio	lade	ATPás	sica	da
	LbH	sp90						71
Figura	18	- Atividad	e ATPás	sica da	LbHsp9	00 compa	arada con	n a
	LbH	sp90_NM						72
Figura	19	- Inibiçã	o da	atividade	ATPási	ca da	LbHsp90	por
	GA							73
Figura 2	20 - Inib	ição da ativi	dade ATPa	ásica da L	bHsp90 p	elas co-cha	aperonas Lb	p23A
	e Lb	p23B						74
Figura	21 - In	teração ent	re as prot	eínas Lbl	Hsp90 e l	_bp23A an	alisada por	pull-
	dow	n						75
Figura 2	22 - Eso	quema most	rando com	no foram f	eitos os e	nsaios de <i>j</i>	<i>bull-down</i> er	ntre a
	LbH	sp90 e as co	-chaperon	as p23				76
Figura 2	23 - Esc	quema most	rando com	o foram fe	eitos os co	ntroles dos	ensaios de	pull-
	dow	n entre a L	bHsp90 e	as co-ch	aperonas	p23 muda	ndo a orde	m de
	incu	bação das p	roteínas					77
Figura :	24 - In	teração ent	re as prot	eínas Lbl	Hsp90 e l	_bp23B an	alisada por	pull-
	dow	n						78

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Informações sobre as etapas de PCR para os D	NAs alvo35
Tabela 2 - Oligonucleotídeos desenhados para amplificar	os DNAs que codificam as
proteínas LbHsp90, LbHsp90_N, LbH	sp90_NM, Lbp23A e
Lbp23B	52
Tabela 3 - Sumário das etapas de clonagem e expres	são das proteínas e suas
propriedades	físico-
químicas	56
Tabela 4 - Estimativa das estruturas secundárias das	proteínas recombinantes
utilizando o CDNN Deconvolution	
Tabela 5 - Comparação dos valores das massas molecula	res esperadas e aparentes
•	LbHsp90_N e
LbHsp90_NM	
Tabela 6 - Razão friccional das proteínas L	•
LbHsp90_NM	
Tabela 7 - Comparação dos valores das massas molecula	•
das proteínas Lbp23A_ΔHis e Lbp23B_ΔHis	
Tabela 8 - Razão friccional das protei	
Lbp23B_∆His	62
Tabela 9 - Comparação dos valores de K_D entre as prote	ínas LbHsp90, LbHsp90_N
e LbHsp90_NM e os nucleotídeos ATP, ADP	e AMPPNP, com ou sem
MgCl ₂	65
Tabela 10 - Comparação entre os valores das consta	ntes de dissociação entre
Hsp90 de diversos organismos e os nu	
AMPPNP	66
Tabela 11 - Comparação dos valores de K_D e K_A ent	re as proteínas LbHsp90,
LbHsp90 N e LbHsp90 NM e geldanamicina	67

Lista de abreviaturas e siglas

17AAG 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin

ADP Adenosina difosfato

AMPPNP 5'-adenylyl-β-y-imidodiphosphate (análogo não hidrolisável do

ATP)

ATP Adenosina 5' trifosfato

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BSA Albumina de soro bovino

CaCl₂ Cloreto de cálcio CD *Circular dichroism*

CEM Cromatografia de exclusão molecular

cm Centímetros

CNPEM Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais

CS Citrato sintase

D79 Aspartato na posição 79

dATP 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate

DNA Deoxyribonucleic acid
DMSO Dimetilsulfóxido
D.O. Densidade óptica

E47 Glutamato na posição 47

E. coli Escherichia coli

EDTA Acido etilenodiamino tetra-acético ERM Elipticidade residual molar

FPLC Fast Protein Liquid Cromatography

 f/f_0 Razão friccional

g Gramas

GA Geldanamicina gDNA DNA genômico

GR Receptor de glicocorticoide

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hHsp90 Hsp90 humana

Hop Hsp70/Hsp90 organizing protein

Hsps Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*)
Hsp40 Proteína de choque térmico de 40 quilodalton
Hsp70 Proteína de choque térmico de 70 quilodalton

Hsp82 Proteína de choque térmico de 82 quilodalton ortóloga à Hsp90

humana

Hsp90 Proteína de choque térmico de 90 quilodalton

IC₅₀ Inhibitory concentration (conentração de inibidor que inibe 50%

da atividade de uma enzima)

IFSC
 Instituto de Física de São Carlos
 IPTG
 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
 IQSC
 Instituto de Química de São Carlos
 ITC
 Calorimetria de titulação isotérmica

L Litro

LB Luria-Bertani

L. braziliensis
LbHsp90
Leishmania braziliensis
Hsp90 de L. braziliensis

LbHsp90_N Domínio N-terminal da LbHsp90

LbHsp90_NM Domínios N e M da LbHsp90

Lbp23A p23A de L. braziliensis Lbp23B p23B de L. braziliensis Lbp23A_ Δ His Lbp23A sem a His-tag Lbp23B_ Δ His Lbp23B sem a His-tag

LEC Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria

LNBio Laboratório Nacional de Biociências

K_A Constante de associação
 K_{av} Coeficiente de partição
 KCI Cloreto de potássio

K_D Constante de dissociação

kDa QuiloDalton

k_{cat} Constante catalítica

K_m Constante de Michaelis-Menten

M Molar

MESG 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribosídeo

MgCl₂ Cloreto de magnésio

min Minutos mL Mililitro

mM Milimolar (10⁻³ molar) MM Massa molecular

MM_{app} Massa molecular aparente

m/v Massa/volume NaCl Cloreto de Sódio

NCBI National Center for Biotechnology Information

ng Nanograma

nm Nanômetro (10⁻⁹ metros) nM Nanomolar (10⁻⁹ molar) p23 Proteína de 23 quilodalton p60 Proteína de 60 quilodalton

PCR Reação em cadeia da polimerase

P. falciparum
pH
Potencial hidrogeniônico
Pi
Fosfato inorgânico

PNP purina nucleosídeo fosforilase R380 Arginina na posição 380 rpm Rotações por minuto

Rs Raio de Stokes

s⁰_{20,w} Coeficiente de sedimentação em água a 20 °C e concentração

zero de proteína

Sba1 Proteína de Saccharomyces cerevisiae ortóloga à p23 humana

S. cerevisiae Saccharomyces cerevisiae

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sti1 Proteína de Saccharomyces cerevisiae ortóloga à Hop humana

U Unidades TAE Tris-acetato

TPR Tetratricopeptide repeat
Tris Tris(hidroximetil)aminometano

Tris-HCl Tris hidrocloreto

V Volume

 V_0 Volume da fase móvel V_{bar} Volume parcial específico Volume de eluição da proteína V_{e}

Velocidade máxima V_{max} Volume de coluna total V_t W147 Triptofano na posição 147

w/v Peso/volume Hsp90 de levedura yHsp90 °C **Graus Celsius**

Coeficiente de extinção molar 3

Comprimento de onda λ

Comprimento de onda de excitação λ_{exc}

 λ_{max}

Comprimento de onda máximo de emissão Micrograma (10⁻⁶ gramas)
Microlitro (10⁻⁶ litros)
Micromolar (10⁻⁶ molar) μg μL μΜ

v/v volume/volume

Lista de símbolos

Gama γ

β Beta

Alpha α

Lambda λ

Épsilon 3

Tehta θ

Delta Δ

Ångström (10⁻¹⁰ metros) Å

Sumário

1 Introdução
1.1 Hsp90: estrutura e função
1.2 Co-chaperonas
1.3 Inibidores da Hsp90
1.4 Hsp90 e parasitas
1.5 Objetivos
1.5.1 Objetivos específicos
2 Desenvolvimento
2.1 Material e Métodos
2.1.1 Produção das proteínas recombinantes
2.1.1.1 Bioinformática
2.1.1.2 Alinhamento entre as estruturas primárias das proteínas alvo
proteínas ortólogas
2.1.1.3 gDNA
2.1.1.4 Construção dos oligonucleotídeos específicos para isolar as sequências
de DNA de interesse
2.1.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)
2.1.1.6 Clonagem em vetor de propagação35
2.1.1.7 Preparação das bactérias CaCl ₂ competentes
2.1.1.8 Transformação das bactérias CaCl ₂ competentes
2.1.1.9 Análise dos recombinantes
2.1.1.10 Subclonagem em vetor de expressão
2.1.1.11 Expressão das proteínas
2.1.1.12 Purificação das proteínas
2.1.1.13 Determinação da concentração das proteínas
2.1.2 Caracterização biofísica
2.1.2.1 Dicroísmo circular (Circular dichroism – CD)

2.1.2.2 Cromatografia de exclusão molecular analítica
2.1.2.3 Ultracentrifugação analítica
2.1.2.4 Fluorescência intrínseca do triptofano
2.1.3 Caracterização funcional
2.1.3.1 Atividade chaperona
2.1.3.2 Determinação da atividade ATPásica
2.1.3.3 Inibição da atividade ATPásica
2.1.3.4 Experimentos de interação por pull-down
2.2 Resultados e Discussão
2.2.1 Produção das proteínas recombinantes
2.2.1.1 Análise do número de genes de Hsp90 no genoma de L. braziliensis e
comparação entre as estruturas primárias das Hsp90 ortólogas 47
2.2.1.2 Construção dos oligonucleotídeos específicos
2.2.1.3 Amplificação dos DNAs alvo
2.2.1.4 Clonagem dos DNAs alvo em vetor de propagação 53
2.2.1.5 Subclonagem em vetor de expressão54
2.2.1.6 Obtenção das proteínas recombinantes em E. coli solúveis e puras 54
2.2.2 Caracterização biofísica 57
2.2.2.1 Estudo da estrutura secundária das proteínas alvo
2.2.2.2 Análise dos perfis de eluição das proteínas alvo em solução e seus estados oligoméricos
2.2.2.3 A proteína LbHsp90 é um dímero assimétrico em solução 62
2.2.2.4 A LbHsp90 e seus domínios ligam nucleotídeos e geldanamicina 63
2.2.3 Caracterização funcional
2.2.3.1 A proteína LbHsp90 possui alta atividade chaperona in vitro 69
2.2.3.2 LbHsp90 possui baixa atividade ATPásica e a importância da proteína dimérica para que haja essa atividade
2.2.3.3 A geldanamicina e as co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B inibem a atividade ATPásica da LbHsp90

2.2.3.4 A co-chaperona Lbp23B interage com a LbHsp90 in vitro	75
3 Conclusão	79
Referências	81

1 Introdução

Proteínas globulares adquirem sua estrutura espacial responsável por sua atividade de acordo com sua sequência de aminoácidos e o ambiente em que se encontram (JAENICKE, 1991) e podem assumir sua estrutura nativa sem necessitar de fatores extrínsecos ou *input* de energia (ANFINSEN, 1973). No processo do enovelamento, algumas proteínas podem auxiliar as proteínas nascentes a alcançarem a estrutura nativa (funcional) e também prevenir agregação, como as chaperonas moleculares (JAENICKE, 1991).

O termo "Chaperona Molecular" foi primeiramente utilizado para descrever a função da nucleoplasmina, uma proteína que se liga a histonas e promove a montagem dos nucleossomos, prevenindo interações iônicas incorretas entre as histonas e o DNA nos nucleossomos (LASKEY et al., 1978). As chaperonas moleculares foram inicialmente descritas como proteínas de choque térmico ("heat shock proteins"- Hsps), pois em uma condição de estresse térmico, o organismo responde através do aumento da expressão dessas proteínas. Porém, posteriormente foi descoberto que as chaperonas moleculares estão presentes nas células mesmo em condições normais, apresentando expressão constitutiva e executando muitas funções importantes dentro das células (LINDQUIST; CRAIG, 1988). Chaperonas moleculares foram definidas como proteínas que se ligam a outras proteínas (substratos) auxiliando-as a exercer suas funções corretamente, o que pode envolver enovelamento, oligomerização, transporte a um compartimento celular ou mudanças conformacionais para formas ativas/inativas (HENDRICK; HARTL, 1993).

As cinco principais famílias de chaperonas moleculares são classificadas de acordo com a massa molecular e, embora possuam mecanismos de ação específicos, elas podem reconhecer e se ligar a superfícies hidrofóbicas de proteínas não enoveladas ou parcialmente enoveladas. Ademais, diversas cochaperonas podem auxiliar as chaperonas moleculares em suas funções (BORGES; RAMOS, 2005).

1.1 Hsp90: estrutura e função

Uma das principais famílias é representada pelas Hsp90, que são chaperonas moleculares ubíquas encontradas desde eubactérias até eucariotos (PEARL;

PRODROMOU, 2001). Em eucariotos podem existir homólogos da Hsp90 em diversas organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplasto (PEARL; PRODROMOU, 2006). A Hsp90 citoplasmática é uma proteína abundante, encontrada em altos níveis dentro da célula (~1% do total de proteína solúvel) não submetida a estresses (WELCH; FERAMISCO, 1982). Em levedura, foi descrito que a Hsp82, ortóloga à Hsp90 humana, é essencial para o crescimento viável das células em altas temperaturas (BORKOVICH et al., 1989), protegendo-as das possíveis consequências de um estresse (BUCHNER, 1999).

As Hsp90 são proteínas de massa molecular entre 82-96 kDa que formam homodímeros principalmente através da associação entre os 191 aminoácidos na região C-terminal (NEMOTO et al., 1995). São constituídas por três domínios: Nterminal, Central e C-terminal. O domínio N-terminal (~ 25 kDa) possui um sítio de ligação ao ATP, participando diretamente na atividade ATPásica da Hsp90 e se liga peptídeos e co-chaperonas e também a inibidores como geldanamicina e radicicol, por exemplo. Uma sequência de tamanho variável composta de aminoácidos carregados separa o domínio N-terminal do central, o que poderia conferir flexibilidade a esses domínios (WHITESELL et al., 1994; PRODROMOU et al., 1997; STEBBINS et al., 1997; BUCHNER, 1999; YOUNG; MOAREFI; HARTL, 2001). O domínio central (M) (~35 kDa) também está envolvido na atividade ATPásica em que um resíduo conservado de arginina (R380 - numeração para a Hsp90 de levedura) poderia interagir com um fosfafo-γ do ATP ligado ao domínio Nterminal e direcionar a hidrólise do ATP. Além disso também interage com proteínasclientes e co-chaperonas (MEYER et al., 2003). O domínio C-terminal (~12 kDa) é responsável pela dimerização da Hsp90, possui sítios de ligação para cochaperonas, como aquelas que contêm o motivo estrutural TPR (tetratricopeptide repeat) e interage com substratos (YOUNG; OBERMANN; HARTL, 1998). Ao contrário do que se pensava, foi demonstrado que o C-terminal é capaz de assumir uma dinâmica alternando entre estados aberto e fechado, sendo que durante a hidrólise de ATP, o equilíbrio é deslocado para o estado aberto, mostrando cooperatividade entre os domínios da Hsp90 (RATZKE et al., 2010). Também no domínio C-terminal foi identificado um sítio de ligação que não é idêntico ao sítio de ligação de nucleotídeo/geldanamicina (GA), descrito como sítio de interação com o inibidor novobiocina, o qual interfere na função da Hsp90, diminuindo os níveis de algumas proteínas-cliente relacionadas a alguns tipos de câncer (MARCU; SCHULTE; NECKERS, 2000; MARCU et al., 2000). Recentemente foi elucidada a estrutura por modelagem da Hsp90 ligada à novobiocina (MATTS et al., 2011).

A atividade chaperona da Hsp90 independente de ATP foi demonstrada *in vitro* através da prevenção da agregação da citrato sintase, uma proteína modelo que mostra rápida agregação a 43 °C e se torna inativa, porém a Hsp90 foi capaz de interagir de modo transiente com intermediários desenovelados, impedindo a agregação irreversível da citrato sintase que atinge novamente seu estado nativo (JAKOB et al., 1995). Resultados semelhantes foram obtidos com Hsp90 de levedura, bovina e de *Escherichia coli*, sugerindo ser esse um mecanismo geral de ação dessa chaperona e também um mecanismo de ação contra choque térmico *in vivo* (JAKOB et al., 1995). Também foi demonstrada a atividade chaperona da Hsp90 e dos domínios N e C da Hsp90 humana em relação à rodanase, onde foi visto um aumento da atividade proporcional à concentração dos domínios, sugerindo a existência de diferentes sítios de ligação com polipeptídeos desenovelados com diferentes especificidades (YOUNG; SCHNEIDER; HARTL, 1997).

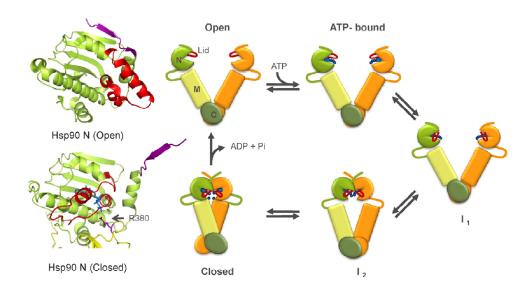
A função da Hsp90 na célula depende diretamente da hidrólise de ATP, ou seja, a atividade ATPásica é essencial para essas proteínas. Isso pode ser uma propriedade de todos os membros da família das Hsp90, já que resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com ATP são conservados em diferentes organismos, sendo relatada a importância dessa atividade *in vivo* em Saccharomyces cerevisiae (PANARETOU et al., 1998; OBERMANN et al., 1998). A atividade ATPásica da Hps90 humana *in vitro*, mostrada pela primeira vez, foi mais baixa que na proteína de levedura e foi inibida pela p23 (MCLAUGHLIN; SMITH; JACKSON, 2002).

A baixa atividade ATPásica da Hsp90, quando comparada com outras chaperonas moleculares, pode ser estimulada pela interação com algumas cochaperonas. Além disso, a regulação da hidrólise de ATP pode ocorrer por meio de sequências de aminoácidos da própria Hsp90, as quais podem variar de organismo para organismo (OWEN et al., 2002). A reação lenta de hidrólise do ATP e as mudanças conformacionais anteriores a ela determinariam a taxa de hidrólise (WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004). Mais do que a reação de hidrólise, as

mudanças conformacionais ocorridas na Hsp90 seriam as responsáveis pela etapa limitante da atividade ATPásica (HESSLING; RICHTER; BUCHNER, 2009).

O ciclo ATPásico da Hsp90 está ilustrado na figura 1. Quando a Hsp90 está na forma aberta, o ATP se liga ao sítio de ligação de nucleotídeo presente no domínio N-terminal, que se fecha sobre ele através do segmento *lid* (I1) e leva a uma aproximação ao domínio N-terminal do outro monômero (I2). Outras mudanças conformacionais levam a Hsp90 ao estado fechado compactado, com a interação entre o domínio N e M, onde a arginina 380 do domínio M direciona a hidrólise do ATP e a Hsp90 retorna para a conformação aberta (HAHN, 2009; MEYER et al., 2003; HESSLING; RICHTER; BUCHNER, 2009; ALI et al., 2006) (Fig.1).

Figura 1 - Esquema mostrando o ciclo ATPásico da Hsp90. A ligação do ATP no domínio N-terminal da Hsp90 no estado aberto leva a mudanças conformacionais e a intermediários que levam ao estado fechado e a posterior hidrólise do ATP. À esquerda estão representadas as estruturas cristalográficas do domínio N-terminal da Hsp90 de levedura nos respectivos estados conformacionais abertos e fechados.



Fonte: Hahn. BMB reports, 2009. p. 624.

Assim, após sofrer diversas modificações conformacionais após a ligação do ATP, haveria a formação de dois estados intermediários e então, o estado cataliticamente ativo, onde o posicionamento do *lid* permite que o *loop* catalítico contendo a R380 se posicione de maneira a interagir com o sítio de ligação a ATP (PRODROMOU, 2011).

Além disso, foi proposto um novo mecanismo baseado em um modelo cinético mínimo de quatro estados conformacionais da Hsp90 de levedura, sendo 2 estados abertos (A e D) e 2 estados fechados (B e C). A ligação do ATP diminuiria a barreira de energia entre os estados D-A e B-C, interferindo na atividade ATPásica, deslocando o equilíbrio conformacional para a conformação fechada. Portanto, as mudanças conformacionais entre os estados aberto-fechado não estariam acoplados com a atividade ATPásica, na ausência de co-chaperonas e proteínas-clientes, embora a ligação de ATP aumente a atividade por acelerar algumas mudanças conformacionais (MICKLER et al., 2009; HESSLING; RICHTER; BUCHNER, 2009).

Durante esse ciclo, diversas proteínas-clientes podem se ligar a Hsp90 e a liberação dessas proteínas-clientes está relacionada à hidrólise do ATP, podendo ser aumentada com o auxílio de co-chaperonas como a p23 (YOUNG; HARTL, 2000). As associações com as proteínas-clientes e co-chaperonas são dinâmicas e a Hsp90 participa de heterocomplexos protéicos (BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 1997). São inúmeras as proteínas que interagem com a Hsp90, sendo identificadas de 200 lista de tais proteínas, mais (para checar uma acessar http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf) destacando-se os receptores de hormônios esteróides, proteínas quinases e outras não relacionadas (BUCHNER, 1999; WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004; LI; SOROKA; BUCHNER, 2012; KRUKENBERG et al., 2011) as quais são diferentes estruturalmente, ou seja, existem várias possibilidades de interação com a Hsp90 (WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008; KRUKENBERG et al., 2011). Devido a sua versatilidade, a Hsp90 é capaz de formar inúmeros complexos na ativação das proteínas-cliente, envolvendo diferentes co-chaperonas que atuam de maneira específica para cada complexo e regulam a atividade da Hsp90 (PRODROMOU, 2011).

1.2 Co-chaperonas

Dentre as co-chaperonas das Hsp90, destacam-se algumas principais, como por exemplo, a Hop (Sti1 em levedura), a Aha1 e a p23 (Sba1 em levedura). A Hop (<u>H</u>sp70/Hsp90 <u>organizing protein</u>) é uma proteína que possui nove motivos TPR e, através deles, interage com o domínio C-terminal tanto da Hsp70 quanto da Hsp90, modulando a atividade entre essas chaperonas (PRATT; TOFT, 2003; SCHEUFLER et. al., 2000; PEARL; PRODROMOU, 2001). Um modelo proposto recentemente descreve a ligação assimétrica da Hsp70 com o TPR1 da Hop e com a Hsp90 para

transferir um substrato para o complexo Hsp90-Hop entre os protômeros da Hsp90 (SOUTHWORTH; AGARD, 2011). Foi demonstrado in vitro que a Sti1 inibiu a atividade ATPásica da Hsp90 (PRODROMOU et al., 1999). Através da estrutura obtida por microscopia crio-eletrônica do complexo Hsp90-Hop humana, foi sugerido que essa inibição ocorre devido à interação da Hop na junção M-C da Hsp90 impedindo a rotação que é observada com a dimerização do N-terminal, além do domínio TPR1 bloquear estericamente dimerização а do N-terminal (SOUTHWORTH; AGARD, 2011). Além disso, ela interage com outras chaperonas e participa de outros complexos proteicos citoplasmáticos e nucleares não totalmente esclarecidos (ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004).

A Aha1 é uma co-chaperona que se liga ao domínio intermediário da Hsp90 levando a mudanças conformacionais. Tais mudanças possibilitam o posicionamento da R380 (numeração em relação à proteína de levedura) desse domínio, de maneira a estimular a hidrólise do ATP ligado ao domínio N-terminal da Hsp90 e, portanto, aumentando a atividade ATPásica (MEYER et al., 2004). Estudos recentes revelaram que aminoácidos 116 e 123 localizados no domínio N-terminal da Hsp90 humana (isoforma β) são importantes para a interação com a Aha1 adicionalmente ao domínio intermediário (ZURAWSKA et al., 2010). Além disso, deve haver um mecanismo de cooperação envolvendo os dois domínios da Aha1 para aumentar a atividade ATPásica da Hsp90 de maneira efetiva. A interação entre Aha1 e Hsp90 ocorre de forma assimétrica, sendo um monômero da Aha1 para um dímero de Hsp90 (RETZLAFF et al., 2010). De forma não usual, a Aha1 pode ser capaz de fazer parte de complexos juntamente com outras co-chaperonas que interagem com a Hsp90 em outros estágios do ciclo de atividade ATPásica (PANARETOU et al., 2002). A presença da Aha1 desloca a p23 de um complexo com a Hsp90 (HARST; LIN; OBERMANN, 2005; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006) e assim como a p23, não está envolvida na entrega de proteínas-cliente para a Hsp90 (PRODROMOU, 2011).

A p23 é uma proteína pequena e ácida, com um domínio C-terminal fortemente carregado constituído por sequências repetitivas (PEARL; PRODROMOU, 2001). Essa proteína foi primeiramente observada em um complexo não ativado de receptor de progesterona aviário (SMITH; FABER; TOFT, 1990) e posteriormente identificada como uma proteína conservada presente em um mesmo

complexo de galinha, ligada ao receptor possivelmente através da Hsp90, podendo estar envolvida no enovelamento e processamento de receptores de hormônios esteróides (JOHNSON et al., 1994). Foi sugerida a associação da Hsp90 com a p23 e imunofilinas e a importância da p23 para a formação do complexo com os receptores esteróides, envolvendo a hidrólise de ATP (JOHNSON; TOFT, 1994). Posteriormente foi relatado o envolvimento de outras chaperonas no processo de formação do complexo mantendo-o no estado nativo in vitro, como a Hsp70, Hsp40, Hop, além da Hsp90 e p23, que participariam dinamicamente durante a formação em diferentes estágios, porém a função da p23 nesse complexo não foi completamente estabelecida (KOSANO et al., 1998). Já em um estudo com o receptor de glucocorticóide (GR), foi mostrada a importância da p23 para a estabilização tanto do heterocomplexo nativo GR:Hsp90 quanto do complexo final GR:Hsp90:p60:Hsp70 independente de ATP (DITTMAR et al., 1997). Através do uso de mutantes da Hsp90 humana foi confirmada a interação da p23 em um estado da Hsp90 ligada ao ATP e a dissociação após a hidrólise do mesmo (OBERMANN et al., 1998). A p23 também pode se ligar a Hsp90 na ausência de ATP, embora com menor afinidade quando comparada com a presença de AMPPNP (MCLAUGHLIN et al., 2006; SILIGARDI et al., 2004).

A proteína de levedura (*S. cerevisiae*) ortóloga à p23 humana, denominada de Sba1, foi identificada em 1998 e descrita com características semelhantes. Por exemplo, 1) a presença de um C-terminal carregado, 2) a interação com a Hsp90 que é interrompida pelo inibidor de Hsp90 geldanamicina, 3) migração em gel desnaturante com massa molecular maior que o esperado (FANG et al., 1998), e 4) participação de complexos que incluem a Hsp90, Hsp70 e p60/Sti1 (NICOLET; CRAIG, 1989; SMITH et al., 1993; FANG et al., 1998).

A interação com a Hsp90 ocorre através do domínio N-terminal, com 2 moléculas de p23 por dímero de Hsp90 (ALI et al., 2006, MCLAUGHLIN et al., 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que a p23 interage com o domínio M da Hsp90 (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006) e também com o segmento *lid* do sítio de ligação ao nucleotídeo (KARAGÖZ et al., 2011). A interação com o *lid* mudaria o ambiente do sítio de ligação ao nucleotídeo, levando a um mecanismo de diminuição da hidrólise de ATP pela p23 (KARAGÖZ et al., 2011). Antes disso já tinha sido atribuída a função da p23 de inibir a atividade ATPásica da Hsp90. As modificações

conformacionais que ocorrem nesse processo são importantes para o ciclo de atividade ATPásica da Hsp90 (WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004).

A p23 em solução é um monômero com massa molecular de 18 kDa e é constituída por um domínio N-terminal enovelado em folhas-β e um C-terminal flexível não estruturado com cerca de 30 resíduos na p23 humana (WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999; WEAVER et al., 2000). A estrutura cristalográfica da p23 humana apresenta uma sequência de aminoácidos WPRLTKE (resíduos 86-92, no C-terminal), descrita como característica dessa família de proteínas (WEAVER et al., 2000). Em estudos com mutantes sem os últimos 30-35 resíduos de aminoácidos foram demonstrados que essa região não estruturada não é necessária para que ocorra a interação com a Hsp90 (WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999; WEAVER et al., 2000).

In vitro foi relatado que a p23 possui atividade chaperona ao prevenir a agregação da citrato sintase (CS) na razão de 1:8 (CS:p23) independente de ATP (BOSE et al., 1996; WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999) e a extremidade C-terminal flexível parece ser importante para essa atividade (WEAVER et al., 2000). Também foi descrita a interação da p23 com a β-galactosidade desnaturada, formando um complexo de alto peso molecular e mantendo-a num estado intermediário passível de enovelamento para atingir a estrutura nativa (FREEMAN; TOFT; MORIMOTO, 1996).

As funções *in vivo* da p23 não são totalmente compreendidas, mesmo no organismo modelo *S. cerevisiae* (FORAFONOV et al., 2008) e a investigação acerca das funções relacionadas à Hsp90 é feita através do uso de inibidores da mesma, como por exemplo a GA, que interrompe o ciclo funcional da Hsp90 prejudicando a interação com a p23 (STEBBINS et al., 1997; BOHEN, 1998). Dentre as possíveis funções atribuídas à p23, destaca-se a proteção contra os inibidores de Hsp90, já que a ausência desse gene em levedura levou a uma hipersensibilidade a eles, independentemente da atividade chaperona intrínseca da p23, além de apresentar uma ampla interface de interação com a Hsp90 que mesmo com a divergência evolutiva, torna essa co-chaperona capaz de se ligar a ela e protegê-la (FORAFONOV et al., 2008). Estudos mostraram a importância da p23 na função da Hsp90 relacionada à sua atividade chaperona frente a algumas proteínas-clientes (PRATT; TOFT, 2003; YOUNG; MOAREFI; HARTL, 2001; FELTS; TOFT, 2003)

inclusive como sendo um fator de liberação do substrato levando a dissociação deste da Hsp90 (YOUNG; HARTL, 2000). Foi proposto que a maturação de proteínas-clientes ocorre com a formação de um segundo complexo contendo a Hsp90-Cpr6-p23 após a prolil-isomerase Cpr6 deslocar a Hop do complexo inicial (RICHTER; WALTER; BUCHNER, 2004). Ainda em relação ao ciclo funcional da Hsp90, a p23 atua reduzindo (RICHTER; WALTER; BUCHNER, 2004) ou inibindo sua atividade ATPásica, prevenindo a interação dos domínios N e M da Hsp90 ou o posicionamento do loop catalítico presente no domínio M (MCLAUGHLIN et al., 2006).

1.3 Inibidores da Hsp90

Muitos estudos descrevem os diferentes tipos de inibidores das Hsp90. A GA é um antibiótico do tipo ansamicina que se liga ao domínio N-terminal da Hsp90 (STEBBINS et al., 1997), de maneira a mimetizar o ATP e formar um complexo mais estável (BUCHNER, 1999). A interação GA-Hsp90 leva à degradação das proteínasclientes através do proteossomo, uma vez que não alcançam o enovelamento correto devido à inibição da Hsp90 pela GA (CHIOSIS et al., 2004; CALDERWOOD et al., 2006; SCHULTE; AN; NECKERS, 1997; SCHNEIDER et al., 2006). Tem sido demonstrado que o papel regulatório exercido pelas Hsp90 dentro da célula as torna essenciais para diversos organismos, incluindo o parasita da malária (DEVANEY et al., 2005; BORKOVICH et al., 1989; CUTFORTH; RUBIN, 1994; RUTHERFORD; LINDQUIST, 1998; QUEITSCH; SANGSTER; LINDQUIST, 2002; PALLAVI et al., 2010). Isso faz com que essa família de proteínas seja alvo para o combate de doenças infecciosas e não-infecciosas, embora os detalhes da relação entre estrutura e função não estejam sistematicamente atribuídos (PALLAVI et al., 2010).

Alguns estudos apontam para o potencial uso das Hsp90 para o desenvolvimento de fármacos contra doenças como malária, leishmaniose, doença de chagas e principalmente vários tipos de câncer, sendo que muitos estudos indicam o uso de inibidores das Hsp90 como GA e análogos para esse propósito (WIESGIGL; CLOS, 2001a; WIESGIGL; CLOS, 2001b; BANUMATHY et al., 2003; KUMAR; MUSIYENKO; BARIK, 2003; PAVITHRA et al., 2004; KAMAL et al., 2003; WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004; SÕTI et al., 2005; POWERS; WORKMAN, 2007; NECKERS; WORKMAN, 2012). Um análogo da GA denominado 17AAG (17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin) se mostrou menos tóxico e com efeitos

biológicos semelhantes à GA, podendo ser utilizado em ensaios clínicos para o tratamento de alguns tipos de câncer (SCHULTE; NECKERS, 1998; SÕTI et al., 2005). Tem sido mostrado significativa atividade anti-tumor do 17AAG embora seja necessário conhecer os mecanismos que levam à morte celular por meio da inibição da Hsp90, visando-se utilizar uma terapia combinada para uma maior eficácia *in vivo* (USMANI; BONA; LI, 2009). Diversos fármacos estão sendo desenvolvidas e estão em fase clínica para o tratamento de alguns tipos de câncer, sendo que a perspectiva mais promissora é no sentido de combinar inibidores da Hsp90 que bloqueiam a função de uma determinada oncoproteína-cliente da Hsp90 para aumentar a eficácia das drogas (NECKERS; WORKMAN, 2012).

1.4 Hsp90 e parasitas

Dentre as doenças que são chamadas de doenças tropicais negligenciadas, a Leishmaniose é uma das mais negligenciadas, principalmente em países pobres, em que anualmente surgem cerca de dois milhões de novos casos (WHO, 2010). Atinge aproximadamente 12 milhões de pessoas em 88 países (SANTOS et al., 2008). Protozoários do gênero Leishmania são o agente etiológico que, ao infectarem o hospedeiro mamífero causam a lise de macrófagos. A transmissão ocorre por picadas de fêmeas de mosquitos do gênero Phlebotomus (HERWALDT, 1999; SANTOS et al., 2008). Dependendo da espécie de Leishmania, desenvolve-se um tipo de leishmaniose: a cutânea, cutânea difusa, visceral ou muco-cutânea, sendo que essa última é causada pela L. braziliensis e provoca lesões destrutivas das cavidades oro-nasais e faringe (DESJEUX, 1996), podendo também atingir traqueia e palato (AMATO et al., 1998). O tratamento para a leishmaniose muco-cutânea é feito por meio de medicamentos antimoniais como Glucantime e Pentostam, porém os efeitos colaterais são diversos e há contraindicações (GONZALEZ et al., 2009; AMATO et al., 2007). Sendo assim, existe a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com menos efeitos colaterais e mais eficácia para serem utilizadas no tratamento das leishmanioses (CROFT; OLLIARO, 2011; SANTOS et al., 2008). Para infectarem o mamífero hospedeiro, os parasitas necessitam de termotolerância e sofrem alterações morfológicas com a mudança de temperatura, de promastigotas para amastigotas, levando também a mudanças na expressão (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994). Além das mudanças de temperaturas, os parasitas também enfrentam mudança de pH e o sistema imunológico do hospedeiro e as Hsp90 são fundamentais para sua adaptação e proliferação, pois o distúrbio na homeostase leva à diferenciação morfológica dos parasitas (ROY et al., 2012). Em geral, chaperonas moleculares vem sendo alvo de estudo durante o processo infeccioso do parasita, mostrando-se serem essenciais para a viabilidade do parasita, algumas sendo identificadas participando de complexos estágios-específicos e reguladas por fosforilação (MORALES et al., 2010; SHONHAI et al., 2011), sendo alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Estudos Plasmodium falciparum, mostraram que parasitas como Trypanosoma cruzi e Leishmania donovani quando tratados com GA tiveram uma resposta ao estresse ou o crescimento e diferenciação celular inibidos (BANUMATHY et al., 2003; GRAEFE et al., 2002; WIESGIGL; CLOS, 2001a; WIESGIGL; CLOS, 2001b). Em cultivo in vitro de P. falciparum, foi demonstrado que a GA inibiu o crescimento do parasita com um valor de IC₅₀ de 20 nM e a inibição ocorreu de maneira sinérgica quando em conjunto com cloroquinina, além de causar a morte do parasita dentro do eritrócito infectado (KUMAR; MUSIYENKO; BARIK, 2003). Recentemente foi sugerido que o desenvolvimento de inibidores seletivos da Hsp90 poderia ser usado conjuntamente com outros compostos antimaláricos (SHAHINAS et al., 2010; WIDER et al., 2009; PALLAVI et al., 2010). A Hsp90 é importante para a Leishmania quando ocorre a transformação da forma promastigota no inseto vetor para a forma amastigota no hospedeiro humano, pois a diferença de temperatura provoca um distúrbio na homeostase e leva a essa diferenciação. Sendo assim, é preciso investigar e analisar as informações disponíveis para utilizar inibidores de Hsp90 como novas drogas contra protozooses (ROY et al., 2012). Entretanto, é importante identificar parceiros específicos e vias metabólicas que envolvem as chaperonas moleculares para facilitar a intervenção em etapas que podem aprimorar o potencial inibitório de alguns componentes (SHONHAI, 2010).

Diante do contexto, é importante ressaltar que frente a inúmeros estudos envolvendo as Hsp90 de diferentes organismos no que diz respeito ao seu potencial no desenvolvimento de fármacos, é necessário elucidar os mecanismos relacionados ao ciclo funcional e às particularidades de cada membro dessa família de proteínas. Nesse sentido, torna-se interessante também o estudo da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*, cujas informações sobre o ciclo funcional e o comportamento frente a inibidores são relativamente escassas e ainda é um problema de saúde pública visto que afeta muitos brasileiros a cada ano.

1.5 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção e caracterização da proteína recombinante Hsp90 de *Leishmania braziliensis*, dos seus domínios N e N+M a fim de se determinar os fatores importantes para o funcionamento da Hsp90 neste protozoário correlacionando com as mudanças conformacionais que a proteína sofre devido à interação com seus agentes reguladores. Além disso, também determinar os efeitos inibitórios da Hsp90 pela GA.

1.5.1 Objetivos específicos

- Clonar o DNA, expressar e purificar a Hsp90 recombinante de *L. braziliensis* (LbHsp90), seus domínios N-terminal (LbHsp90_N), NM (LbHsp90_NM) e suas co-chaperonas p23 (Lbp23A e Lbp23B);
- Caracterizar estruturalmente as proteínas recombinantes produzidas;
- Avaliar a interação da LbHsp90 com ligantes naturais e com o inibidor GA, assim como das proteínas LbHsp90_N e LbHsp90_NM;
- Determinar a atividade chaperona da LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM;
- Determinar a atividade ATPásica da LbHsp90 e LbHsp90_NM;
- Determinar a inibição da atividade ATPásica da LbHsp90 por GA, Lbp23A e Lbp23B
- Avaliar a interação *in vitro* da LbHsp90 com duas co-chaperonas p23.

2 Desenvolvimento

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Produção das proteínas recombinantes

Para produzir as proteínas de maneira heteróloga foram adotadas técnicas de biologia molecular após uma análise *in silico* das sequências de DNA de interesse referentes a cada proteína. Os passos seguidos até a obtenção das proteínas recombinantes puras são descrito a seguir.

2.1.1.1 Bioinformática

As ferramentas de bioinformática foram utilizadas para identificar as sequências de DNA de interesse do estudo. Para isso foi feita uma busca nos bancos de dados *GenBank* do *NCBI* (*National Center of Biotechnology Information* - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool* - http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a partir das sequências de aminoácidos das proteínas ortólogas humanas. Para selecionar as sequências de DNA alvo, foi feito um alinhamento entre as sequências de DNA que codificam as proteínas Hsp90 e p23 de *L. braziliensis* e as correspondentes em humanos, utilizando a ferramenta de bioinformática *LALIGN* (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN form.html). As sequências escolhidas como alvo de estudo foram as que apresentaram maior porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos das proteínas de *L. braziliensis* e as humanas.

2.1.1.2 Análise do número de genes de Hsp90 no genoma de L. braziliensis e alinhamento entre as estruturas primárias das proteínas alvo e proteínas ortólogas

Foi feita uma busca no genoma de *L. braziliensis* para identificar o número de Hsp90 existentes. O programa *Clustal W* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) foi utilizado para analisar a identidade entre a LbHsp90/Hsp83-1 (GenPept ID: XP_001567804.1- GENE ID: 5418737 LBRM_33_0340) e as Hsp90 ortólogas de *Leishmania major* (LmHsp90 – GenPept ID: XP_001685759.1), *Leishmania donovani* (LdHsp90 - GenPept ID: ADX97246.1), *Trypanosoma cruzi* (TcHsp90 – GenPept ID: XP_811791.1), *Trypanosoma brucei* (TbHsp90 – GenPept ID: XP_823307.1), de

levedura, Saccharomyces cerevisiae (yHsp90 - GenPept ID: NP_015084.1) e humana (hHsp90α – GenPept ID: NP_005339.3)

O mesmo programa também foi utilizado para fazer o alinhamento entre as proteínas Lbp23A (*hypothetical protein* GenPept ID: XP_001568545.1), Lbp23B (GenPept ID: XP_001564309.1) e a p23 humana (*hypothetical protein* GenPept ID: NP 006592.3).

2.1.1.3 gDNA

O gDNA de *L. braziliensis* foi gentilmente fornecido pela Professora Dra. Ângela Kaysel Cruz (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP). Para *L. braziliensis* foi obtido o gDNA porque o seu genoma não possui íntrons. Esse gDNA foi utilizado como molde para a obtenção dos DNAs identificados como alvo do estudo.

2.1.1.4 Construção dos oligonucleotídeos específicos para isolar as sequências de DNA de interesse

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir das sequências de DNA alvo identificadas por meio da análise de bioinformática. Os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar os DNAs de interesse, a partir de regiões que flanqueavam cada sequência. No iniciador 5' nas regiões dos códons de iniciação dos DNAs alvos e no iniciador 3' nas regiões dos códons de terminação, foram inseridos sítios de reconhecimento para enzimas de restrição para posterior clonagem em vetor de expressão. As enzimas de restrição foram escolhidas após a análise das sequências, que não apresentavam sítios de reconhecimento originalmente e devido à disponibilidade no laboratório. Foram escolhidas as enzimas *Nde* I e *Eco* RI para LbHsp90, *Nde* I e *Bam* HI para LbHsp90_N, *Nde* I e *Sac* I para LbHsp90_NM, *Nde* I e *Hind* III para Lbp23A e *Nde* I e *Eco* RI para Lbp23B.

2.1.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação foi realizada no equipamento *MyCycler Thermal Cycler* (BioRad), usando a enzima *Taq DNA polimerase* (New England BioLabs) para amplificar os DNAs que codificam as proteínas LbHsp90_N, Lbp23B e LbHsp90_NM e a enzima de alta fidelidade *Phusion*® (Finnzymes) para LbHsp90 e Lbp23A. Após o desenovelamento inicial dos DNAs molde (10 ng de gDNA de *L. braziliensis*) a 95 °C

por 5 minutos, foi iniciado o ciclo de desenovelamento das fitas de DNA, anelamento dos oligonucleotídeos específicos (1 minuto) e extensão da cadeia de DNA pela polimerase, por 36 vezes. As particularidades do ciclo de PCR utilizado para cada DNA alvo estão descritas na tabela 1. Após o ciclo, foi seguida de uma etapa de polimerização final a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 1 - Informações sobre as etapas da PCR para os DNAs alvo.

DNA alvo	Temperatura de anelamento (°C)	Tempo de polimerização (min)
LbHsp90	65,0	3,0
LbHsp90_N	56,4	1,5
LbHsp90_NM	56,1	1,0
Lbp23A	65,0	1,5
Lbp23B	54,9	1,5

A amplificação dos DNAs de interesse foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) previamente preparado com tampão TAE: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM. Para a aplicação das amostras no gel, foi adicionado um tampão da amostra (6X *gel-loading buffer*) contendo 0,23% (w/v) de azul de bromofenol, 0,25% (w/v) de xileno cianol FF e 30% (w/v) de glicerol em água e o gel foi submetido a uma voltagem de 110 Volts por aproximadamente 30 minutos. Para possibilitar a visualização do DNA amplificado, o gel foi incubado com o tampão TAE, contendo 0,1 µg/mL de brometo de etídio, por 20 minutos, e visualizado através de luz ultravioleta, no *Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro* acoplado a um computador, para permitir o registro das imagens dos géis. O tamanho do produto de PCR foi comparado com um padrão de massa molecular comercial e, após a obter a amplificação dos DNAs de interesse de tamanho esperado, o produto de PCR foi purificado do gel de agarose com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

2.1.1.6 Clonagem em vetor de propagação

Os produtos de PCR referentes ao domínio N-terminal da LbHsp90 e a Lbp23B foram clonados em vetor de propagação *pGEMT Easy Vector* (Promega). Esse vetor é linearizado e possui uma timina em cada extremidade para facilitar a ligação do produto de PCR proveniente da reação com a *Taq DNA polimerase* que

adiciona adenina nas extremidades da sequência amplificada. O vetor possibilita a seleção de colônias recombinantes por meio da resistência ao antibiótico ampicilina (20 µg/mL) e pela coloração branca dos clones positivos, pois o DNA é inserido dentro da sequência que codifica a β-galactosidade e, portanto, não há degradação do substrato cromogênico. Para Lbp23A foi utilizado o vetor pCR-Blunt proveniente do Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) que possibilita a clonagem de DNAs com extremidades cegas, provenientes da amplificação com DNA-polimerase Phusion e a seleção dos recombinantes foi feita pela resistência ao antibiótico canamicina 50 (µg/mL) e pela interrupção do gene ccaB que é tóxico para a célula, pela inserção do fragmento de DNA. Para LbHsp90 e LbHsp90 NM foi utilizado o vetor pTZ57R/T do InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) e, pelo fato desse vetor ser linearizado e conter uma timina em cada extremidade, o produto de PCR da LbHsp90 amplificado com a enzima Phusion com extremidades cegas foi adenilado previamente à ligação no vetor. A adenilação foi feita com a enzima True Start Tag DNA polimerase (Fermentas) numa reação contendo tampão da enzima com MgCl₂, 0,2 mM de dATP por 30 minutos a 72°C. A ligação do DNA alvo ao vetor foi feita através de uma DNA ligase (Promega para o pGEMT, Invitrogen para pCR-Blunt e Fermentas para pTZ). Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células de E. coli DH5α CaCl₂ competentes por meio de choque térmico a fim de se obter os clones recombinantes. Foi utilizada a cepa DH5α, pois apresenta algumas características apropriadas para a multiplicação e manutenção dos vetores recombinantes, como por exemplo, uma mutação endA1 que inativa endonucleases intracelulares capazes de degradar plasmídeos em métodos de extração de DNA plasmidial.

2.1.1.7 Preparação das bactérias CaCl₂ competentes

A cepa a ser preparada foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB (Luria-Bertani – composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) sem antibiótico e foi mantida sob agitação por 16 horas a 37 °C e 200 rpm. Esse pré-inóculo foi diluído 1:100 em 100 mL de meio LB sem antibiótico e a cultura permaneceu nas mesmas condições descritas anteriormente até atingir a densidade óptica (D.O.) em 600 nm de 0,4-0,6. Após esse tempo a cultura foi centrifugada por 7 minutos a 4000 rpm e 4 °C e as células precipitadas foram ressuspendidas em 35 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado e estéril. As células foram mantidas no gelo por 20

minutos e centrifugadas novamente por 7 minutos a 3500 rpm e 4 °C. Por fim, as células foram ressuspendidas cuidadosamente em solução contendo 8 mL de CaCl₂ 0,1 M + 2 mL de glicerol 50%, ambos gelados e estéreis. Alíquotas de 200 μL foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C.

2.1.1.8 Transformação das bactérias CaCl₂ competentes

As transformações foram feitas por meio de choque térmico (90 segundos a 42 °C, 3 minutos a 4 °C seguidos por 45 minutos a 37 °C para restabelecimento das células). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar (15 g de ágar/L) contendo antibióticos de acordo com o plasmídeo transformado e mantidas em estufa a 37 °C durante 16 horas.

2.1.1.9 Análise dos recombinantes

Para analisar os clones recombinantes, os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando o kit *Wizard Plus SV Mini-Prep* (Promega) que se baseia no método de lise alcalina para extração em pequena escala. Os clones recombinantes foram verificados por meio de análise de restrição com as enzimas de restrição cujos sítios de reconhecimento foram adicionados aos oligonucleotídeos específicos utilizados na PCR. Após digestão por 4 horas a 37 °C, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose para verificar se a digestão dos clones recombinantes levou à liberação do DNA alvo inserido de tamanho esperado. Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento automático de DNA realizado no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), para assegurar a integridade das sequências dos DNAs alvo.

2.1.1.10 Subclonagem em vetor de expressão

Após confirmação dos recombinantes clones pTZ::LbHsp90, pGEMT::LbHsp90_N, pCR-BLUNT::LbHsp90_NM, pCR-BLUNT::Lbp23A pGEMT::Lbp23B, os DNAs alvo foram clivados com as enzimas de restrição específicas para cada um e utilizados para a subclonagem em vetor de expressão pET28a (Novagen) para a produção de proteínas recombinantes em E. coli. Para isso, o vetor foi previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição que os respectivos DNAs alvo, para que a ligação DNA-vetor fosse direcional e em fase com uma sequência de 6 histidinas no N-terminal do vetor (His-tag) que facilita a purificação das proteínas por afinidade a íons metálicos. O vetor pET28a apresenta um sistema que baseia-se no *operon lac* que ocorre em bactérias que está sob controle do promotor T7 (do bacteriófago T7) para que ocorra a expressão da proteína alvo. Esse promotor só é reconhecido pela RNA polimerase do bacteriófago (T7 RNA polimerase) expressa pela célula hospedeira somente quando estiver presente o indutor (IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, análogo ao indutor natural 1,6 alolactose). A T7 RNA polimerase então reconhece o promotor T7 do pET28a e ocorre a expressão da proteína cuja sequência de DNA que a codifica foi devidamente inserida no vetor. Isso permite a expressão controlada da proteína alvo.

A ligação dos DNAs alvo com o vetor de expressão foi feita por meio de uma DNA ligase e o produto de ligação foi utilizado para transformação em DH5α, como descrito anteriormente. A análise dos recombinantes seguiu o protocolo descrito no item 2.1.1.9.

2.1.1.11 Expressão das proteínas

Com a obtenção dos clones recombinantes no vetor de expressão, pET28::LbHsp90, pET28::LbHsp90_N, pET28::LbHsp90_NM, pET28::Lbp23A e pET28::Lbp23B, os mesmos foram utilizados para a expressão das respectivas proteínas recombinantes. Para a expressão das proteínas foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS.

A linhagem BL21(DE3) possui baixos níveis de expressão de proteases e possui integrado ao seu genoma o gene responsável pela síntese da T7 RNA polimerase (proveniente do genoma do profago λDE3) controlado sob o promotor *lac*UV5 e induzido com a adição de IPTG. A cepa BL21(DE3)pLysS também apresenta as características acima e adicionalmente possui um plasmídeo que confere resistência a cloranfenicol e expressa constitutivamente a lisozima T7 e, por sua vez, inibe a T7 RNA polimerase possibilitando que a expressão da proteína seja mais lenta.

As cepas de expressão foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por meio de choque térmico e o protocolo para expressão das proteínas é descrito a seguir. Uma colônia de bactéria contendo o plasmídeo recombinante foi utilizado para fazer um inóculo em meio LB contendo canamicina (50 µg/mL) para BL21(DE3) e para BL21(DE3)pLysS, sendo que nesse último caso

também foi adicionado cloranfenicol (25 μg/mL). A cultura foi mantida a 37 °C durante 16 horas e posteriormente diluída 100 vezes num volume de 1 L com os respectivos antibióticos. Foi mantida sob agitação a 37 °C até atingir a D.O. a 600 nm de 0,4-0,6, quando a expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM para todas as proteínas (exceto para LbHsp90_N e LbHsp90_NM onde foi utilizado 0,2 mM) durante 4 horas a 37 °C (Lbp23A) e a 30 °C (LbHsp90, LbHsp90_N, LbHsp90_NM e Lbp23B).

2.1.1.12 Purificação das proteínas

Após a verificação da expressão das proteínas em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm a 4 °C e as células foram ressuspendidas em tampão de lise (Tris-HCI 50 mM, pH 8,0 contendo 100 mM de KCI). Em seguida foi adicionado 30 μg/μL de lisozima (Sigma) e 5 U de DNAse (Promega) e incubada em banho de gelo por 30 minutos. Para as duas p23 o tempo de incubação foi de 2 horas. A seguir, foi feita a lise com o sonicador *Sonifier 250* (Branson) por meio de 8 pulsos de 15 segundos com intervalos de 3 minutos e as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) foram separadas por centrifugação (2 etapas de 30 minutos a 18000 rpm, 4 °C) e analisadas por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970).

As proteínas solúveis foram submetidas às etapas de purificação. A primeira etapa foi feita por cromatografia de afinidade ao níquel, o qual possui afinidade a His-tag proveniente do vetor pET28a, fusionada com a proteína recombinante. Para essa etapa foi utilizada a coluna *Hitrap Chelating* de 5 mL (GE Healthcare) acoplada ao sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Cromatography*) utilizando o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare). O procedimento para essa purificação consistiu em uma etapa de preparação da coluna por meio da lavagem com 2 V de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Após a injeção da amostra a ser purificada, foi feita nova lavagem como descrito acima para eluição da fração não ligante. A eluição da proteína foi feita através da lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM e imidazol 500 mM. O imidazol também possui afinidade pelo níquel e, portanto, compete com as histidinas pela ligação à resina, possibilitando a eluição da proteína. As frações purificadas foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). Após essa etapa de purificação, as frações foram submetidas a uma segunda etapa de purificação

através da cromatografia de exclusão molecular (CEM) utilizando a coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Healthcare) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *ÄKTA Purifier* (GE Healthcare). O tampão usado foi HEPES 40 mM (pH 7,5), KCI 100 mM. A eficácia da purificação foi determinada por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). Para as proteínas LbHsp90_N (25 kDa), Lbp23A (24 kDa) e Lbp23B (25 kDa) a His-tag foi clivada com trombina (1U/mg de proteína) durante 48 horas a 4 °C, entre as etapas de purificação. Esse procedimento foi feito para evitar que houvesse modificação nas propriedades das proteínas devido à presença da His-tag que possui 2 kDa, o que em relação ao tamanho dessas proteínas, poderia interferir em suas características. A clivagem da His-tag foi verificada por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970).

2.1.1.13 Determinação da concentração das proteínas

A concentração de cada proteína foi determinada por espectroscopia, levando-se em consideração a proteína desenovelada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5) e clorohidrato de guanidina 6 M (EDELHOCK, 1967). O espectro de absorbância foi coletado entre os comprimentos de onda (λ) 250 e 300 nm após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente. Para calcular a concentração foi utilizada a lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \times I \times C$$
 [Equação 1]

onde A é a leitura de absorbância; ϵ , o coeficiente de extinção molar; I, comprimento do caminho óptico em centímetros e C, concentração em mol/L. A concentração molar determinada correspondeu à média das concentrações encontradas para cada λ entre 276 e 282 nm e multiplicado pelo fator de diluição. O coeficiente de extinção molar foi estimado usando o programa *Sednterp* (www.jphilo.mailway.com/download.htm).

2.1.2 Caracterização Biofísica

Com as proteínas puras foi possível iniciar os experimentos para caracterização biofísica. Os ensaios biofísicos foram realizados em geral para caracterizar a estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas recombinantes, determinando as propriedades de cada uma e auxiliando no entendimento funcional.

Neste tópico serão descritas as técnicas utilizadas de maneira geral. Os detalhes experimentais específicos relevantes serão pontuados em cada experimento ou relatados nos resultados, conforme necessidade.

2.1.2.1 Dicroísmo Circular (Circular Dichroism – CD)

A análise da estrutura secundária foi feita por CD e também para verificar se essa é modificada pela interação com MgCl₂ no caso da LbHsp90. Foi utilizado o espectropolarímetro *Jasco J810* nas dependências do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP. Os espectros de CD foram coletados com 32 acumulativas e tempo de resposta de 2 segundos. A contribuição do branco foi subtraída dos espectros resultantes. Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos para elipticidade residual molar (ERM) definida por:

$$ERM = (\theta \times MM)/(c \times I \times n)$$
 [Equação 2]

onde θ é a elipticidade em graus (Deg), MM é a massa molecular da proteína (g/mol), c é a concentração da proteína (mg/mL), l é o comprimento do caminho óptico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado pelo programa *CDNN Deconvolution* (BOHM; MUHR; JAENICKE, 1992). Esse tratamento de dados foi aplicado para todas as proteínas em estudo.

2.1.2.2 Cromatografia de exclusão molecular analítica

Essa técnica permitiu a obtenção da massa molecular aparente (MM_{app}) das proteínas em estudo, em que a eluição da proteína é comparada com um padrão de proteínas globulares de massas moleculares conhecidas. O tempo de retenção foi usado para calcular o Raio de Stokes (Rs) ou raio hidrodinâmico da proteína, cujo valor reflete a simetria ou assimetria da molécula, assim como o estado oligomérico. Para isso, foi usada a coluna *Superdex 200 GL 10/300* (Amersham Biosciences) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare). O padrão de proteínas utilizado continha as proteínas: apoferritina (480 kDa), γ-globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA – 67 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo c (12,3 kDa). As cromatografias foram feitas no tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM e β-mercaptoetanol 5 mM. A determinação do Rs foi feita a partir do tratamento dos dados da cromatografia de exclusão molecular analítica, utilizando os valores correspondentes ao volume de eluição das proteínas-padrão e da proteína-alvo para calcular o coeficiente de partição (K_{av}). Para isto, fez-se uso da seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$
 [Equação 3]

onde V_e é o volume de eluição de cada proteína, V_0 é o "void" e V_t é o volume de coluna total.

O K_{av} está relacionado ao log da MM pela equação apresentada abaixo. Com isso, foi construído um gráfico e a partir do ajuste linear foi possível determinar a MM_{app} segundo a equação a seguir:

$$K_{av} = -a(\log MM_{app}) + b$$
 [Equação 4]

em que a é o coeficiente linear da reta, e b é o coeficiente angular da reta.

Para calcular o Rs, foi feito um gráfico de Rs *versus* –logK_{av}^{1/2} e novamente um ajuste linear:

$$Rs = a(-\log K_{av}^{1/2}) + b$$
 [Equação 5]

em que Rs é o Raio de Stokes, a é o coeficiente linear da reta e b é o coeficiente angular da reta.

O valor experimental de Rs pode ser comparado ao valor teórico, calculado a partir da sequência de aminoácidos (LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002) pelo programa *Sednterp*. A razão entre o Rs experimental e o teórico resulta na razão friccional (f/f_0) , a qual diz respeito à assimetria da proteína-alvo, sendo que quanto maior que 1, mais assimétrica é a proteína.

2.1.2.3 Ultracentrifugação Analítica

Os experimentos de ultracentrifugação analítica para a LbHsp90, utilizando o método de velocidade de sedimentação, foram realizadas em um equipamento *Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge* (Beckman Coulter) no LEC/LNBio/CNPEM, em temperatura constante de 20 °C, utilizando o rotor AN- 60Ti (Beckman Coulter). A absorbância em função do raio posicional da amostra foi medida em comprimentos de onda de 236 a 239 nm dependendo da concentração de proteína. A velocidade do rotor foi de 25.000 rpm em tampão Tris 25 mM (pH7.5), NaCl 50 mM, β-mercaptoetanol 1mM. Foram coletadas 120 curvas por concentração de proteína.

As análises dos dados foram realizadas com o programa *SedFit* (SCHUCK, 1998; SCHUCK et al., 2002) para a determinação do coeficiente de sedimentação. Os dados de V_{bar}, densidade e viscosidade do tampão foram estimados através da sequência de aminoácidos da LbHsp90 feito pelo programa *Sednterp*.

2.1.2.4 Fluorescência intrínseca do triptofano

Foi utilizada essa técnica para investigar a estrutura terciária local, utilizando os triptofanos presentes em cada proteína como sonda. Os testes foram feitos utilizando o fluorímetro *F4500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer* do laboratório de Biofísica Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Marcel Tabak (IQSC-USP). Os parâmetros utilizados foram: comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 e/ou 295 nm, varredura de 290 a 420 nm (para λ_{exc} de 280 nm) e 305 a 420 nm (para λ_{exc} de 295 nm) a 20 °C. Para a LbHsp90 e seus domínios em estudo, a fluorescência foi usada para determinar as constantes de dissociação (K_D) entre as proteínas e os ligantes. Nesse sentido, as proteínas na concentração de 2,5 μ M foram incubadas com os nucleotídeos ATP e ADP, separadamente, nas

concentrações 0 a 750 μ M durante 30 minutos e então foram feitas as leituras de fluorescência. O mesmo procedimento foi feito utilizando AMPPNP, análogo não hidrolisável do ATP. Para verificar se a presença do íon Mg^{2+} alterava a K_D pelos ligantes, os ensaios foram feitos na ausência e presença de 5 mM de $MgCl_2$. Também foi utilizado o inibidor da Hsp90, GA, porém nesse último caso utilizando 2 μ M de proteína e as concentrações de 0 a 50 μ M de GA, mantendo a concentração de DMSO fixa de 1%. Os dados foram analisados com auxílio do software Origin 8.0 para o cálculo da K_D , usando o modelo de um sítio ligante e seguindo a equação:

$$\alpha = \frac{[L]}{[L] + K_D}$$
 [Equação 6]

onde α é o sinal observado, [L] refere-se à concentração de ligante.

A constante de afinidade (K_A) para cada ligante também foi determinada, sendo que K_A= 1/K_D. Os dados foram obtidos em duplicata e tratados conforme descrito na literatura (EPPS et al., 1999; RAWEL et al., 2006). Foi feita a correção do efeito de filtro interno que leva em consideração o coeficiente de extinção molar do ligante no comprimento de onda de excitação e emissão, conforme equação a seguir (EPPS et al., 1999):

$$F = F_u e^{-2,303 \epsilon l L_0}$$
 [Equação 7]

onde F é a fluorescência corrigida, F_u é a fluorescência obtida experimentalmente, ϵ é o coeficiente de extinção molar do ligante, I é o passo óptico pelo qual a luz é absorvida e L_0 é a concentração do ligante.

Em todos os casos, foram utilizados tanto o tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, β-mercaptoetanol 5 mM quanto o tampão HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 100 mM.

2.1.3 Caracterização funcional

A partir das proteínas puras e caracterizadas por métodos biofísicos, foram realizados ensaios para fazer a caracterização funcional das proteínas, a fim de buscar um entendimento das suas funções e correlacionar a estrutura-função entre elas.

2.1.3.1 Atividade chaperona

A atividade chaperona das proteínas LbHsp90, LbHsp90_NM e LbHsp90_N foi testada por meio da prevenção da agregação da citrato sintase (CS). Para isso foi utilizado 0,8 μM de CS em um controle positivo da agregação e amostras contendo 0,8 μM de CS com as proteínas em estudo em concentrações crescentes, incubadas por 1 hora a 45 °C em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5). A agregação da citrato sintase foi monitorada por espalhamento de luz a 320 nm utilizando um espectrofotômetro *V-630* (Jasco) acoplado a um banho térmico circulante Nova Ética. Também foram feitos controles negativos, sendo que em um deles foi utilizado 0,8 μM de CS incubada com 0,8 μM de albumina de soro bovino (BSA) e nos outros foram utilizados apenas as proteínas em tampão separadamente (0,8 μM de cada).

2.1.3.2 Determinação da atividade ATPásica

Para determinar a atividade ATPásica da proteína LbHsp90, foi utilizado o kit EnzChek® Phosphate Assay Kit (Invitrogen), o qual possibilita a quantificação de fosfato inorgânico (Pi) liberado em solução a partir da hidrólise enzimática do ATP. Isso ocorre quando, na presença de Pi, o substrato MESG (2-amino-6-mercapto-7metilpurina ribosídeo) é convertido em ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7metilpurina pela enzima PNP (purina nucleosídeo fosforilase), resultando na mudança do comprimento máximo de absorção de 330 para 360 nm, detectado por um espectrofotômetro. A quantificação de P_i é proporcional à taxa de hidrólise de ATP e pode ser mensurada pela relação da quantidade de Pi em uma curva padrão contendo 0; 10; 25; 50; 75 e 100 µM de uma solução de fosfato padrão e a quantidade de P_i liberada pela hidrólise de ATP quando incubado com LbHsp90, permitindo a determinação dos parâmetros cinéticos. A curva padrão foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit. A proteína LbHsp90 (2 µM considerando-a como monômero e preparada em HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo 100 mM de KCI) foi incubada com ATP por 90 minutos a 37 °C, utilizando as concentrações de ATP de 0 a 5 mM, na presença de 5 mM de MgCl₂. Foi feito um controle negativo utilizando apenas ATP, nas concentrações 0; 0,7; 2 e 5 mM, e os valores para as demais concentrações foram obtidas por regressão linear. Após o tempo de incubação, a reação com MESG foi preparada utilizando 0,2 U de PNP, 0,2 μM de MESG, 160 μL de cada reação de LbHsp90+ATP e tampão do kit 1X, no volume final de 200 µL. A partir do tratamento dos dados foi possível construir um gráfico de V_0 (μ M/min) em função da concentração de ATP (mM) e utilizando um ajuste de Michaelis-Menten, foi possível determinar os parâmetros cinéticos V_{max} ; constante catalítica (k_{cat}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). Para a proteína LbHsp90_NM foi seguido o mesmo protocolo descrito acima.

2.1.3.3 Inibição da atividade ATPásica

A inibição da atividade ATPásica da LbHsp90 foi determinada utilizando o inibidor GA, o qual compete com o ATP pelo mesmo sítio de ligação (PRODROMOU et al., 1997). Para isso foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém numa concentração fixa de ATP de 3 mM. A proteína LbHsp90 (1 μM considerando monômero) foi incubada previamente com GA por 30 minutos, em concentrações de 0 a 25 μM a temperatura ambiente, e posteriormente incubada com ATP (3 mM) por 3 horas a 37 °C, mantendo constante a concentração de DMSO de 2% (v/v), na presença de 5 mM de MgCl₂. Para cada ponto foi feito um controle negativo contendo somente ATP e GA, sem LbHsp90. Com o tratamento dos dados considerando a atividade ATPásica relativa em função da concentração de GA, foi feito um ajuste dose-resposta para obter o valor de IC₅₀, que reflete a concentração de GA que inibe 50% da atividade ATPásica da LbHsp90.

Com a finalidade de verificar se a Lbp23A e a Lbp23B inibiam a atividade ATPásica da LbHsp90, foi realizado um ensaio de inibição, utilizando uma concentração fixa de LbHsp90 (1 μM considerando-a como monômero) e concentrações crescentes de p23 (0 a 50 μM). As proteínas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 1 mM de ATP e 5 mM de MgCl₂. Para cada ponto foi feito um controle negativo sem LbHsp90, o qual foi subtraído no tratamento dos dados. Também foi feito um controle adicional com 50 μM de cada p23, na ausência de ATP para verificar se não havia contaminação com fosfato. Os dados foram tratados com um ajuste dose-resposta, obtendo-se os valores de IC₅₀ para as duas p23 em relação à LbHsp90.

2.1.3.4 Pull-down

Para verificar a interação *in vitro* entre as proteínas LbHsp90 e suas cochaperonas Lbp23A e Lbp23B, foram feitos ensaios de *pull-down*. Para isso, foi usada resina *Profinity IMAC Ni-Charged Resin* (BioRad) para as duas proteínas e também a resina *NiNTA Superflow* (Qiagen) para a Lbp23A. No experimento foi utilizada a LbHsp90 com a His-tag, que possui afinidade pelo níquel e, por isso, interage com as resinas. A His-tag das p23 foi clivada, gerando a Lbp23A_\Delta His e Lbp23B \(\Delta His, que na ausência de LbHsp90 n\(n\) ao interage com as resinas. A prote\(n\) a LbHsp90 (10 µM) foi previamente incubada 5 minutos à temperatura ambiente com 1 mM de ATP e posteriormente com as Lbp23 (10, 20 e 30 μM) por 1 hora a 30 °C e 350 rpm. Após a lavagem das resinas com tampão A (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM e imidazol 20 mM) a mesma foi incubada com as proteínas por 1 hora a 4 °C sob agitação. Com isso, as proteínas Lbp23A_∆His e Lbp23B_∆His apenas iriam interagir com a resina se estivessem interagindo com a LbHsp90. A eluição das proteínas foi feita com lavagens do tampão B, cuja composição é a mesma do tampão A, exceto a concentração de imidazol que foi de 500 mM. A análise do resultado foi por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), após precipitação com acetona das proteínas eluídas, facilitando a visualização nesse sistema. Foram feitos controles com cada proteína separadamente. Um controle positivo foi feito contendo apenas LbHsp90 (10 μM) e um controle negativo contendo apenas p23 (30 μM) incubadas com as resinas e ATP. Outro controle foi feito mudando a ordem de incubação das proteínas, ou seja, incubando a LbHsp90 com a resina antes de incubar com as p23, na presença e ausência de 5 mM de MgCl₂.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Produção das proteínas recombinantes

A produção das proteínas recombinantes foi iniciada após a identificação das sequências de DNA que codificam as proteínas alvo e comparação dessas em relação às proteínas ortólogas bem caracterizadas.

2.2.1.1 Análise do número de genes de Hsp90 no genoma de L. braziliensis e comparação entre as estruturas primárias das Hsp90 ortólogas.

No genoma de *L. braziliensis* existem anotados 5 genes que correspondem a Hsp90. A LbHsp90 descrita nesse trabalho é também denominada Hsp83-1 (GENE ID: 5418737 LBRM_33_0340) sendo o respectivo gene localizado no cromossomo 33. Outros dois supostos genes identificados no genoma (GENE ID: 5418970 LBRM_33_2670 e GENE ID: 5417310 LBRM_29_0780) possuem 30% e 40% de identidade em relação à LbHsp90, respectivamente. Além disso, dois genes apresentaram 99% de identidade com a metade C-terminal da LbHsp90 (GENE ID:

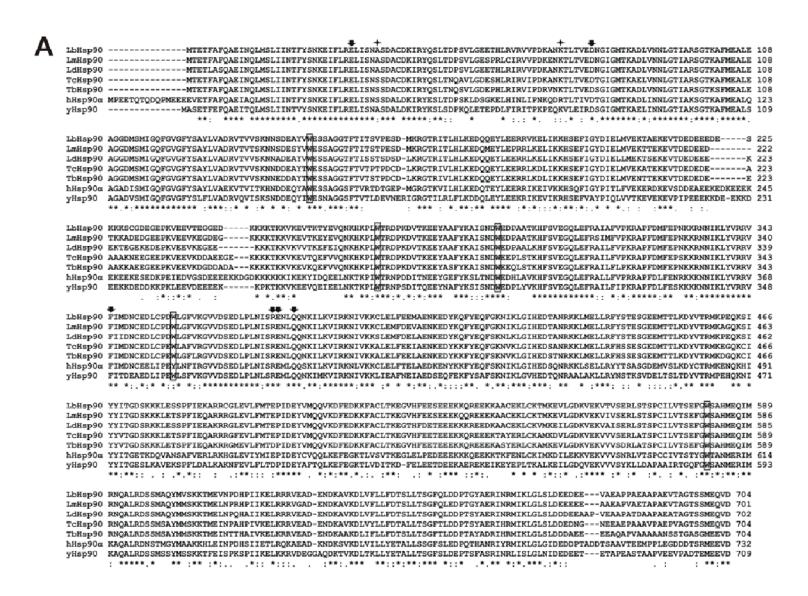
5418738 HSP83-1 e GENE ID: 5418736 HSP83-1). Essas sequências identificadas como supostos genes de Hsp90 sugerem ser produtos de eventos de duplicação gênica.

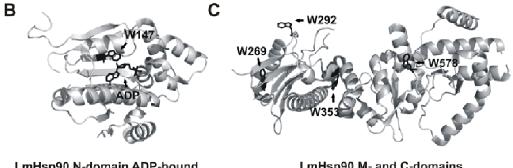
A estrutura primária da LbHsp90 foi comparada com as estruturas primárias das Hsp90 de L. major, L. donovani, T. cruzi, T. brucei, S. cerevisiae, e humana. O alinhamento das sequências de aminoácidos de cada proteína mostrou que a LbHsp90 possui alta identidade com as proteínas ortólogas acima, sendo 93% com Hsp90 de L. major e L. donovani, 85% para T. cruzi e T. brucei, e 63% em relação às Hsp90 de levedura (yHsp90) e humana (hHsp90α) (Fig. 2). Através do alinhamento foi possível identificar no domínio N-terminal da LbHsp90, resíduos de aminoácidos importantes: o resíduo de aminoácido D79 (em relação à yHsp90, D93 em hHsp90α) identificado como importante para a ligação de ATP, localizado na região interna do sítio de ligação de nucleotídeo e o resíduo E33 (em relação à yHsp90, E47 em hHsp90α) que é importante para a hidrólise de ATP e, portanto, fundamentais para a atividade da Hsp90 (OBERMANN et al., 1998). No domínio M, destaca-se a presença da R380 e Q384, importante no direcionamento do fosfato-y e posterior hidrólise do ATP (MEYER et al., 2003). O resíduo F349 parece estar envolvido na intercomunicação entre os domínios N e M (MEYER et al., 2003) e o W300 (yHsp90) estaria envolvido na interação da yHsp90 com proteínas-clientes (MEYER et al., 2003; HAWLE et al., 2006). A presença desses resíduos conservados em todas as sequências analisadas sugere que a LbHsp90 apresenta mecanismos envolvidos na atividade ATPásica semelhantes às ortólogas (Fig. 2, setas).

Comparando-se a região do sítio de ligação de nucleotídeo/GA no domínio N-terminal das Hsp90, é possível observar que essa região na LbHsp90 e nas Hsp90 das outras espécies de *Leishmania* analisadas é muito semelhante à hHsp90α citoplasmática, com exceção dos aminoácidos Ala37-Ser52 e Lys72-Arg87 (Figura 2 A, indicado com estrelas). Porém, apesar da alta similaridade, inibidores interagem de maneira distinta entre as isoformas da Hsp90, sugerindo que existem particularidades estruturais importantes relacionadas ao mecanismo de ação de cada uma delas (POWERS; WORKMAN, 2007; KRUKENBERG et al., 2011; LI; SOROKA; BUCHNER, 2012; WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008).

A posição dos triptofanos é conservada entre os organismos evolutivamente diferentes (Fig. 2, dentro de retângulos), exceto por uma tirosina na posição 381 da hHsp90 ao invés de triptofano. A figura 2B e 2C mostra a localização dos triptofanos na estrutura cristalográfica dos domínios N, e M-C da LmHsp90 (PDB ID: 3U67 e PDB ID: 3HJC, respectivamente), onde é possível obervar o ambiente em que se encontram os triptofanos nas posições 147, 269, 292, 353 e 578. Os triptofanos parecem estar parcialmente expostos ao solvente, exceto o W147 que se encontra protegido do solvente e próximo ao sítio de ligação de nucleotídeo no domínio Nterminal.

Figura 2 — Alinhamento entre as estruturas primárias da LbHsp90 e as Hsp90 ortólogas. A) As sequências de aminoácidos das proteínas LbHsp90, LmHsp90, LdHsp90, TcHsp90, TbHsp90, hHsp90α and yHsp90 foram alinhadas, revelando 93% de identidade entre LbHs90 e ambas LmHsp90 e LdHsp90, 85% com TcHsp90 e TbHsp90 e 63% com yHsp90 e hHsp90. Os aminoácidos destacados com as setas são conservados e importantes para a ligação (D79) e hidrólise de ATP (E33), localização em relação a yHsp90, assim como os resíduos de aminoácidos R380, Q384 e F349, relacionados à atividade ATPásica da Hsp90. As estrelas indicam as diferenças na região do sítio de ligação de nucleotídeo, Ala37-Ser52 e Lys72-Arg87, entre as Hsp90 de *Leishmania* e a hHsp90. Os retângulos destacam as posições dos triptofanos conservadas entre os diferentes organismos. Os resíduos de aminoácidos idênticos entre as três sequências são indicados por (*), similares (:) e diferentes (.). B) Estruturas cristalográficas do domínio N-terminal da LmHsp90 ligado ao ADP (PDB ID: 3U67) e os domínios M e C da LmHsp90 (PDB ID: 3HJC) mostrando a localização dos resíduos de triptofanos e o ADP.





LmHsp90 N-domain ADP-bound

LmHsp90 M- and C-domains

O alinhamento entre as estruturas primárias da Lbp23A e Lbp23B mostrou identidade de 27% e 36% respectivamente, em relação à p23 humana. Entre as p23 de L. braziliensis, a identidade é de 30% (Fig. 3). A posição dos triptofanos é conservada entre as três proteínas. Também é possível identificar a sequência WPRLTKE, descrita como uma sequência característica de p23, que é parte de uma superfície acessível ao solvente de uma cavidade onde poderia se ligar outra proteína (WEAVER et al., 2000). Porém, a Lbp23A possui alguns resíduos de aminoácidos diferentes do consenso que poderia contribuir para diferentes atividades entre ela e a Lbp23B. Uma outra p23 de parasita, P. falciparum, também apresenta resíduos diferentes nessa região (CHUA et al., 2010).

Figura 3 - Alinhamento entre as estruturas primárias da Lbp23A, Lbp23B e p23 humana. Os resíduos de triptofanos estão destacados em amarelo e ocupam posições conservadas. Em vermelho destaca-se a sequência WPRLTKE característica de p23.

```
Lbp23A
       ----MSHLPIKWAERKDRVFITVEAMTASDVHVTFQEKTVSISGYGVTAKGSEPHTLKGELHLLKEIVPEDS
Lbp23B
       MSASGSLVPPISWAQRPEYVLVTIPLQDTTGVTVEIKDEGRELLFACCAPEGKQ---YACTIHFYGAISSEES
Hs-p23
       ----MQPASAKWYDRRDYVFIEFCVEDSKDVNVNFEKSKLTFS----CLGGSDNFKHLNEIDLFHCIDPNDS
                . .* :* : *:: .
                                  :..* * ::..
Lbp23A TFKVLGVSIQICAMK------KDQG-YWNRLVEEPTKLTKSWLSADWNLWKDEDDEAEEDAAASNFGGYGD
Lbp23B QHVVRPRQIELKLRKKLTRSLEDADDEVEWPRLTKEKVKYPN--ITIDWSKWKDEDDEGATDDLGDFGLGGGD
Hs-p23 KHKRTDRSILCCLRK-----GESGQSWPRLTKERAKLN--WLSVDFNNWKDWEDDSDEDMSNFDR-----
                                   * **.:* .*
Lbp23A MGGMDMGSMMGGMGGMDMESMMASMGKGAGGDSDDEEMADSEGEEOADDECEKSEEPAADISDLNA
Lbp23B
       AMDGQYSEMLSQLMQTQGKKDAEELAGLPPGTIPEFGSAQRQEATHGASAAAGDDDSEMPPLEDDM---
Hs-p23 ----FSEMMNNMGGDEDVDLPEVDGADDD--SQDSDDEKMPDLE-----
             ..*:. :
                                        : .. : :
```

2.2.1.2 Construção dos oligonucleotídeos específicos

As sequências de aminoácidos das proteínas alvo foram identificadas no banco de dados *GenBank* possuindo maior identidade em relação às proteínas ortólogas humanas. A partir das sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas foi possível desenhar oligonucleotídeos específicos para iniciar a clonagem das mesmas. Nas sequências dos oligonucleotídeos foram inseridos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição para possibilitar a clonagem direcional no vetor de expressão pET28a. Abaixo segue uma tabela com os oligonucleotídeos desenhados para cada sequência alvo, onde os sítios de restrição estão destacados em negrito (Tabela 2).

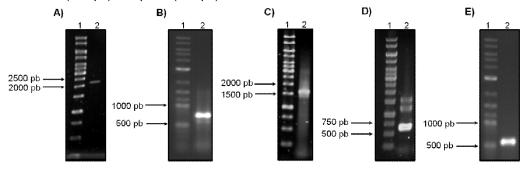
Tabela 2 - Oligonucleotídeos desenhados para amplificar os DNAs que codificam as proteínas LbHsp90, LbHsp90_N, LbHsp90_NM, Lbp23A e Lbp23B. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição estão destacados em negrito.

Nome	Tamanho (pb)	Enzima de restrição	Sequência 5'-3'
I bl lon00	2245	Nde I	AAT CATATG ACGGAGACGTTCGCG
LbHsp90	2215	Eco RI	GGCG GAATTC AGTCCACCTGCTCCATG
IbHan00 N	666	Nde I	AAT CATATG ACGGAGACGTTCGCG
LbHsp90_N	666	Bam HI	TCTTCGGC GGATCC TACTCCTCGTCC
LbHsp90_NM		Nde I	AAT CATATG ACGGAGACGTTCGCG
	1567	Sac I	AAGT GAGCTC ATTCCTTCGTCAGGCAC
	000	Nde I	ATA CATATG TCTCACCTTCCGATC
Lbp23A	606	Hind III	ATA AAGCTT ATGCGTTGAGGTCG
		Nde I	ATA CATATG TCGGCCAGCGGTTCA
Lbp23B	624	Eco RI	ATA GAATTC ACATATCGTCCTCGAGCG

2.2.1.3 Amplificação dos DNAs alvo

A amplificação do DNA de interesse foi realizada por PCR e o resultado analisado por eletroforese de DNA e visualização em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Foram amplificados fragmentos de DNA de tamanhos esperados para todos os DNAs alvo (Fig. 4).

Figura 4 - Amplificação dos DNAs alvo por PCR. As canaletas de número 1 correspondem aos marcadores de massa molecular e o número 2 corresponde ao DNA amplificado de A a E: LbHsp90 (2215 pb), LbHsp90_N (666 pb), LbHsp90_NM (1567 pb), Lbp23A (606 pb) e Lbp23B (624 pb).



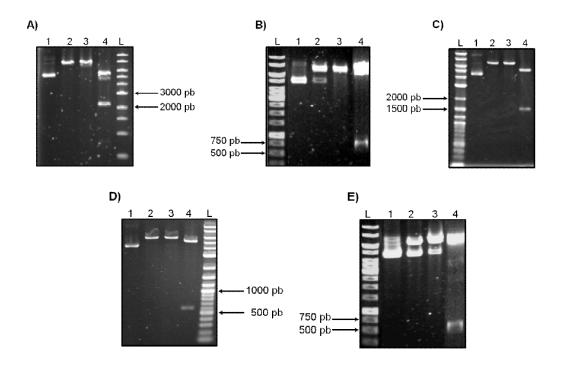
2.2.1.4 Clonagem dos DNAs alvo em vetor de propagação

Os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose e ligados aos vetores de propagação conforme descrito no item 2.1 de Material e Métodos. Com isso foram obtidos os plasmídeos recombinantes pTZ::LbHsp90, pTZ::LbHsp90_NM, pCR-BLUNT::Lbp23A pGEMT::LbHsp90 N, pGEMT::Lbp23B, os quais foram verificados por análise de restrição com as enzimas específicas para cada caso e confirmados por sequenciamento automático de DNA (dados não mostrados). O sequenciamento dos clones recombinantes confirmou a clonagem correta dos DNAs alvo, compatível às sequências depositadas no banco de dados: LbHsp90 (gi|154343720 - GENE ID: 5418737 LbrM33_V2.0340), LbHsp90_NM refere-se aos domínios N e M da LbHsp90 (gi|154343720 - GENE ID: 5418737 LbrM33_V2.0340), Lbp23A (gi|154345207|ref|XP_001568545.1), Lbp23B (gi|154336147|ref|XP_001564309.1). Todas sequências não essas apresentaram nenhuma mutação. Apenas o sequenciamento do DNA (pGEMT::LbHsp90_N) revelou a clonagem de DNA referente ao domínio N com uma mutação que corresponde à troca de uma serina na posição 163 por uma prolina (GenBank: FR799008.1) sugerindo ser referente a uma isoforma da LbHsp90 obtida acima (qi|154343720), e, portanto, justificou a continuidade do trabalho com essa proteína. Ademais, uma análise feita através de modelagem mostrou que o aminoácido 163 da LbHsp90 N está localizado em um volta que une duas fitas β na superfície da proteína sugerindo que ela não deve modificar as propriedades de interação com ligantes.

2.2.1.5 Subclonagem em vetor de expressão

Após a confirmação dos clones recombinantes no vetor de propagação, os DNAs foram retirados dos plasmídeos e ligados no vetor de expressão pET28a para a obtenção dos clones recombinantes pET28::LbHsp90, pET28::LbHsp90_N, pET28::LbHsp90_NM, pET28::Lbp23A e pET28::Lbp23B. A confirmação dos recombinantes também foi feita por análise de restrição e sequenciamento de DNA. A figura 5 mostra as análises de restrição de cada clone recombinante, onde é possível visualizar a liberação de um fragmento de DNA correspondente aos DNAs alvo (Fig. 5).

Figura 5 – Análise de restrição dos plasmídeos de expressão recombinantes. L: marcador de massa molecular; 1: DNA plasmidial sem a adição de enzima de restrição; 2: DNA plasmidial na presença da enzima de restrição cujo sítio de reconhecimento foi inserido no oligonucleotídeo forward; 3: DNA plasmidial na presença da enzima com sítio no sentido reverse; 4: DNA plasmidial na presença de cada par de enzima de restrição. De A a E, na canaleta 4 é possível visualizar a liberação de bandas de tamanho esperado para os fragmentos de DNA-alvo: LbHsp90 (2215 pb), LbHsp90_N (666 pb), LbHsp90_NM (1567 pb), Lbp23A (606 pb) e Lbp23B (624 pb).

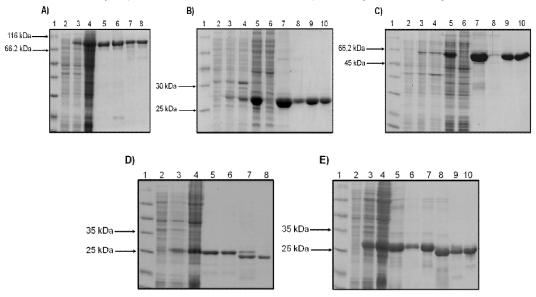


2.2.1.6 Obtenção das proteínas recombinantes em E. coli solúveis e puras

A partir dos clones recombinantes obtidos no vetor de expressão pET28a, as proteínas foram expressas em *E. coli* com indução via IPTG, como

foi descrito no item 2.1 de Material e Métodos. As proteínas foram expressas na forma solúvel e purificadas com alto grau de pureza após duas etapas de cromatografias, sendo uma cromatografia de afinidade ao níquel seguida por cromatografia de exclusão molecular, como foi descrito no item 2.1.11 da Material e Métodos. A segunda etapa de purificação foi realizada para separar uma parte das proteínas que encontravam-se sob a forma de agregados. A His-tag proveniente do vetor de expressão foi clivada com trombina no caso da Lbp23A e Lbp23B, entre as duas etapas de purificação. A verificação das etapas de expressão e purificação foi feita por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), como mostra a figura a seguir (Fig. 6).

Figura 6 - Expressão e purificação das proteínas alvo. A) LbHsp90 (82 kDa). 1: marcador de massa molecular (MM); 2: fração não induzida (NI); 3: fração após indução por 4 horas (IND); 4: fração solúvel (S); 5-6: frações coletadas na cromatografia de afinidade ao níquel (AN); 7-8: frações coletadas na cromatografia de exclusão molecular (CEM). B) LbHsp90_N (26kDa). 1: MM; 2: NI; 3: IND; 4: fração insolúvel (INS); 5: S; 6: flow-through (FT); 7-8 (AN); 9-10 (CEM). C) LbHsp90_NM (62 kDa), mesma ordem da figura 6B. D) Lbp23A (24 kDa). 1: MM; 2: NI; 3: IND; 4: S; 5-6: AN; 7: fração purificada por afinidade e submetida à clivagem com trombina para retirada da His-tag; 8: CEM. E) Lbp23B (25 kDa). 1: MM; 2: NI; 3: IND; 4: S; 5-6: AN; 7-8: fração purificada por afinidade antes e após clivagem da His-tag; 9-10: CEM.



A tabela abaixo sumariza as etapas de amplificação, expressão e purificação das proteínas recombinantes e algumas das suas propriedades físico-químicas (Tabela 3).

Tabela 3 – Sumário das etapas de clonagem e expressão das proteínas e suas propriedades físico-químicas.

Etapa/propriedade	LbHsp90	LbHsp90_NM	LbHsp90_N	Lbp23A	Lbp23B
Tamanho do produto de PCR (pb)	2215	1567	666	606	624
Enzimas de restrição nos primers	Nde I, Eco RI	Nde I, Sac I	Nde I, Bam HI	Nde I, Hind III	Nde I, Eco RI
Vetor de propagação	pTZ57R/T	pTZ57R/T	pGEMT	pCR-Blunt	pGEMT
Vetor de expressão	pET28a	pET28a	pET28a	pET28a	pET28a
Sequenciamento do DNA correto?	sim	sim	isoforma S163P	sim	sim
Cepa de expressão	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)pLysS
Temperatura de indução (°C)	30	30	30	37	30
[IPTG] utilizada	0,4 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,4 mM
Tempo de indução	4 horas	4 horas	4 horas	4 horas	4 horas
Solubilidade	solúvel	solúvel	solúvel	solúvel	solúvel
His-tag mantido?	sim	sim	sim/não	não	não
MM com a His-Tag (kDa)	82,8	62,4	27	26	27
MM sem a His-Tag (kDa)	80,8	60,4	25	24	25
ε em 280 nm (L/mol.cm) teórico	57300	48820	15930	31970	25575
Número de triptofanos	5	4	1	5	4
Ponto Isoelétrico teórico	5,27	5,62	4,75	4,58	4,70
Vbar (mL/g)	0,7356	0,7344	0,7324	0,7190	0,7249
Rs para uma esfera de mesma MM (Å)	36	26	19	18	19

2.2.2 Caracterização Biofísica

2.2.2.1 Estudo da estrutura secundária das proteínas alvo

Dentro das aplicações da técnica de CD para o estudo de proteínas pode-se destacar o estudo da conformação da estrutura secundária, podendo-se analisar se uma determinada proteína encontra-se enovelada e, uma vez obtendo os espectros, é possível estimar a quantidade existente de cada tipo de estrutura secundária. Para as proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM, os espectros de CD mostraram que as proteínas foram produzidas enoveladas, sendo constituídas tanto por hélices alfa quanto por folhas-beta (Fig. 7 A), o que também pode ser visto para outras Hsp90, como de levedura (ALI et al., 2006) e Hsp90 humana (STEBBINS et al., 1997). Os espectros de CD das proteínas Lbp23A e Lbp23B indicam que as proteínas são constituídas principalmente por folhas-β com a presença de um mínimo em torno de 218 nm e também sugerem que exista uma região não estruturada devido à elipticidade molar residual negativa em torno de 200 nm, resultados semelhantes aos descritos para a p23 humana, assim como foi relatado que a região não estruturada corresponde ao C-terminal (WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006). É possível visualizar uma banda positiva em 230 nm que está relacionada a conjunto de aminoácidos aromáticos (KHAN; VILLANUEVAG; NEWMAN, 1989), característica da p23 humana (WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006). Apesar da baixa identidade sequencial entre elas (30%), os espectros de CD possuem as mesmas características, porém não são idênticos (Fig. 7 B).

As predições das estruturas secundárias das proteínas são apresentadas na tabela 4.

Figura 7 - Espectros de CD das proteínas recombinantes. A) LbHsp90, LbHsp90_N_ΔHis e LbHsp90_NM. As concentrações de proteínas usadas nos ensaios foram 550 µg/mL, 250 µg/mL e 300 µg/mL, respectivamente. Os dados foram coletados em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) com 100 mM de NaCl para o domínio N-terminal e HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 100 mM para as demais. B) Lbp23A_ΔHis e Lbp23B_ΔHis. Foi utilizado 600 µg/mL de cada proteína em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM e β-mercaptoetanol 5 mM.

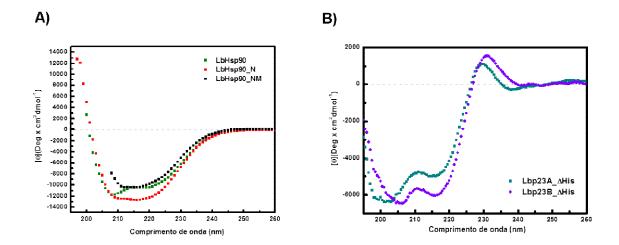


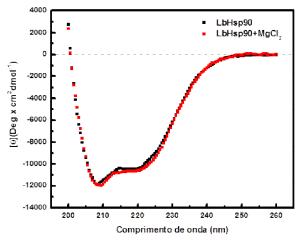
Tabela 4 - Estimativa das estruturas secundárias das proteínas recombinantes feita pelo programa CDNN Deconvolution.

Tipo de	LbHsp90	LbHsp90_	LbHsp90_N	Lbp23A	Lbp23B
estrutura		N_∆His	M	_∆His	_∆His
α-hélice	35%	34%	26%	10%	9%
Folha β-	8%	11%	16%	30%	30%
antiparalela					
Folha β-	8%	6%	6%	5%	5%
paralela					
Volta-β	20%	17%	18%	21%	22%
Randômica	30%	31%	33%	35%	36%
Soma total	101%	99%	98%	101%	102%

Erro estimado <5%

O efeito da adição do íon Mg²⁺ na estrutura secundária da LbHsp90 foi analisado também através de CD. A figura abaixo mostra os espectros de CD na presença/ausência de MgCl₂, onde pode-se observar que não houve alteração significativa na estrutura secundária da LbHsp90 (Fig. 8).

Figura 8 - Espectro de CD da proteína LbHsp90 na ausência e presença de MgCl₂. A concentração da proteína utilizada foi 550 μg/mL em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 100 mM, na ausência e presença de 5 mM de MgCl₂.



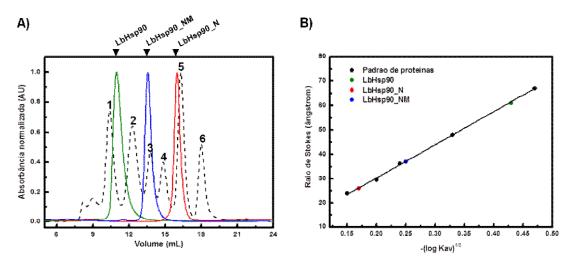
2.2.2.2 Análise dos perfis de eluição das proteínas alvo em solução e respectivos estados oligoméricos

As proteínas em estudo foram submetidas à técnica de cromatografia de exclusão molecular analítica, a qual tem por objetivo a análise de macromoléculas em solução. Analisando o cromatograma, visualmente é possível estimar a MM da proteína, dependendo do volume de eluição da mesma. Os cromatogramas comparativos entre o padrão de proteínas utilizado e as proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM são mostrados a seguir (Figura 9 A) e os cálculos dos Rs foram feitos após o tratamento dos dados, como mostra a figura 9 B. Os valores das MM_{app} e Rs estão nas tabelas 5 e 6.

A proteína LbHsp90 eluiu entre os volumes de eluição das proteínas 1 (apoferritina - 480 kDa) e 2 (γ-globulina – 160 kDa). Considerando o valor da MM esperada da LbHsp90 como monômero de 82 kDa, o perfil de eluição observado é condizente com a afirmação de que a LbHsp90 está sob a forma de um oligômero, provavelmente um dímero assimétrico. Já o domínio N-terminal eluiu entre as proteínas 4 (ovoalbumina - 45 kDa) e 5 (anidrase carbônica - 30 kDa). Considerando o tamanho esperado de 26 kDa, a proteína eluiu com tamanho maior (mas não suficiente para ser um dímero), sugerindo que ela se comporta como um monômero que apresenta assimetria. A eluição do domínio NM foi próximo ao volume da

proteína 3 (BSA - 67 kDa), sugerindo que essa proteína, assim como a LbHsp90_N, se comporta como um monômero (MM esperada de 62 kDa) com assimetria.

Figura 9 - Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas recombinantes LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM (A). O padrão de proteínas usado continha as proteínas 1: apoferritina (480 kDa), 2: γ-globulina (160 kDa), 3: albumina de soro bovino (BSA – 67 kDa), 4: ovoalbumina (45 kDa), 5: anidrase carbônica (30 kDa) e 6: citocromo c (12,3 kDa), numeradas de 1 a 6, respectivamente. A cromatografia foi feita com a coluna *Superdex 200 GL 10/300* (GE Healthcare) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Purifier* (GE Healthcare). B) Cálculo do Raio de Stokes (Rs). Os cálculos foram feitos a partir dos dados obtidos na cromatografia de exclusão molecular analítica em relação aos volumes de eluição das proteínas-padrão e das proteínas em estudo, seguindo a descrição no item 2.1.2.2 de Material e Métodos.



As sugestões dos estados oligoméricos podem ser confirmadas por meio dos valores das MM_{app} obtidas após o tratamento dos dados, os quais foram maiores que os valores esperados e, portanto, está de acordo com o fato das proteínas estudadas possuírem assimetria, fazendo com que o volume de eluição seja maior do que seria para uma proteína globular (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos valores das massas moleculares esperadas e aparentes das proteínas LbHsp90, LbHsp90 N e LbHsp90 NM.

	MM _{esperada} (kDa)	MM _{aparente} (kDa)
LbHsp90	164 (dímero)	320 ± 20
LbHsp90_N	26	37 ± 4
LbHsp90_NM	62	92 ± 8

Para verificar o grau de assimetria das proteínas acima, foram calculados os (Rs) para cada uma. Esses valores foram utilizados para calcular a razão friccional (f/f_0) , sendo que valores maiores do que 1 indicam assimetria. Os valores obtidos para LbHsp90 (como dímero), LbHsp90_N e LbHsp90_NM foram 1,63, 1,34 e 1,38,

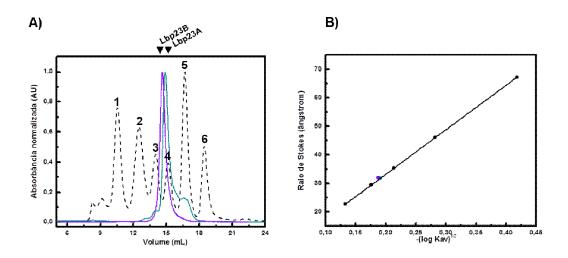
respectivamente, novamente indicando que as proteínas são assimétricas (Tabela 6).

Tabela 6 - Razão friccional das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM.

	Rs (teórico) (Å)	Rs (experimental) (Å)	f/f_0
LbHsp90	36	59 ± 2	1,63 ± 0,06
LbHsp90_N	19	26 ± 2	$1,34 \pm 0,13$
LbHsp90_NM	26	36 ± 2	$1,38 \pm 0,08$

Os perfis de eluição das proteínas Lbp23A_ΔHis (23 kDa) e Lbp23B_ΔHis (24 kDa) foram muito próximos e entre as proteínas 3 (BSA - 67 kDa) e 4 (ovoalbumina - 45 kDa) do padrão o que indica que as proteínas não são globulares já que eluíram como proteínas de maior massa molecular (Fig. 10).

Figura 10 - Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas recombinantes Lbp23A_ΔHis e Lbp23B_ΔHis (A). O padrão de proteínas usado continha as proteínas 1: apoferritina (480 kDa), 2: γ-globulina (160 kDa), 3: albumina de soro bovino (BSA – 67 kDa), 4: ovoalbumina (45 kDa), 5: anidrase carbônica (30 kDa) e 6: citocromo c (12,3 kDa), numeradas de 1 a 6, respectivamente. A cromatografia foi feita com a coluna *Superdex 200 GL 10/300* (GE Healthcare) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Purifier* (GE Healthcare). B) Cálculo do Raio de Stokes (Rs). Os cálculos foram feitos a partir dos dados obtidos na cromatografia de exclusão molecular analítica em relação aos volumes de eluição das proteínas-padrão e das proteínas em estudo, seguindo a descrição no item 2.1.2.2.



Os valores de MM_{app} e Rs calculados a partir do tratamento dos dados são mostrados a seguir (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 - Comparação dos valores das massas moleculares esperadas e aparentes das proteínas Lbp23A_∆His e Lbp23B_∆His.

	MM _{esperada} (kDa)	MM _{aparente} (kDa)
Lbp23A_∆His	23	60 ± 6
Lbp23B_∆His	24	64 ± 7

Tabela 8 - Razão friccional das proteínas Lbp23A_ΔHis e Lbp23B_ΔHis.

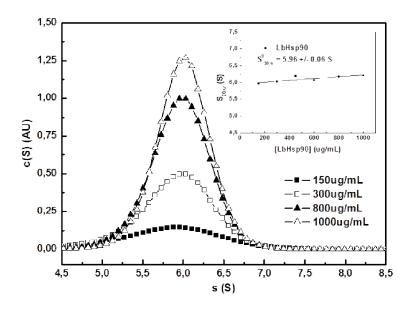
	Rs (teórico) (Å)	Rs (experimental) (Å)	f/f_0
Lbp23A_∆His	18	32 ± 2	1,7± 0,2
Lbp23B_∆His	19	32 ± 2	$1,7 \pm 0,1$

Ambas Lbp23A e Lbp23B apresentaram MM_{app} maior que a esperada, assim como também os valores de Rs, sugerindo que essas proteínas são muito assimétricas. Isso vai de acordo aos valores obtidos das razões friccionais de 1,72 \pm 0,2 para Lbp23A e 1,7 \pm 0,1 Lbp23B, indicando alto grau de assimetria.

2.2.2.3 A proteína LbHsp90 é um dímero assimétrico em solução

Para confirmar o estado oligomérico da LbHsp90, foi utilizada a ultracentrifugação analítica. Os experimentos de velocidade de sedimentação mostraram que, em uma faixa de concentração de 150 a 1000 μg/mL de proteína, pode ser observada apenas uma espécie com massa molecular de 162 \pm 3 kDa e razão friccional de 1,72 \pm 0,06. Este resultado confirma os dados obtidos por cromatografia de exclusão molecular analítica de que a LbHsp90 é um dímero assimétrico em solução (Fig. 11). O valor de $\rm s^0_{20,w}$ obtido foi de 5,96 \pm 0,06 S, mostrado no detalhe da figura 11. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, β-mercaptoetanol 1mM.

Figura 11 - Ultracentrifugação analítica da LbHsp90. O comportamento da proteína em solução (150 a 1000 μg/mL) foi analisado através de experimentos de velocidade de sedimentação. Foi observada a presença de apenas uma espécie que condiz com o dímero assimétrico da LbHsp90. A determinação do valor de s⁰_{20,w} foi feita por análise da regressão linear dos valores de s_{20,w}, como mostrado à direita na figura.

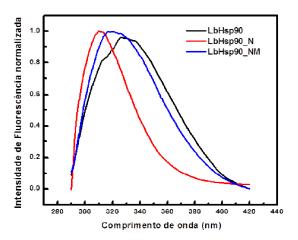


2.2.2.4 A LbHsp90 e seus domínios ligam nucleotídeos e geldanamicina

As proteínas são capazes de emitir fluorescência intrínseca devido à presença de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) que, por sua vez, são capazes de absorver energia na região do ultravioleta próximo (250-300 nm). Dentre os aminoácidos aromáticos, o triptofano é usado como sonda para avaliar a estrutura terciária local, relacionando-a com possíveis mudanças conformacionais quando uma proteína interage com um ligante, por exemplo.

A proteína LbHsp90 possui 5 triptofanos, sendo 1 no domínio N-terminal (que é evolutivamente conservado – dados não mostrados), 3 no domínio intermediário e 1 no C-terminal. O único triptofano que está presente no domínio N-terminal (W147) encontra-se protegido do solvente, como pode ser visto na figura 12, que mostra os espectros das três proteínas e o comprimento de onda máximo de emissão (λ_{max}) de 311 nm para a LbHsp90_N. Já a LbHsp90_NM apresenta λ_{max} de 319 nm. Em relação à proteína completa, há a contribuição de todos os triptofanos na emissão da fluorescência e o espectro obtido apresenta um valor de λ_{max} maior, deslocado em direção ao vermelho (Fig. 12). Os espectros obtidos mostraram que as proteínas possuem estrutura terciária local.

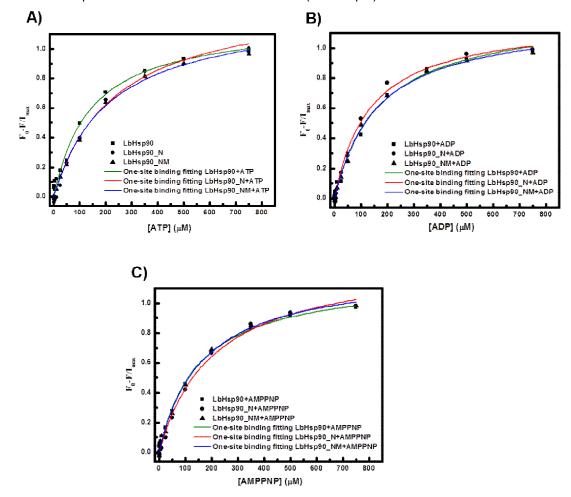
Figura 12 - Espectros de emissão de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM. Os espectros foram obtidos com o λ excitação de 280 nm e a varredura de 290 a 420 nm. Nesses ensaios foram usados 2,5 μM de cada proteína em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) com 100 mM KCl.



A proteína LbHsp90 possui atividade ATPásica e, portanto, liga ATP (PANARETOU et al., 1998; OBERMANN et al., 1998). Sendo assim, foi possível analisar a interação dessa proteína e dos seus domínios (N e NM) em relação à ligação de nucleotídeos, a fim de se determinar as K_D entre eles.

Os ensaios de fluorescência foram realizados com os nucleotídeos ATP, ADP, AMPPNP, com/sem adição de MgCl₂, o qual é importante para a atividade da proteína. A interação com os nucleotídeos levou à supressão da fluorescência com o aumento da concentração do nucleotídeo. A partir dos dados coletados e tratados para cada proteína, foram obtidos os valores das K_D, que ficaram em torno de 150 µM para todas as condições testadas, exceto para o domínio N-terminal na presença de ADP+MgCl₂, que apresentou um valor de K_D menor. Para representar as curvas obtidas após o tratamento dos dados são mostradas as figuras a seguir (Figura 13 A, B e C).

Figura 13 - Ensaios de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM para determinação das constantes de dissociação entre as proteínas e os ligantes. A) Interação das proteínas com ATP. B) Interação das proteínas com ADP. C) Interação das proteínas com AMPPNP. Nesses ensaios foram usados 2,5 μM de cada proteína e os espectros de fluorescência foram coletados após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente com os nucleotídeos (0 a 750 μM).



Os valores de K_D obtidos para todas as condições experimentais são mostrados na tabela abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação dos valores de K_D entre as proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM e os nucleotídeos ATP, ADP e AMPPNP, com ou sem MgCl₂.

Liganto	Κ _D (μΜ)			
Ligante	LbHsp90	LbHsp90_N	LbHsp90_NM	
ATP	120 ± 20	240 ± 30	200 ± 30	
ATP+MgCl ₂	140 ± 30	180 ± 20	180 ± 20	
ADP	160 ± 10	130 ± 10	160 ± 20	
ADP+MgCl ₂	130 ± 10	90 ± 10	120 ± 10	
AMPPNP	150 ± 10	180 ± 30	160 ± 20	
AMPPNP+MgCl ₂	160 ± 10	200 ± 40	180 ± 20	

A proteína LbHsp90 apresentou uma afinidade cerca de duas vezes maior para ATP do que a descrita para Hsp90 humana (K_D para HsHsp90 = 240 ± 14 μ M, obtida por calorimetria de titulação isotérmica - ITC) (MCLAUGHLIN et al., 2004) Quando comparada com a Hsp90 de P. falciparum, pode-se dizer que os valores de K_D são semelhantes, considerando a faixa de erro (K_D = 168 ± 25 μ M, obtida por fluorescência) (PALLAVI et al., 2010). Porém, nesse trabalho, não está claro se foi feita a correção do efeito de filtro interno que se mostrou importante para os ajustes realizados aqui. O K_D obtido por ITC entre o domínio N-terminal da Hsp90 da levedura (S. cerevisiae) e ATP de 132 ± 47 µM (PRODROMOU et al., 1997) é um valor um pouco menor do que o obtido para LbHsp90. Comparando-se a afinidade entre o domínio N-terminal de S. cerevisiae e ADP e AMP-PNP, foi demonstrado por ITC um valor cerca de 4 vezes maior para o ADP a 25 °C ($K_D = 21.5 \mu M$ e 129.9 μM , para ADP e AMPPNP, respectivamente) (NILAPWAR et al., 2009). Para LbHsp90 N, os valores de K_D encontrados para o ADP e AMPPNP foram semelhantes, considerando a faixa de erro. Porém, quando comparado com o N-terminal de S. cerevisiae, a LbHsp90_N apresenta uma K_D cerca de 6 vezes maior para o ADP, consequentemente uma afinidade 6 vezes menor para o ADP em relação à proteína de levedura (K_D = 130 μ M e 21,5 μ M para LbHsp90_N e Hsp90 de *S. cerevisiae*, respectivamente) (NILAPWAR et al., 2009). A tabela abaixo resume as comparações descritas anteriormente (Tabela 10).

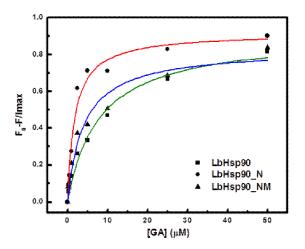
Tabela 10 - Comparação entre os valores das constantes de dissociação entre Hsp90 de diversos organismos e os nucleotídeos ATP, ADP e AMPPNP.

Drotoino		K _D (μM)		Referências
Proteína	ATP	ADP	AMPPNP	Referencias
LbHsp90	120±20	160±10	150±10	-
Hsp90 Homo	240±14	-	-	MCLAUGHLIN et al.,
sapiens				2004
Hsp90 <i>P.</i>	168±25	-	-	PALLAVI et al., 2010
falciparum				
LbHsp90_N	240±30	130±10	180±30	-
Hsp90_N	132±47	21,5	129,9	PRODROMOU et al.,
S. cerevisiae				1997, NILAPWAR et
				al., 2009
LbHsp90_NM	200±30	160±20	160±20	<u>-</u>

A interação das proteínas com o inibidor GA também levou à supressão da fluorescência e, assim como foi feito com os nucleotídeos, também foi calculada a

K_D para esse inibidor. As curvas obtidas após o tratamento dos dados são mostradas na figura a seguir (Fig. 14).

Figura 14 - Ensaios de fluorescência das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM com GA. Nesses ensaios foram usados 2 μM de cada proteína e os espectros de fluorescência foram coletados após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente com GA (0 a 50 μM), mantendo-se a concentração fixa de 1% de DMSO. O DMSO é utilizado para dissolver a GA e na concentração utilizada não interferiu na estrutura terciária local das proteínas.



Como pode ser observado na figura acima, a diferença entre as curvas sugere que as afinidades entre as proteínas em estudo e a geldanamicina são diferentes. Isso pode ser demonstrado com maior clareza quando comparamos os valores obtidos de K_D e K_A apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Comparação dos valores de K_D e K_A entre as proteínas LbHsp90_N LbHsp90_N e LbHsp90_NM e geldanamicina.

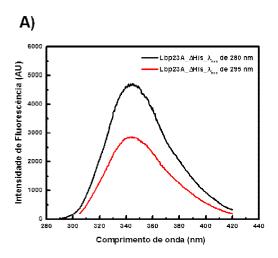
	K _D (μM)	K _A (M ⁻¹)x10 ⁻³
LbHsp90	$7,6 \pm 0,2$	130 ± 5
LbHsp90_NM	4 ± 0.9	250 ± 70
LbHsp90_N	1.8 ± 0.3	500 ± 100

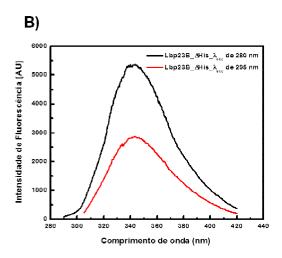
A GA liga-se ao domínio N-terminal da Hsp90, competindo com o ATP pela ligação no sítio de ligação. A LbHsp90 apresentou uma afinidade pela GA cerca de 15 vezes maior quando comparada ao valor encontrado para o ATP. Esse fato é relevante quando se trata da discussão do uso das Hsp90 como alvo no combate a doenças causadas por protozoários, já que é necessária uma inibição seletiva da proteína do agente causador, a fim de se evitar danos ao organismo hospedeiro. Outros trabalhos com Hsp90 de diversos organismos já citados anteriormente,

também relatam valores de K_D para GA menores que os encontrados para ATP, na ordem de baixo micromolar, sugerindo a possibilidade de usar a geldanamicina, assim como outros compostos, como inibidor efetivo da Hsp90, podendo levar à morte dos protozoários causadores de doenças como malária, leishmaniose, doença de chagas, entre outras (PALLAVI et al., 2010; ONUOHA et al., 2007; NILAPWAR et al., 2009; SHAHINAS et al., 2010; WIDER et al., 2009). É importante a discussão sobre a possibilidade do uso de inibidores seletivos para Hsp90 de parasitas, porém, existe a dificuldade em se comparar resultados obtidos ou por diferentes técnicas ou por diferentes condições experimentais, limitando as conclusões que podem ser estabelecidas nesses tipos de análises. Seria necessário um estudo amplo comparando os parâmetros da Hsp90 humana e de parasitas nas mesmas condições experimentais para que seja possível uma comparação de maior confiança no que diz respeito à possibilidade de desenvolvimento de fármacos.

Também foi usada a técnica de fluorescência para verificar a estrutura terciária das proteínas Lbp23A e Lbp23B que possuem 5 e 4 triptofanos, respectivamente, como destacado na figura 3. Para isso, foram coletados espectros tanto com λ_{exc} de 280 quanto 295 nm. Os resultados mostram que as proteínas possuem estrutura terciária local, mesmo após a retirada da His-tag e que não há influência de tirosinas nos espectros de emissão de fluorescência, como pode ser visto na figura a seguir (Fig. 15).

Figura 15 - Espectros de fluorescência das proteínas Lbp23A_ΔHis e Lbp23B_ΔHis nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm. Os experimentos foram feitos com 3 μM de cada proteína, em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM e β-mercaptoetanol 5 mM.



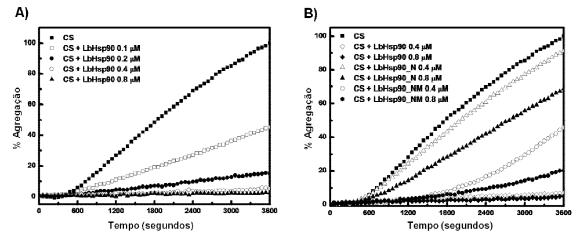


2.2.3 Caracterização Funcional

2.2.3.1 A proteína LbHsp90 possui alta atividade chaperona in vitro

Para verificar se a LbHsp90 possui atividade chaperona, foi utilizada a proteína modelo citrato sintase (CS) que é utilizada em outros trabalhos com o mesmo objetivo (JAKOB et al., 1995), investigando se a sua agregação induzida pela temperatura poderia ser prevenida pela LbHsp90. Além disso, também foram testadas as proteínas LbHsp90_N e LbHsp90_NM para verificar se os domínios da LbHsp90 possuem atividade chaperona. Os resultados mostraram que a LbHsp90 possui uma grande atividade chaperona, pois foi capaz de prevenir a agregação da CS mesmo em baixas concentrações (razão CS:LbHsp90 de 8:1) e a prevenção da agregação foi proporcional ao aumento da razão de LbHsp90 em relação à CS (Fig. 16 A). O fato dos experimentos terem sido feitos na ausência de ATP sugere que o mesmo não é essencial para a atividade chaperona da LbHsp90. Em relação aos domínios da LbHsp90, ambos foram capazes de prevenir agregação, assim como a Hsp90 humana descrita na literatura (YOUNG; SCHNEIDER; HARTL, 1997). Porém, a LbHsp90_N preveniu menos a agregação da CS em relação à LbHsp90_NM e essa ainda apresentou menor capacidade de prevenção que a proteína inteira (Fig. 16 B). Isso sugere que a proteína completa possui maior atividade pelo fato de possuir mais sítios para ligação de substrato, os quais diminuem com as construções que correspondem aos domínios.

Figura 16 - Atividade chaperona das proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM. A análise da prevenção da agregação da CS (0,8 µM) foi feita por espalhamento de luz a 320 nm durante 1 hora a 45 °C. A) Investigação da atividade chaperona da LbHsp90 em diferentes concentrações. Os resultados mostram que a LbHsp90 possui potente atividade chaperona, proporcional ao aumento da razão de LbHsp90:CS. B) Investigação da atividade chaperona da LbHsp90_N e LbHsp90_NM. As construções com os domínios N e NM da LbHsp90 também são capazes de prevenir a agregação da CS, embora em menor extensão que a proteína inteira.

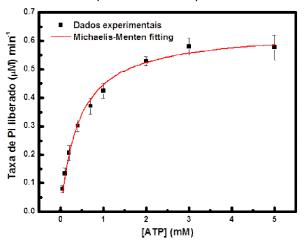


2.2.3.2 LbHsp90 possui baixa atividade ATPásica e a importância da proteína dimérica que haja essa atividade

A função das Hsp90 está relacionada ao ciclo ATPásico (ligação e hidrólise de ATP) que, por sua vez, envolve várias mudanças conformacionais (PRODROMOU et al., 1997; PANARETOU et al., 1998; OBERMANN et al., 1998; WEIKL et al., 2000; RICHTER, et al., 2001; WAYNE; BOLON, 2007).

A investigação da atividade ATPásica da LbHsp90 foi feita utilizando o kit *EnzChek*[®] *Phosphate Assay Kit* (Invitrogen) e após a padronização das condições experimentais foi possível obter os parâmetros cinéticos através do tratamento dos dados por meio de um ajuste de Michaelis-Menten (Fig. 17).

Figura 17 - Atividade ATPásica da LbHsp90. A LbHsp90 (2 μM) foi incubada com ATP (0 a 5 mM) durante 1 hora e 30 minutos e a seguir submetida à reação com o substrato do kit para determinação da taxa de fosfato liberado, proporcional à hidrólise de ATP. A partir do ajuste de Michaelis-Menten foi possível obter os parâmetros cinéticos.

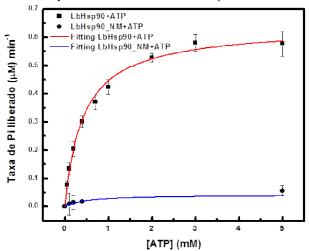


A partir da curva de Michaelis-Menten, foi obtido o valor de $V_{m\acute{a}x}=0.64\pm0.02$ μ M/min, $K_m=430\pm30~\mu$ M e $K_{cat}=0.320~min^{-1}$, o que sugere que a LbHsp90 tem baixa atividade ATPásica, assim como outras Hsp90 de diversos organismos (OWEN et al., 2002). A K_m da LbHsp90 é semelhante a K_m da isoforma β da Hsp90 humana (320 ± 70 μ M) (OWEN et al., 2002) e é menor que o valor numérico descrito para a Hsp90 de P. falciparum (611 μ M) (PALLAVI et al., 2010), o que poderia sugerir que a Hsp90 de L. braziliensis possui uma maior afinidade pelo ATP do que a Hsp90 de P. falciparum. Porém, não é possível obter conclusões já que os dados comparados não refletem as mesmas condições experimentais e métodos de mensuração.

Para tentar entender parte desse mecanismo de ligação e hidrólise de ATP pela Hsp90, a proteína LbHsp90_NM foi analisada em relação à atividade ATPásica. Os resultados desses experimentos mostraram que somente a construção NM da LbHsp90 não possui atividade ATPásica ou que não foi mensurada nos experimentos realizados aqui, embora possua o sítio de ligação ao ATP. Quando o ATP se liga ao sítio de ligação ao nucleotídedo e esse se fecha, provoca mudanças conformacionais na Hsp90, levando a uma troca de fitas-β presentes nos domínios N-terminais de cada monômero que se associam (HAHN, 2009). Recentemente foi demonstrada a dimerização do domínio N-terminal como mecanismo central para o ciclo de mudanças conformacionais relacionadas à atividade ATPásica (PULLEN; BOLON, 2011). A proteína LbHsp90_NM é um monômero e a ausência de atividade

ATPásica pode ser devido ao fato de a Hsp90 funcionar como um dímero, envolvendo diversas mudanças conformacionais que coordenam a hidrólise de ATP (RICHTER, et al., 2001; WAYNE; BOLON, 2007; PRODROMOU et al., 2000). Isso pode ser observado quando os dados são comparados com a proteína inteira (Fig. 18).

Figura 18 - Atividade ATPásica LbHsp90 comparada com a LbHsp90_NM. Apenas a presença do domínio de ligação ao nucleotídeo na proteína LbHsp90_NM não é suficiente para conferir atividade ATPásica à proteína, comparado à proteína inteira, sugerindo que a atividade ATPásica envolve a participação do dímero, como já descrito na literatura. As linhas mostram o ajuste de Michaelis-Menten a partir dos dados experimentais.



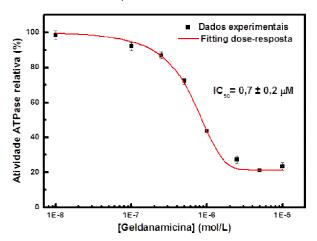
Diversos trabalhos relatam a diminuição da atividade ATPásica ou ausência da mesma quando se compara os domínios da Hsp90 com a proteína inteira (MCLAUGHLIN et al., 2004; RICHTER et al., 2001; PRODROMOU et al., 2000). Foi demonstrado uma redução de dez vezes da atividade ATPásica dos domínios NM da Hsp90 humana em relação à proteína completa (MCLAUGHLIN et al., 2004). Em levedura também foram descritos trabalhos com mutantes da Hsp90 em que a atividade ATPásica era reduzida proporcionalmente à medida que os construtos analisados se restringiam no sentido do domínio N-terminal (RICHTER et al., 2001; PRODROMOU et al., 2000). Além disso, estudos com uma Hsp90 de levedura construída de forma a ser monomérica, denominada de NMCC, mostraram uma atividade ATPásica de no máximo 3% em relação à proteína selvagem, indicando novamente que a dimerização é necessária para a eficiência na hidrólise do ATP (WAYNE; BOLON, 2007). Regiões localizadas no C-terminal da Hsp90 são importantes para manter o nucleotídeo ligado ao sítio de ligação e alguns resíduos

foram identificados como necessários para aumentar a taxa de hidrólise (WEIKL et al., 2000).

2.2.3.3 A geldanamicina e as co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B inibem a atividade ATPásica da LbHsp90

Considerando que o inibidor da Hsp90, geldanamicina, possui afinidade pela LbHsp90 como mostrado pelos experimentos de fluorescência, este foi usado para analisar se seria capaz de inibir a atividade ATPásica da mesma. Para isso foi utilizado o mesmo kit descrito para a determinação da atividade ATPásica e as condições experimentais foram novamente padronizadas. A análise dos resultados mostrou que a GA inibiu a atividade ATPásica da LbHsp90, porém foi observada uma atividade residual em torno de 20%. Foi possível determinar o valor de IC₅₀ (concentração de inibidor na qual a enzima possui 50% de atividade) igual a 0,7 ± 0,2 µM (Fig. 19).

Figura 19 - Inibição da atividade ATPásica da LbHsp90 por geldanamicina. A proteína LbHsp90 foi previamente incubada com GA (0 a 50 μM) por 30 minutos a temperatura ambiente e a seguir foi incubada com 3 mM de ATP por 3 horas a 37 °C antes de ser submetido à reação com o substrato do kit para determinar a taxa de P_i liberado.

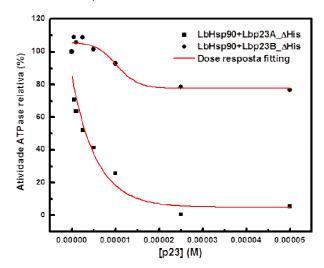


O valor de IC₅₀ obtido para LbHsp90 foi menor ao valor obtido para a Hsp90 de levedura (5 μM) em um ensaio de acoplamento enzimático e verde de malaquita (ROWLANDS et al., 2004), semelhante ao descrito para Hsp90 humana (0,702 μM) usando ³²P e maior que o obtido para *P. falciparum* (0,207 μM) (PALLAVI et al., 2010). Como discutido anteriormente, a comparação de valores obtidos por diferentes condições experimentais é limitada, já que podem ser alterados de acordo com os parâmetros utilizados. Porém, a GA é um dos inibidores protótipos que

possivelmente poderia ser utilizado de maneira sinérgica no combate ao parasita *P. falciparum* (KUMAR; MUSIYENKO; BARIK, 2003).

Também foi testado se as duas co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B seriam capazes de inibir a atividade ATPásica da LbHsp90. Para isso foi fixada uma concentração de ATP (1 mM) e LbHsp90 (1 µM) e variada a concentração das p23. A contribuição de cada controle negativo foi descontada dos dados experimentais e após o tratamento dos dados foi possível fazer um ajuste dose-resposta e obter os valores de IC₅₀. Os resultados mostraram que as Lbp23 testadas inibem a atividade ATPásica da LbHsp90 com intensidades diferentes, sendo que a Lbp23A mostrou uma inibição próxima a 100% enquanto que a Lbp23B inibiu aproximadamente 30% da atividade, apresentando alta atividade residual em torno de 70% (Fig. 20). Levando em conta essas considerações, os valores de IC₅₀ obtidos para cada p23 foram diferentes, sendo 2,5 μM para Lbp23A e 10 μM para Lbp23B. Estes resultados funcionais sugerem que as Lbp23 podem desempenhar diferentes atividades junto a LbHsp90, o que deve ser investigado de maneira mais adequada. Resultados biofísicos (dados não mostrados) sugerem que as Lbp23 possuem diferentes estabilidades térmicas e químicas, apesar de propriedades estruturais similares como mostrado nos espectros de CD e dados de fluorescência.

Figura 20 - Inibição da atividade ATPásica da LbHsp90 pelas co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B. A proteína LbHsp90 foi primeiramente incubada com as p23 separadamente (0 a 50 μM) por 30 minutos à temperatura ambiente e a seguir as amostras foram incubadas com 1 mM de ATP por 3 horas a 37 °C antes de ser submetido à reação com o substrato do kit para determinar a taxa de P_i liberado.

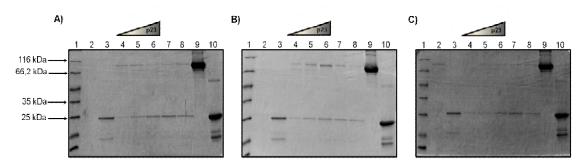


2.2.3.4 A co-chaperona Lbp23B interage com a LbHsp90 in vitro

Para verificar a interação *in vitro* entre as proteínas LbHsp90 e suas cochaperonas Lbp23A e Lbp23B, foram feitos ensaios de *pull-down*, utilizando uma resina de afinidade ao níquel. A His-tag foi mantida na LbHsp90 para que pudesse haver interação com a resina. Já para as p23, a His-tag foi clivada e com isso, apenas seria visualizada após a eluição da resina, caso houvesse interação com a LbHsp90 ligada na mesma. Foram testadas três condições: com ATP, ADP e sem nucleotídeo. Os resultados foram analisados por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e mostrados a seguir.

Com a proteína Lbp23A_AHis foi observada uma interação não específica com a resina de níquel em diferentes condições e duas resinas diferentes, pois é vista a presença da p23A no controle negativo (canaleta 2), em que apenas é incubada com a resina, na ausência da LbHsp90 (Fig. 21). Apesar de não ter a Histag proveniente do vetor de expressão, essa interação com a resina pode ser devido a presença das 5 histidinas na sequência de aminoácidos que estão localizadas no N-terminal da proteína. Diante disso, a técnica de *pull-down* parece não ser a mais indicada nesse caso, pois os resultados obtidos se mostraram inconclusivos. Para solucionar esse problema poderia ser utilizada outra técnica para investigar a interação *in vitro* dessas proteínas, como por exemplo, coimunoprecipitação seguida por *western blot*, uso de um agente *crosslinker* seguida por *western blot* ou calorimetria de titulação isotérmica. Estes experimentos estão sendo programados pelo grupo e devem ser realizados num futuro próximo.

Figura 21 - Interação entre as proteínas LbHsp90 e Lbp23A analisada por *pull-down*. As condições testadas foram: ausência de nucleotídeo (A), presença de 1 mM de ATP (B) e presença de 1 mM de ADP (C). A ordem das canaletas é a mesma para todas as condições. 1: marcador de massa molecular; 2: controle contendo LbHsp90; 3: controle contendo Lbp23A_ΔHis; 4-6: incubação com 10, 20 e 30 μM de Lbp23A_ΔHis, respectivamente; 7-8: controle com a ordem de incubação invertida na presença e ausência de 5 mM de MgCl2, respectivamente; 9: controle da precipitação com acetona da LbHsp90; 10: controle da precipitação com acetona da LbHsp90; 10:



Com a proteína Lbp23B a técnica do *pull-down* se mostrou adequada, onde foi possível visualizar a interação com a LbHsp90. Nesse caso, não foi observada p23 na ausência da LbHsp90, atestando a interação como específica. A ordem de incubação das proteínas foi importante para o resultado, pois foi observado que a interação entre a Lbp23B e a LbHsp90 ocorreu apenas quando foram previamente incubadas antes de ser adicionadas à resina. Isso sugere que a dimerização da LbHsp90 é importante para que ocorra a interação com a Lbp23B, já que ao mudar a ordem de incubação, ou seja, incubar a LbHsp90 com a resina e depois acrescentar a Lbp23B, não foi observada interação. Ao se ligar na resina, a LbHsp90 deve ter sido impedida de dimerizar o N-terminal e com isso não foi capaz de interagir com a Lbp23B. Abaixo seguem dois esquemas explicativos sobre a aplicação da metodologia nesse trabalho (Fig. 22 e 23).

Figura 22 – Esquema mostrando como foram feitos os ensaios de *pull-down* entre a LbHsp90 e as cochaperonas p23. A LbHsp90 e a Lbp23 foram incubadas previamente (1) e depois foi adicionada a resina de afinidade ao níquel (2). Após centrifugação, (3) as proteínas que interagiram com a resina e sedimentaram (4) foram eluídas com imidazol (5) e o resultado analisado por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) (6). Na ausência de LbHsp90 a Lbp23 não interage com a resina pois não possui His-tag e, portanto, a visualização no gel indica que houve interação entre elas.

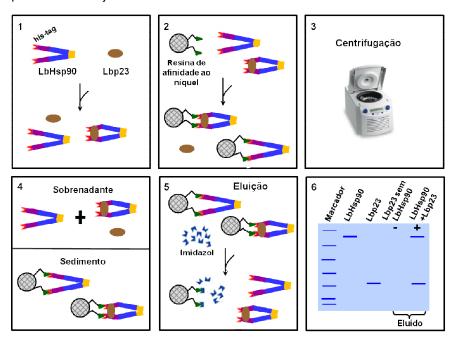
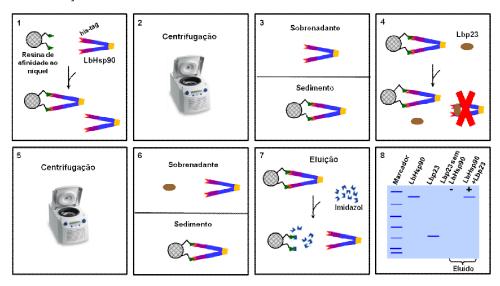
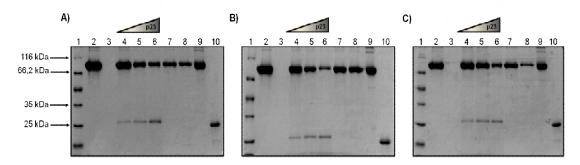


Figura 23 – Esquema mostrando como foram feitos os controles dos ensaios de *pull-down* entre a LbHsp90 e as co-chaperonas p23 mudando a ordem de incubação das proteínas. A LbHsp90 foi incubada com a resina de afinidade ao níquel (1), seguida por centrifugação (2), onde permaneceu no sedimento (3) e posteriormente incubada com a Lbp23 (4). Como o domínio N-terminal estava ligado à resina por meio da His-tag, não houve dimerização e não ocorreu interação da LbHsp90 com a Lbp23. Após nova centrifugação (5), apenas a LbHsp90 estava presente ligada à resina e, portanto no sedimento (6). Com isso, ao ser feita a eluição com imidazol (7), não foi possível visualizar a Lbp23 no SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), apenas a LbHsp90 (8), atestando que não ocorreu interação entre elas.



Em todas as condições testadas foi possível verificar que houve interação entre a Lbp23B e a LbHsp90, como mostram as figuras abaixo (Fig.24 A, B e C). Alguns trabalhos com as proteínas humanas, de levedura e *P. falciparum* mostraram a interação entre a Hsp90 e a p23 apenas na presença de ATP (CHUA et al., 2010; OBERMANN et al., 1998; FANG et al., 1998). Porém, também foi mostrado que a p23 humana interage com a Hsp90 tanto na presença quanto na ausência de ADP e AMPPNP, mas com maior afinidade nesse último caso (MCLAUGHLIN et al., 2006). Um modelo de ciclo funcional foi proposto, no qual a Hsp90 pode ser encontrada nas conformações aberta e fechada na ausência de nucleotídeos, porém com equilíbrio deslocado para a conformação aberta. A ligação de ATP deslocaria o equilíbrio conformacional para a conformação fechada, acelerando a dimerização do Nterminal, estado em que a p23 interage com maior afinidade (HESSLING; RICHTER; BUCHNER, 2009; MICKLER et al., 2009).

Figura 24 - Interação entre as proteínas LbHsp90 e Lbp23B analisada por *pull-down*. As condições testadas foram: ausência de nucleotídeo (A), presença de 1 mM de ATP (B) e presença de 1 mM de ADP (C). A ordem das canaletas é a mesma para todas as condições. 1: marcador de massa molecular; 2: controle contendo LbHsp90; 3: controle contendo Lbp23B_ΔHis; 4-6: incubação com 10, 20 e 30 μM de Lbp23B_ΔHis, respectivamente; 7-8: controle com a ordem de incubação invertida na presença e ausência de 5 mM de MgCl2, respectivamente; 9: controle da precipitação com acetona da LbHsp90; 10: controle da precipitação com acetona da Lbp23B_ΔHis.



Também pode ser observada uma menor quantidade de LbHsp90 recuperada em relação ao aumento da concentração de Lbp23B, sugerindo que a dimerização do N-terminal da LbHsp90 deve reduzir a disponibilidade da His-tag para interagir com a resina e, portanto, a quantidade de LbHsp90 eluída é menor.

Por outro lado, a incubação prévia da LbHsp90 com a resina antes de adicionar a Lbp23B sugere que a ocorrência de mudança conformacional é necessária para a ligação da Lbp23B na LbHsp90. Nessa ordem de adição de reagente não foi observada interação entre LbHsp90 e Lbp23B, na presença e ausência de MgCl₂ (canaletas 7 e 8 da figura 22 A, B e C). Isso deve ter ocorrido devido à interação da His-tag da LbHsp90 na conformação estendida impede que a ligação de ATP na LbHsp90 induza a consequente dimerização do N-terminal, não deixando o domínio N-terminal dimerizado disponível para interação com a Lbp23B.

3 Conclusão

As proteínas alvo desse trabalho foram produzidas por expressão heteróloga, apresentando-se enoveladas e foram caracterizadas em relação às suas estruturas secundárias e terciárias. Essa caracterização foi importante para tentar entender o mecanismo de ação dessa família de Hsp90 em *L. braziliensis*, assim como a interação com as co-chaperonas p23.

Em solução, as proteínas LbHsp90, LbHsp90_N e LbHsp90_NM foram identificadas como dímero, monômero e monômero, respectivamente, todas com assimetria. A inexistência do domínio C-terminal na Hsp90 faz com que a proteína fique em sua forma monomérica, o que interfere diretamente com sua atividade. As proteínas Lbp23A e Lbp23B se mostraram como monômeros assimétricos, como descrito para outras p23 na literatura.

As constantes de dissociação entre a LbHsp90, seus domínios e os nucleotídeos ATP, ADP e AMPPNP obtidas por fluorescência, foram semelhantes para todas as condições testadas, na presença ou ausência de MgCl₂, em torno de 150 μM, exceto a LbHsp90_N que apresentou maior afinidade ao ADP, quando na presença de MgCl₂.

A proteína LbHsp90 apresentou afinidade cerca de 15 vezes maior pela GA quando comparado ao ATP, sendo aferidas pela mesma metodologia. Por sua vez, a LbHsp90_NM apresentou maior afinidade pela GA que a LbHsp90 e a LbHsp90_N maior afinidade pela GA que o domínio NM. Isto pode sugerir que as mudanças conformacionais envolvidas na interação do domínio N na proteína completa com os demais domínios da LbHsp90 reduz a afinidade do domínio N pela GA.

Funcionalmente, a LbHsp90 apresentou alta atividade chaperona ao prevenir de maneira efetiva a agregação da citrato sintase *in vitro*, mesmo em concentrações baixas e independentemente de ATP. Os domínios N e NM também apresentaram atividade chaperona, porém menor que a LbHsp90, provavelmente devido a diminuição de sítios de interação com proteínas-clientes. A LbHsp90 possui baixa atividade ATPásica, assim como outras Hsp90 já descritas na literatura. Além disso, a LbHsp90_NM não possui atividade ATPásica, embora possua o sítio de ligação ao ATP, ressaltando a importância da proteína completa para que haja atividade. A atividade ATPásica foi inibida por GA com um IC₅₀ de 0,7 ± 0,2 μM. As duas cochaperonas Lbp23 foram capazes de inibir a atividade ATPásica da LbHsp90, porém

com diferentes valores de IC $_{50}$ (2,5 μ M para Lbp23A e 10 μ M para Lbp23B), o que sugere que elas podem ter diferentes funções em relação à LbHsp90.

A interação *in vitro* entre a LbHsp90 e a Lbp23B foi verificada por *pull-down*, onde foi possível visualizar interação na presença de ATP, ADP e também sem nucleotídeo. A ordem da incubação das proteínas se mostrou importante. No controle feito com a incubação da LbHsp90 previamente com a resina antes de adicionar a Lbp23B, não foi possível verificar interação, sugerindo que o domínio N-terminal da LbHsp90 foi impedido de se dimerizar por estar ligado à resina através da His-tag e, uma vez não sendo formado o estado fechado da Hsp90, não houve interação com a p23.

O trabalho pioneiro com a Hsp90 e as p23 de *L. braziliensis* oferece uma grande contribuição para futuros trabalhos que visam o entendimento das relações funcionais entre essas proteínas e em relação ao parasita, e também no que diz respeito à investigação futura do contexto das Hsp90 no desenvolvimento da leishmaniose.

Referências

ALI, M. M. U.; ROE, S. M.; VAUGHAN, C. K.; MEYER, P.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PRODROMOU, C.; PEARL, L. H. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1013-1017, 2006.

AMATO, V. S.; DUARTE, M. I.; NICODEMO, A. C.; DE CARVALHO, L. V.; PAGLIARI, C.; DA MATTA, V. L.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE CASTRO, S. M.; UIP, D. E.; AMATO, J. G.; AMATO NETO, V. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 23-30, 1998.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 2007. ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223-230, 1973.

BANUMATHY, G.; SINGH, V.; PAVITHRA, S. R.; TATU, U. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18336-18345, 2003.

BOHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992.

BOHEN, S. P. Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamycin antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 6, p. 3330-3339, 1998.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 3, p. 257-261, 2005.

BORKOVICH, K. A.; FARRELLY, F. W.; FINKELSTEIN, D. B.; TAULIEN, J; LINDQUIST, S. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3919-3930, 1989.

BOSE, S.; WEIKL, T.; BÜGL, H.; BUCHNER, J. Chaperone function of Hsp90-associated proteins. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1715-1717, 1996.

BUCHNER, J. Hsp90 & Co – a holding for folding. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 4, p. 136-141, 1999.

CALDERWOOD, S. K.; KHALEQUE, M. A.; SAWYER, D. B.; CIOCCA, D. R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 3, p. 164-172, 2006.

CHIOSIS, G.; VILENCHIK, M.; KIM, J.; SOLIT, D. Hsp90: the vulnerable chaperone. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 20, p. 881-888, 2004.

CHUA, C. S.; LOW, H.; GOO, K. S.; SIM, T. S. Characterization of Plasmodium falciparum co-chaperone p23: its intrinsic chaperone activity and interaction with Hsp90. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1675-1686, 2010.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

CUTFORTH, T.; RUBIN, G. M. Mutations in Hsp83 and cdc37 Impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. **Cell**, v. 77, n. 7, p. 1027-1036, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DEVANEY, E.; O'NEILL, K.; HARNETT, W.; WHITESELL, L.; KINNAIRD, J. H. Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 627-636, 2005.

DITTMAR, K. D.; DEMADY, D. R.; STANCATO, L. F.; KRISHNA, P.; PRATT, W. B. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 21213-21220, 1997.

EDELHOCH, H. Spectroscopic Determination of tryptophan and tyrosine in Proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967.

EPPS, D. E.; RAUB, T. J.; CAIOLFA, V.; CHIARI, A.; ZAMAI, M. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the guenching of the

- intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 41-48, 1999.
- FANG, Y.; FLISS, A. E.; RAO, J.; CAPLAN, A. J. SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 7, p. 3727-3734, 1998.
- FELTS, S. J.; TOFT, D. O. p23, a simple protein with complex activities. **Cell Stress Chaperones**, v. 8, n. 2, p. 108-113, 2003.
- FORAFONOV, F.; TOOGUN, O. A.; GRAD, I.; SUSLOVA, E.; FREEMAN, B. C.; PICARD, D. p23/Sba1p protects against Hsp90 inhibitors independently of its intrinsic chaperone activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 10, p. 3446-3456, 2008.
- FREEMAN, B. C.; TOFT, D. O.; MORIMOTO, R. I. Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1718-1720, 1996.
- GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, CD004834, 2009.
- GRAEFE, S. E. B.; WIESGIGL, M.; GAWORSKI, I.; MACDONALD, A.; CLOS, J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 6, p. 936-943, 2002.
- HAHN, J. S. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. **BMB reports**, v. 42, n. 10, p. 623-630, 2009.
- HARST, A.; LIN, H.; OBERMANN, W. M. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. **Biochemical Journal**, v. 387, p. 789-796, 2005.
- P. Hawle, M. Siepmann, A. Harst, M. Siderius, H.P. Reusch, W.M.J. Obermann, The Middle Domain of Hsp90 Acts as a Discriminator between Different Types of Client Proteins, Mol. Cell. Biol. 26 (2006) pp. 8385-8395.
- HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 349-384, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. Lancet, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HESSLING, M.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. **Nature Structural & Molecular Biology,** v. 16, n. 3, p. 287-293, 2009.

JAENICKE, R. Perspectives in biochemistry protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. **Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 3147-3161, 1991.

JAKOB, U.; LILIE, H.; MEYER, I.; BUCHNER, J. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7288-7294, 1995.

JOHNSON, J. L.; BEITO, T. G.; KRCO, C. J.; TOFT, D. O. Characterization of a novel 23-kilodalton protein of unactive progesterone receptor complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 3, p. 1956-1963, 1994.

JOHNSON, J. L.; TOFT, D. O. A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24989-24993, 1994.

KAMAL, A.; THAO, L.; SENSINTAFFAR, J.; ZHANG, L.; BOEHM, M. F.; FRITZ, L. C.; BURROWS, F. J. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 407-410, 2003.

KARAGÖZ, G. E.; DUARTE, A. M.; IPPEL, H.; UETRECHT, C.; SINNIGE, T.; VAN ROSMALEN, M.; HAUSMANN, J.; HECK, A. J.; BOELENS, R.; RÜDIGER, S. G. Nterminal domain of human Hsp90 triggers binding to the cochaperone p23. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 2, p. 580-585, 2011.

KHAN, M. Y.; VILLANUEVA, G.; NEWMAN, S. A. On the origin of the positive band in the far-ultraviolet circular dichroic spectrum of fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 4, p. 2139-2142, 1989.

KOSANO, H.; STENSGARD, B.; CHARLESWORTH, M. C.; MCMAHON, N.; TOFT, D. The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 49, p. 32973-32979, 1998.

KRUKENBERG, K. A.; STREET, T. O.; LAVERY, L. A.; AGARD, D. A. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 44, n. 2, p. 229-255, 2011.

KUMAR, R.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. **Malaria Journal**, v. 2, n. 30, p. 1-11, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LASKEY, R. A.; HONDA, B. M.; MILLS, A. D.; FINCH, J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 416-420, 1978.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067-2079, 2002.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-635, 2012.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988.

MARCU, M. G.; CHADLI, A.; BOUHOUCHE, I.; CATELLI, M.; NECKERS, L. M. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 37181-37186, 2000.

MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 3, p. 242-248, 2000.

MARTINEZ-YAMOUT, M. A.; VENKITAKRISHNAN, R. P.; PREECE, N. E.; KROON, G.; WRIGHT, P. E.; DYSON, H. J. Localization of sites of interaction between p23 and Hsp90 in solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14457-14464, 2006.

MATTS, R. L.; DIXIT, A.; PETERSON, L. B.; SUN, L.; VORUGANTI, S.; KALYANARAMAN, P.; HARTSON, S. D.; VERKHIVKER, G. M.; BLAGG, B. S. Elucidation of the Hsp90 C-terminal inhibitor binding site. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 8, p. 800-807, 2011.

MCLAUGHLIN, S. H.; SMITH, H, W.; JACKSON, S. E. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 4, p. 787-798, 2002.

MCLAUGHLIN, S. H.; SOBOTT, F.; YAO, Z.-PING.; ZHANG, W.; NIELSEN, P. R.; GROSSMANN, J. G.; LAUE, E. D.; ROBINSON, C. V.; JACKSON, S. E. The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 3, p. 746-758, 2006.

MCLAUGHLIN, S. H.; VENTOURAS, L. A.; LOBBEZOO, B.; JACKSON, S. E. Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform. **Journal of Molecular Biology**, v. 344, n. 3, p. 813-826, 2004.

MEYER, P.; PRODROMOU, C.; HU, B.; VAUGHAN, C.; ROE, S. M.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 647-658, 2003.

MEYER, P.; PRODROMOU, C.; LIAO, C.; HU, B.; ROE, S. M.; VAUGHAN, C. K.; VLASIC, I.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO Journal**, v. 23, n. 6, p. 1402-1410, 2004.

MICKLER, M.; HESSLING, M.; RATZKE, C.; BUCHNER, J.; HUGEL, T. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 281-286, 2009.

MORALES, M. A.; WATANABE, R.; DACHER, M.; CHAFEY, P.; OSORIO, Y.; FORTÉA, J.; SCOTT, D. A.; BEVERLEY, S. M.; OMMEN, G.; CLOS, J.; HEM, S.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J. C.; NAMANE, A.; SPÄTH, G. F. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the Leishmania donovani infectious stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8381-8386, 2010.

NECKERS, L.; WORKMAN, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 64-76, 2012.

- NEMOTO, T.; OHARA-NEMOTO, Y.; OTA, M.; TAKAGI, T.; YOKOYAMA, K. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 233, n. 1, p. 1-8, 1995.
- NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3638-3646, 1989.
- NILAPWAR, S.; WILLIAMS, E.; FU, C.; PRODROMOU, C.; PEARL, L. H.; WILLIAMS, M. A.; LADBURY, J. E. Structural-thermodynamic relationships of interactions in the N-terminal ATP-binding domain of Hsp90. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 4, p. 923-936, 2009.
- OBERMANN, W. M. J.; SONDERMANN, H.; RUSSO, A. A.; PAVLETICH, N. P.; HARTL, F. U. In Vivo Function of Hsp90 Is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 4, p. 901-910, 1998.
- ODUNUGA, O. O.; LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **BioEssays**, v. 26, n. 10, p. 1058-1068, 2004.
- ONUOHA, S. C.; MUKUND, S. R.; COULSTOCK, E. T.; SENGEROVÀ, B.; SHAW, J.; MCLAUGHLIN, S. H.; JACKSON, S. E. Mechanistic studies on Hsp90 inhibition by ansamycin derivatives. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 2, p. 287-297, 2007.
- OWEN, B. A. L.; SULLIVAN, W. P.; FELTS, S. J.; TOFT, D. O. Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7086-7091, 2002.
- PALLAVI, R.; ROY, N.; NAGESHAN, R. K.; TALUKDAR, P.; PAVITHRA, S. R.; REDDY, R.; VENKETESH, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A. K.; SINGH, R. K.; YADAV, S. C.; TATU, U. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 37964-37975, 2010.
- PANARETOU, B.; PRODROMOU, C.; ROE, S. M.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 16, p. 4829-4836, 1998.

PANARETOU, B.; SILIGARDI, G.; MEYER, P.; MALONEY, A.; SULLIVAN, J. K.; SINGH, S.; MILLSON, S. H.; CLARKE, P. A.; NAABY-HANSEN, S.; STEIN, R.; CRAMER, R.; MOLLAPOUR, M.; WORKMAN, P.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Activation of the ATPase Activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1, **Molecular Cell**, v. 10, n. 6, p. 1307-1318, 2002.

PAVITHRA S. R.; BANUMATHY, G.; JOY, O.; SINGH, V.; TATU, U. Recurrent fever promotes *Plasmodium falciparum* development in human erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46692-46699, 2004.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. **Advances in Protein Chemistry**, v. 59, p. 157-186, 2001.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 271-294, 2006.

POWERS, M. V.; WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3758-3769, 2007.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 306-360, 1997.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 2, p. 111-133, 2003.

PRODROMOU, C. The 'active life' of Hsp90 complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 3, p. 614-623, 2011.

PRODROMOU C.; PANARETOU, B.; CHOHAN, S.; SILIGARDI, G.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; ROE, S. M.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. **EMBO Journal**, v. 19, n. 16, p. 4383-4392, 2000.

PRODROMOU, C.; ROE, S. M.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. **Nature Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 477-482, 1997.

PRODROMOU, C.; SILIGARDI, G.; O'BRIEN, R.; WOOLFSON, D. N.; REGAN, L.; PANARETOU, B.; LADBURY, J. E.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Regulation of

Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. **EMBO Journal**, v. 18, n. 3, p. 754-762, 1999.

PULLEN, L.; BOLON, D. N. Enforced N-domain proximity stimulates Hsp90 ATPase activity and is compatible with function *in vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p.11091-11098, 2011.

QUEITSCH, C.; SANGSTER, T. A.; LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. **Nature**, v. 417, n. 6889, p. 618-624, 2002.

RAWEL, H. M.; FREY, S. K.; MEIDTNER, K.; KROLL, J.; SCHWEIGERT, F. J. Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 8, p. 705-713, 2006.

RATZKE, C.; MICKLER, M.; HELLENKAMP, B.; BUCHNER, J.; HUGEL, T. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 37, p. 16101-16106, 2010.

RETZLAFF, M.; HAGN, F.; MITSCHKE, L.; HESSLING, M.; GUGEL, F.; KESSLER, H.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 344-354, 2010.

RICHTER, K.; MUSCHLER, P.; HAINZL, O.; BUCHNER, J. Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33689-33696, 2001.

RICHTER, K.; WALTER, S.; BUCHNER, J. The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 5, p. 1403-1413, 2004.

ROWLANDS, M. G.; NEWBATT, Y. M.; PRODROMOU, C.; PEARL, L. H.; WORKMAN, P.; AHERNE, W. High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 327, n. 2, p. 176-183, 2004.

ROY, N.; NAGESHAN, R. K.; RANADE, S.; TATU, U. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 3, p. 707-711, 2012.

- RUTHERFORD, S. L.; LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. **Nature**, v. 396, n. 6709, p. 336-342, 1998.
- SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTEREAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.
- SCHEUFLER, C.; BRINKER, A.; BOURENKOV, G.; PEGORARO, S.; MORODER, L.; BARTUNIK, H.; HARTL, F. U.; MOAREFI, I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70 Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 199-210, 2000.
- SCHNEIDER, C.; SEPP-LORENZINO, L.; NIMMESGERN, E.; OUERFELLI, O.; DANISHEFSKY, S.; ROSEN, N.; HARTL, F. U. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14536-14541, 2006.
- SCHUCK, P. Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 3, p. 1503-1512, 1998.
- SCHUCK, P.; PERUGINI, M. A.; GONZALES, N. R.; HOWLETT, G. J.; SCHUBERT, D. Size distribution analyses of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 2, p. 1096-1111, 2002.
- SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 273-279, 1998.
- SCHULTE, T. W.; AN, W. G.; NECKERS, L. M. Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 239, n. 3, p. 655-659, 1997.
- SHAHINAS D.; LIANG, M.; DATTI, A.; PILLAI, D. R. A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3552-3557, 2010.

- SHONHAI, A. Plasmodial heat shock proteins: targets for chemotherapy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 61-74, 2010.
- SHONHAI, A.; MAIER, A. G.; PRZYBORSKI, J. M.; BLATCH, G. L. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 2, p. 143-157, 2011.
- SILIGARDI, G.; HU, B.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51989-51998, 2004.
- SMITH, D. F.; FABER, L. E.; TOFT, D. O. Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 7, p. 3996-4003, 1990.
- SMITH, D. F.; SULLIVAN, W. P.; MARION, T. N.; ZAITSU, K.; MADDEN, B.; MCCORMICK, D. J.; TOFT, D. O. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 2, p. 869-876, 1993.
- SÕTI, C.; NAGY, E.; GIRICZ, Z.; VÍGH, L.; CSERMELY, P.; FERDINANDY, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 769-780, 2005.
- SOUTHWORTH, D. R.; AGARD, D. A. Client-loading conformation of the Hsp90 molecular chaperone revealed in the cryo-EM structure of the human Hsp90:Hop complex. **Molecular Cell**, v. 42, n. 6, p. 771-781, 2011.
- STEBBINS, C. E.; RUSSO, A. A.; SCHNEIDER, C.; ROSEN, N.; HARTL, F. U.; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of an Hsp90 geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 239-250, 1997.
- USMANI, S. Z.; BONA, R.; LI, Z. 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer-from bench to bedside. **Current Molecular** Medicine, v. 9, n. 5, p. 654-664, 2009. WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18473-18477, 2008.
- WAYNE, N.; BOLON, D. N.. Dimerization of Hsp90 is required for *in vivo* function. Design and analysis of monomers and dimers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 48, p. 35386-35395, 2007.

WEAVER, A. J.; SULLIVAN, W. P.; FELTS, S. J.; OWEN, B. A.; TOFT, D. O. Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23045-23052, 2000. WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 151, p. 1-44, 2004.

WEIKL, T.; ABELMANN, K.; BUCHNER, J. An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 3, p. 685-691, 1999.

WEIKL, T.; MUSCHLER, P.; RICHTER, K.; VEIT, T.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 303, n. 4, p. 583-592, 2000.

WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p.14949-14959, 1982.

WHITESELL, L.; MIMNAUGH, E. G.; DE COSTA, B.; MYERS, C. E.; NECKERS, L. M. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60^{v-src} heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8324-8328, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of Leishmaniases.** Genebra, 2010. p. 1-186. (Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases).

WIDER, D.; PÉLI-GULLI, M. P.; BRIAND, P. A.; TATU, U.; PICARD, D. The complementation of yeast with human or *Plasmodium falciparum* Hsp90 confers differential inhibitor sensitivities. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 147-152, 2009.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-3316, 2001a.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 27-31, 2001b.

- YOUNG, J. C.; HARTL, F. U. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. **EMBO Journal**, v. 19, n. 21, p. 5930-5940, 2000.
- YOUNG, J. C.; MOAREFI, I.; HARTL, F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 2, p. 267-273, 2001.
- YOUNG, J. C.; OBERMANN, W. M. J.; HARTL, F. U. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18007-18010, 1998.
- YOUNG, J. C.; SCHNEIDER, C.; HARTL, F. U. In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. **FEBS Letters**, v. 418, n. 1-2, p. 139-143, 1997.

ZILBERSTEIN, D; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994. ZURAWSKA, A.; URBANSKI, J.; MATULIENE, J.; BARANIAK, J.; KLEJMAN, M. P.; FILIPEK, S.; MATULIS, D.; BIEGANOWSKI, P. Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 5, p. 575-583, 2010.