Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Candidato: MS. Thiago Vargas Seraphim

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Estudo estrutural da co-chaperona Aha1 (Activator of Hsp90
ATPase 1) de *Leishmania braziliensis* e da sua ação sobre o
ciclo funcional da Hsp90

São Carlos

2015

Thiago Vargas Seraphim

Estudo estrutural da co-chaperona Aha1 (Activator of Hsp90 ATPase 1) de *Leishmania braziliensis* e da sua ação sobre o ciclo funcional da Hsp90.

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo 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

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de aprender, por ter me conduzido pelos caminhos que trilhei e por ter colocado as pessoas em minha vida pelas quais venho a agradecer. Obrigado pelos desafios e por me dar a capacidade de supera-los.

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges tenho muito a agradecer em vários aspectos. Agradeço pela oportunidade de ter sido seu aluno, pela confiança depositada, pelo aprendizado inestimável que tive ao longo desses anos. Obrigado por acreditar em mim, me proporcionar a oportunidade de crescer e me tornar um cientista e uma pessoa melhor. Obrigado também pela amizade, pela companhia, pelas conversas e boas risadas. Tenho profunda admiração pelo cientista, professor e pessoa que você é, e terei muito orgulho em dizer que me doutorei em seu laboratório, sob sua orientação.

À Prof. Dra. Lisandra M. Gava Borges pela oportunidade de trabalhar em conjunto desde a época do mestrado, por ter aproximado meu caminho ao do Prof. Dr. Júlio, pelo incentivo na carreira e, claro, pelas risadas e boa companhia.

Ao Prof. Dr. Walid A. Houry que me acolheu em seu laboratório em Toronto, me orientou durante os meses no exterior, contribuindo para minha formação científica e pensamento crítico.

Ao Prof. Dr. Yoshito Kakiyama por ter me ensinado muito sobre genética de levedura, pelas conversas e companhia no Tim Hortons de cada dia durante meu primeiro mês em Toronto.

Ao Prof. Dr. Leandro R. S. Barbosa pela colaboração nas coletas e auxílio no tratamento dos dados de SAXS.

À Prof. Dra. Silvana Murta por me receber no CPqRR em Belo Horizonte e me auxiliar no cultivo das células de *Leishmania*.

Aos professores Dr. Carlos H. I. Ramos e Dr. Nilson I. T. Zanchin, orientadores de mestrado e iniciação científica, cujo aprendizado proporcionado foi essencial para a minha formação.

À Central de Análises Químicas Instrumentais – IQSC e ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” por disponibilizarem equipamentos para execução de alguns experimentos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron por disponibilizarem a infraestrutura para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado no país (Processo nº 2010/19242-6), pela bolsa de estágio em pesquisa no exterior (Processo nº 2014/06829-0) e pelo auxílio à pesquisa. Ao CNPq e CAPES pelo financiamento da pesquisa.

Ao programa de pós-graduação do IQSC pelo suporte durante todos esses anos de doutorado.

Aos membros atuais do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, em especial ao Paulo Roberto das Dores da Silva, Amanda Coto, Karine Minari e Fernanda Batista, obrigado pela amizade, pela convivência dos últimos anos e pelo grande aprendizado que me proporcionaram. Guardo todos vocês e todas as experiências com muito carinho. Destaco aqui um muito obrigado ao amigo Paulo Roberto, companheiro nessa jornada que se iniciou há 4 anos e meio. Muitas histórias durante o doutorado, coletas de SAXS, aprendizados e uma ótima parceria para todos os momentos.

Aos ex-colegas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Juliana Tamara, Glessler Silva Almeida, Marcella Paganelli, Kelly Pereira da Silva, Carolina Queiroz, Marina de Matteu Alves, Marisvanda Rios, Beatriz Anetta, muito obrigado por tudo.

Ao Kamran Rizzolo, Nardin Nano, Elisa Leung, Vaibhav Bhandari, Tangzhi Li, Keith Wong, e colegas do laboratório do Prof. Dr. Houry, pelas discussões científicas, pelas não tão científicas assim, por terem me acolhido e feito da minha estadia em Toronto uma experiência fantástica.

À Carolina Colleti, que iniciou como colega de laboratório, se tornou uma grande amiga e hoje tem um lugar especial em minha vida. Muito obrigado pelo incentivo e confiança. Por mais que você insista no contrário, eu aprendo muito com você.

À minha família, em especial aos meus pais Marco e Gisela, e a minha irmã Júlia, pelo apoio incondicional que me deram desde o início. Pai e Mãe, sem o suporte de vocês nada disso seria possível, obrigado por me orientarem na vida com primor. Minha parceirinha, Juju, você é para mim uma das maiores razões para agradecer a Deus e batalhar todos os dias. Espero sempre ser alguém a quem você possa se espelhar, além dos nossos pais. Agradeço também aos meus avós, Antonio e Geni, à minha tia, Marli, e aos meus primos, Karina, Gustavo e Daniele, por sempre me apoiarem e incentivarem.

Àqueles que não me dirigi nominalmente por me falhar a memória e a todos que diretamente ou indiretamente participaram da minha formação, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As chaperonas moleculares atuam no enovelamento de proteínas, montagem de complexos, prevenção/recuperação de proteínas de agregados e encaminhamento de proteínas mal enoveladas para depuração. As Hsp90 são chaperonas moleculares que atuam estabilizando proteínas relacionadas a vias de sinalização, crescimento celular, processos transcricionais e traducionais, estabilidade do genoma, entre outras, sendo essencial para a viabilidade celular. Em protozoários do gênero *Leishmania*, as Hsp90 são imprescindíveis no desenvolvimento, adaptação e transformação celular. Estes fatores fazem das Hsp90 alvos potenciais para o tratamento de patologias, como a leishmaniose, uma doença tropical negligenciada. As Hsp90 são homodímeros flexíveis onde cada protômero é dividido em três domínios denominados N, M e C. As Hsp90 possuem um ciclo conformacional associado ao seu ciclo funcional e sua baixa atividade ATPásica, o qual é direcionado e regulado por proteínas auxiliares, as co-chaperonas. A co-chaperona Aha1 atua estimulando a atividade ATPásica da Hsp90, participando da maturação de proteínas quinase e receptores de hormônios. O objetivo deste trabalho foi caracterizar estruturalmente a proteína Aha1 de *L. braziliensis* (LbAha1) e seu mecanismo de interação com a Hsp90 desse organismo (LbHsp90). A LbAha1 é formada por dois domínios, LbAha1N e LbAha1C, conectados entre si por um *linker* flexível. Experimentos de identificação *in vivo* mostraram que a LbAha1 e LbHsp90 são proteínas cognatas. A LbAha1 e as construções de seus domínios (LbAha1N e LbAha1C) recombinantes foram obtidas puras e enoveladas. A LbAha1 é estruturada em dois domínios com diferentes estabilidades, que não interagem entre si e se enovelam independentemente, porém influenciam-se reciprocamente. Em solução, a LbAha1 se comporta como um monômero alongado e possui notável flexibilidade, com dimensão suficiente para interagir com os domínios N e M da LbHsp90. A análise da interação entre a LbAha1 e LbHsp90 revelou que a associação destas proteínas é dirigida entalpicamente, ocorrendo através de interações eletrostáticas e com estequiometria de 2 moléculas de LbAha1 por dímero de LbHsp90. O mapeamento de regiões envolvidas na interação indicou que o domínio LbAha1N e o domínio M da LbHsp90 compõem o cerne da interação e somente a LbAha1 íntegra é capaz de encaminhar a LbHsp90 para um estado fechado. Experimentos de cinética enzimática mostraram que somente a LbAha1 íntegra estimula a atividade ATPásica da LbHsp90 por meio de um mecanismo cooperativo positivo. Assim, é proposto que a conexão entre os domínios da LbAha1, via *linker*, é essencial para o

direcionamento da LbHsp90 para um estado conformacional fechado e competente na hidrólise de ATP.

ABSTRACT

Molecular chaperones play a role in protein folding, complex assembly, prevention/recover of proteins from aggregates and targeting misfolded proteins to depuration. Hsp90 molecular chaperones work stabilizing proteins related to signaling pathways, cell growth, transcription and translation processes, genome stability, among others, and are essential to cell viability. In protozoa of the genus *Leishmania*, Hsp90s are indispensable for cell developing, adaptation and transformation. These factors make Hsp90s potential targets for pathologies treatment, such as leishmaniasis, a neglected tropical disease. Hsp90s are flexible homodimers and each protomer is divided into three domains named N, M and C. Hsp90s have a conformational cycle associated to its functional cycle and low ATPase activity, which is directed and regulated by auxiliary proteins, so-called cochaperones. Aha1 co-chaperone stimulates Hsp90 ATPase activity, participating on protein kinase and hormone receptors maturation. This work aimed to characterize the structure of the Aha1 from *L. braziliensis* (LbAha1) and its mechanism of interaction with the Hsp90 from the same organism (LbHsp90). LbAha1 is formed by two domains, LbAha1N and LbAha1C, connected to each other by a flexible linker. *In vivo* experiments identified LbAha1 and LbHsp90 as cognate proteins. Recombinant LbAha1 and its domains construct (LbAha1N and LbAha1C) were obtained pure and folded. LbAha1 is divided into two domains with dissimilar stabilities and they do not interact to each other. In spite of this they fold independently and influence each other reciprocally. LbAha1 behaves as an elongated monomer in solution and has a remarkable flexibility, with sufficient dimension to interact to LbHsp90 N and M domains. The analysis of the LbAha1-LbHsp90 interaction revealed that the association between these two proteins is enthalpically driven, occurring through electrostatic interactions in a stoichiometry of 2 LbAha1 molecules per LbHsp90 dimer. Domain mapping experiments indicated that LbAha1N and LbHsp90 M domains compose the core of the interaction and only full length LbAha1 is able to direct LbHsp90 toward a closed state. Enzyme kinetics experiments showed that only full length LbAha1 stimulates LbHsp90 ATPase activity through a positive cooperative mechanism. Thus, it is proposed that the connection between the LbAha1 domains, via *linker*, is essential to direct the LbHsp90 toward a closed and ATPase-competent conformational state.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Esquema da interação entre os sistemas Hsp70 e Hsp90 no heterocomplexo <i>foldossomo</i> ..	16
Figura 2– Estrutura da Hsp90.....	19
Figura 3 – Estados conformacionais das Hsp90..	20
Figura 4 – Influência da interação da Aha1 na Hsp90 de levedura na estimulação da atividade ATPásica.....	23
Figura 5 – Participação da Aha1 no ciclo funcional da Hsp90 de levedura.....	24
Figura 6 – Esquema do ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania spp.</i>	29
Figura 7– Análise bioinformática da sequência de aminoácidos da LbAha1..	42
Figura 8 – Estruturas 3D dos domínios da LbAha1.....	43
Figura 9 – Identificação <i>in vivo</i> da LbAha1..	44
Figura 10 – Obtenção da LbAha1 e construções dos domínios recombinantes.....	44
Figura 11 – Caracterização da estrutura secundária LbAha1.....	45
Figura 12 – Caracterização da estrutura terciária da LbAha1..	46
Figura 13 – Estabilidade térmica da LbAha1.....	47
Figura 14 – Estabilidade química da LbAha1.	48
Figura 15 – Cromatografia de exclusão molecular analítica da LbAha1 e domínios.	48
Figura 16 – Ensaio de velocidade de sedimentação (AUC) com a LbAha1.	49
Figura 17 – Análise dos dados de SAXS da LbAha1 e domínios.	50
Figura 18 – Construção dos modelos <i>ab initio</i> da LbAha1 e domínios.....	51
Figura 19 – Estudo da dinâmica da LbAha1 pelo método de <i>Ensemble Optimization</i>	52
Figura 20 – Análise de interações por <i>crosslinking</i>	53
Figura 21 – Análise da atividade chaperona.....	54
Figura 22 – Interação da LbAha1 com a LbHsp90.....	55
Figura 23 – Interação dos domínios da LbAha1 com a LbHsp90.....	57
Figura 24 – Ensaios de interação da LbAha1 com os domínios da LbHsp90.....	58
Figura 25 – Análise da interação do domínio LbAha1N com os domínios da LbHsp90.	59
Figura 26 - Estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90.....	60
Figura 27 – Mecanismo molecular proposto de interação da LbAha1 com a LbHsp90..	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Famílias de chaperonas moleculares.	15
Tabela 2 – Tampões utilizados nos procedimentos experimentais.....	33
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas das proteínas-alvo.....	35
Tabela 4 – Propriedades estruturais e espectroscópicas da LbAha1.	45
Tabela 5 – Parâmetros de estabilidade térmica e química da LbAha1.	47
Tabela 6 – Propriedades hidrodinâmicas da LbAha1 e domínios.	49
Tabela 7 – Dimensões da LbAha1 e das construções dos domínios derivadas dos experimentos de SAXS.....	50
Tabela 8 – Parâmetros termodinâmicos de interação da LbHsp90 com os domínios da LbAha1.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\langle\lambda\rangle$: centro de massa espectral, em nanômetros.

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

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

Aha1C: denominação genérica do domínio C-terminal canônico da Aha1.

Aha1N: denominação genérica do domínio N-terminal canônico da Aha1.

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

Arg: acrônimo de arginina.

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

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

ATPyS: 5'-(γ -tiotrifosfato) de adenosina, do inglês *adenosine 5'-(γ -thiotriphosphate)*, análogo não clivável da adenosina trifosfato.

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

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato.

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

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

Da: dalton, unidade de massa atômica.

D_{máx}: dimensão máxima, em Å.

DSS: disuccinimidil suberato.

EMR: elipticidade molar residual média, em graus cm² dmol⁻¹.

EOM: método de otimização de conjuntos, do inglês *ensemble optimization method*.

f/f_0 : razão entre o coeficiente friccional experimental e o coeficiente friccional de uma esfera rígida de igual massa molecular à proteína de interesse.

GndCl: cloreto de guanidina.

hAha1: proteína ativadora da atividade ATPásica da Hsp90 de *Homo sapiens*.

hAha1C: domínio C-terminal canônico da hAha1.

hAha1N: domínio N-terminal canônico da hAha1.

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

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

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo.

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

Kd: constante de dissociação.

kDa: quilodalton, equivalente a mil daltons.

LbAha1: proteína ativadora da atividade ATPásica da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*.

LbAha1C: domínio C-terminal canônico da LbAha1.

LbAha1N: domínio N-terminal canônico da LbAha1.

LbHop: proteína organizadora da interação entre a Hsp90 e Hsp70 de *Leishmania braziliensis*.

LbHsp90: proteína de choque térmico de 90 kDa de *Leishmania braziliensis*.

LbHsp90M: domínio M da proteína LbHsp90.

LbHsp90NM: domínios N e M da proteína LbHsp90.

Lbp23: proteína de 23 kDa de *Leishmania braziliensis* que interage com a Hsp90.

Luc: luciferase.

MDH: malato desidrogenase, do inglês *malic dehydrogenase*.

MESG: ribosídeo de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina.

MM: massa molecular.

n: estequiometria da reação em experimentos de calorimetria de titulação isotérmica.

NBT: 4-nitro-azul de tetrazólio.

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

PDDF: função de distribuição de distâncias da partícula, do inglês *particle-distance distribution function*.

Pi: ortofosfato inorgânico.

PNP: polinucleotídeo fosforilase, do inglês *poly-nucleotide phosphorylase*.

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

R_g: raio de giro, em Å.

RMN: ressonância magnética nuclear.

R_s: raio de Stokes, em Å.

s: coeficiente de sedimentação, em S.

S: Svedberg, 10⁻¹³ segundos.

s_{20,w}⁰: coeficiente de sedimentação em condição padrão (20 °C e em água) a 0 mg mL⁻¹ de proteína.

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

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

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

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

Trp: acrônimo de triptofano.

UA: unidades arbitrárias

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

VC: volume de coluna.

yAha1: proteína ativadora da atividade ATPásica da Hsp90 de *Saccharomyces cerevisiae*.

yAha1C: domínio C-terminal canônico da yAha1.

yAha1N: domínio N-terminal canônico da yAha1.

ΔC_{papp}: variação da capacidade calorífica aparente.

ΔG_{app}: variação de energia livre de Gibbs.

ΔH_{app}: variação de entalpia aparente.

ΔS_{app}: variação de entropia aparente.

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

λ_{máx}: comprimento de onda máximo, em nanômetros.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Chaperonas moleculares	14
1.2 Hsp90	17
1.3 Aha1	21
1.4 Hsp90 como alvo terapêutico.....	25
<i>1.4.1 Câncer</i>	<i>25</i>
<i>1.4.2 Doenças tropicais negligenciadas.....</i>	<i>27</i>
2 DESENVOLVIMENTO.....	32
2.1 Objetivos.....	32
<i>2.1.2 Gerais</i>	<i>32</i>
<i>2.1.3 Específicos</i>	<i>32</i>
2.2 Material e métodos	32
<i>2.2.1 Bioinformática e modelagem molecular.....</i>	<i>32</i>
<i>2.2.2 Clonagem.....</i>	<i>33</i>
<i>2.2.3 Soluções-tampão.....</i>	<i>33</i>
<i>2.2.4 Expressão e purificação</i>	<i>34</i>
<i>2.2.5 Propriedades físico-químicas das proteínas</i>	<i>34</i>
<i>2.2.6 Quantificação de proteínas</i>	<i>35</i>
<i>2.2.7 Cultivo de parasitos e Western blot.....</i>	<i>35</i>
<i>2.2.8 Espectropolarimetria de dicroísmo circular</i>	<i>36</i>

2.2.9 Espectroscopia de fluorescência	36
2.2.10 Cromatografia de exclusão molecular analítica	37
2.2.11 Ultracentrifugação analítica	38
2.2.12 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo	38
2.2.13 Crosslinking.....	39
2.2.14 Calorimetria de titulação isotérmica	39
2.2.15 Atividade ATPásica	40
2.2.16 Atividade chaperona.....	41
2.3 Resultados	41
2.3.1 Análises bioinformáticas e modelagem molecular	41
2.3.2 Identificação da LbAha1 in vivo.....	43
2.3.3 Obtenção da LbAha1 e domínios recombinantes	44
2.3.4 Caracterização da estrutura secundária e terciária das proteínas recombinantes	45
2.3.5 Investigação da estabilidade térmica e química da LbAha1	46
2.3.6 Caracterização hidrodinâmica e estado oligomérico	48
2.3.7 Estrutura em baixa resolução e dinâmica conformacional.....	49
2.3.8 Verificação de interações intra e intermoleculares da LbAha1 por crosslinking...	53
2.3.9 Atividade chaperona intrínseca.....	53
2.3.10 Análise termodinâmica da interação entre a LbAha1 e LbHsp90	54
2.3.11 Mapeamento dos domínios da LbAha1 envolvidos na interação com a LbHsp90	55
2.3.12 Mapeamento das regiões da LbHsp90 envolvidas na interação com a LbAha1	57
2.3.13 Estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 pela LbAha1	59
2.4 Discussão	60
2.4.1 A LbAha1 possui organização estrutural canônica	60
2.4.2 LbAha1 e LbHsp90 são proteínas cognatas in vivo	61
2.4.3 A LbAha1 recombinante foi obtida enovelada	61

2.4.4 Os domínios da LbAha1 enovelam-se independentemente e possuem diferentes estabilidades	62
2.4.5 A LbAha1 é um monômero alongado em solução	64
2.4.6 As dimensões e flexibilidade da LbAha1 são compatíveis com o modelo de interação que envolve os domínios N e M da LbHsp90	65
2.4.6 Os domínios da LbAha1 não interagem entre si	66
2.4.7 A LbAha1 não possui atividade chaperona	67
2.4.8 Duas moléculas de LbAha1 se ligam ao dímero de Lbhsp90 através de interações polares, direcionando-a para o estado fechado	67
2.4.9 O domínio LbAha1N é o cerne de interação com a LbHsp90 e sua conexão com o domínio LbAha1C é essencial para induzir o remodelamento desta chaperona molecular	69
2.4.10 O domínio M da LbHsp90 é o cerne de interação com a LbAha1	70
2.4.11 O linker da LbAha1 é essencial para a estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90	71
2.4.12 Modelo proposto de estimulação da LbHsp90 pela LbAha1	72
3 CONCLUSÕES	75
4 REFERÊNCIAS	77
5 LISTA DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Chaperonas moleculares

As proteínas são macromoléculas ubíquas, sendo essenciais para as células e, conseqüentemente, todos os organismos vivos. Entre os diversos papéis fisiológicos executados pelas proteínas, pode-se citar como exemplo a sinalização celular, transporte, catálise de reações, movimento (Bozaykut et al, 2014; Gross, 2004; Hunter, 1995; Narlikar & Herschlag, 1997; Seraphim et al, 2014). Para se tornarem funcionais, as proteínas devem se enovelar em sua estrutura tridimensional após serem sintetizadas pelos ribossomos (Bozaykut et al, 2014; Smith et al, 2015; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011), embora algumas, conhecidas como intrinsecamente desenoveladas, sejam funcionais sem necessariamente adquirirem uma estrutura tridimensional (Fink, 2005). Este processo de enovelamento ocorre em um ambiente rico em macromoléculas, e eventuais situações de estresse como o oxidativo, térmico e inflamação, podem levar a eventos não produtivos na via de enovelamento, promovendo o enovelamento incorreto e até mesmo agregação de proteínas (Bozaykut et al, 2014; Smith et al, 2015). Estes agregados estão relacionados com a biogênese de doenças como Parkinson, Alzheimer, diabetes, príon, câncer, entre outras (Ashraf et al, 2014; Forget et al, 2013; Gong et al, 2015; Renner & Melki, 2014; Smith et al, 2015). Em contrapartida, a célula desenvolveu um mecanismo de controle de qualidade para balancear os processos de síntese proteica, enovelamento e degradação, de forma a manter a homeostase proteica ou proteostase e a funcionalidade do proteoma (Bozaykut et al, 2014; Brandvold & Morimoto, 2015; Saibil, 2013; Smith et al, 2015; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011).

Dentre os sistemas envolvidos no controle de qualidade proteica, está o sistema de chaperonas moleculares. As chaperonas moleculares e/ou proteínas de choque-térmico (Hsp, do inglês *heat shock proteins*), auxiliam no enovelamento correto, previnem a agregação e encaminham proteínas para a degradação (Arndt et al, 2007; Bozaykut et al, 2014; Brandvold & Morimoto, 2015; Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Seraphim et al, 2014; Smith et al, 2015; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011). As chaperonas moleculares são divididas em seis principais famílias, de acordo com suas massas moleculares: Hsp90, Hsp70, *J proteins* (Hsp40), Hsp60/10, Hsp100 e sHsps (Borges & Ramos, 2005; Bozaykut et al, 2014; Brandvold & Morimoto, 2015; Smith et al, 2015; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011). A Tabela 1 apresenta as principais famílias de chaperonas moleculares e descreve algumas de suas características.

Tabela 1 – Famílias de chaperonas moleculares.

Nome genérico	MM (kDa)	Estado oligomérico	Comentários
Hsp90	~90	2-mer	Liga e hidrolisa ATP; possui grande número de proteínas-clientes; papel central em sinalização celular.
Hsp70	~70	1-mer	Liga e hidrolisa ATP; participa no enovelamento de proteínas nascentes; transporte através de membranas.
<i>J proteins</i>	~10-90	2-mer	Previne a agregação de proteínas; co-chaperona especificadora de função para a Hsp70; estimula a atividade ATPásica da Hsp70.
Hsp60/10	~60/~10	2x7-mer/7-mer	Forma uma câmara para o enovelamento de proteínas; atua na montagem de complexos e importação de proteínas para mitocôndria.
Hsp100	~100	6-mer	Possui atividade ATPásica; recupera proteínas de agregados; forma um complexo proteolítico.
sHsp	10 – 30	8 – 24-mers	Envolvida em termotolerância; liga-se a proteínas desenoveladas mantendo-as em um estado enovelável.

Fonte: Adaptado de (Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011), (Borges & Ramos, 2005) e (Brandvold & Morimoto, 2015).

Dentre as famílias de chaperonas moleculares descritas na Tabela 1, os sistemas da Hsp90 e Hsp70 interagem dinamicamente entre si e com uma ampla gama de proteínas auxiliares com o objetivo de manter a proteostase (Saibil, 2013). Estas proteínas auxiliares agem regulando e ajudando as chaperonas moleculares a executarem seus papéis celulares, sendo nomeadas co-chaperonas (Brandvold & Morimoto, 2015; Seraphim et al, 2014). Assim, os ciclos funcionais da Hsp70 e Hsp90, além de diversas co-chaperonas e outras proteínas, se associam transientemente de forma coordenada em um heterocomplexo chamado *foldossomo*, como mostrado na Figura 1 (Borges & Ramos, 2005; Cano et al, 2013; Seraphim et al, 2014; Wegele et al, 2004).

O início do ciclo funcional da Hsp70 acontece quando uma co-chaperona *J protein* se liga a superfícies hidrofóbicas de uma proteína-cliente desenovelada, enovelada incorretamente, ou parcialmente enovelada e a entrega para a Hsp70 no estado ligado a ATP, de baixa afinidade por proteínas-cliente. A ligação da *J protein* e da proteína-cliente estimula a hidrólise de ATP pela Hsp70, levando-a a um estado ligado a ADP e de alta afinidade pela proteína-cliente (da Silva & Borges, 2011; Kampinga & Craig, 2010). Neste estágio, as co-chaperonas Hip (*Hsp70-interacting protein*) ou SGT (*small glutamine-rich TPR protein*) podem se associar com o complexo Hsp70-ADP-proteína-cliente, estabilizando-o e mantendo a Hsp70 ligada a proteína-cliente (Angeletti et al, 2002; Borges & Ramos, 2005; Hohfeld et al, 1995; Li et al, 2013b). Os fatores de troca de nucleotídeo (GrpE, Hsp110, HspBP1 e BAG) interagem com a Hsp70 ligado ao ADP e estimulam a troca de ADP por ATP, reduzindo a afinidade da Hsp70 pela proteína-cliente e promovendo sua liberação (Borges & Ramos, 2005; da Silva & Borges, 2011).

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

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

O complexo entre a Hsp70 ligada a ATP, *J protein* e proteína-cliente, chamado de complexo precoce, pode seguir outro caminho, sendo direcionado para o sistema Hsp90 via Hop, uma co-chaperona adaptadora que conecta os sistemas Hsp70 e Hsp90 (Cano et al, 2013; Li et al, 2012; Wegele et al, 2004). É hipotetizado que a SGT possa realizar um papel análogo a Hop, uma vez que é um dímero e pode se ligar tanto a Hsp70 como a Hsp90 (Seraphim et al, 2014). Desta forma, o complexo Hsp90-ATP-Hop/SGT se associa ao complexo precoce, formando um complexo intermediário, onde ocorre a transferência da proteína-cliente da Hsp70 para a Hsp90 (Cano et al, 2013; Wegele et al, 2004). A ligação de co-chaperonas a Hsp90, como a Aha1 (alvo deste trabalho) e a p23, desmontam o complexo

intermediário e originam o complexo tardio, onde a Hsp70 é liberada juntamente com a *J protein* e a Hop/SGT (Cano et al, 2013; Li et al, 2013a). Como será abordado posteriormente, a Hsp90 possui um equilíbrio múltiplo de estados conformacionais, que é direcionado pela hidrólise de ATP e regulado pelas suas co-chaperonas (Krukenberg et al, 2011; Southworth & Agard, 2008). A co-chaperona Aha1 interage com a Hsp90 e a estabiliza no estado fechado, estimulando sua atividade ATPásica, ocorrendo posteriormente a abertura da Hsp90 ligado ao ADP e consequente liberação da proteína-cliente madura (Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010). Alternativamente, a p23 pode participar do complexo tardio com a Hsp90, estabilizando sua interação com a proteína-cliente e reduzindo sua atividade ATPásica (Dittmar et al, 1997; McLaughlin et al, 2006; Richter et al, 2004).

A inibição da Hsp90 leva a desmontagem do complexo intermediário e a co-chaperona CHIP (*carboxyl-terminus of Hsp70/Hsp90 interacting protein*) participa na ubiquitinação da proteína-cliente para posterior depuração pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Arndt et al, 2007; Biamonte et al, 2010).

Assim, as chaperonas moleculares atuam integradamente de forma promover o controle de qualidade proteico, que é essencial para a manutenção da proteostase. Apesar de diferentes chaperonas moleculares terem sido citadas, este trabalho objetivou o estudo do sistema Hsp90, mais especificamente o papel da co-chaperona Aha1 no ciclo conformacional/funcional da Hsp90. Portanto, esta chaperona molecular será abordada em maiores detalhes.

1.2 Hsp90

As Hsp90 são proteínas altamente conservadas, abundantes (~1-3% do total de proteínas solúveis em células não estressadas) e essenciais para a viabilidade em eucariotos (Eckl & Richter, 2013; Li & Buchner, 2013). As Hsp90 atuam facilitando a maturação da proteína-clientes até seu estado ativo, como quinases, fatores de transcrição como a p53, receptores de hormônios esteroides, e participa de processos de transdução de sinal, transporte intracelular, degradação de proteínas, estabilidade do genoma e processamento de RNA (Eckl & Richter, 2013; Flynn et al, 2015; Li & Buchner, 2013; Mayer & Le Breton, 2015; Zhao & Houry, 2005). Atualmente, mais de 600 proteínas foram apontadas como clientes da Hsp90 (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). As Hsp90 podem ainda mascarar efeitos de mutações em proteínas-cliente, permitindo o correto funcionamento destas por corrigir o enovelamento incorreto (Flynn et al, 2015). É importante mencionar que as Hsp90 são importantes na manutenção da estabilidade e função de proteínas-cliente envolvidas em

vias de transdução de sinal que levam à proliferação celular, regulação do ciclo celular, crescimento, diferenciação e apoptose. Entre as proteínas-cliente da Hsp90, são encontradas várias oncoproteínas, supressores tumorais e proteínas ligadas a fenótipos malignos, como a progressão tumoral, invasão, angiogênese e metástase (Hong et al, 2013; Mayer & Le Breton, 2015; Patki & Pawar, 2013; Young et al, 2001). Estas características fazem da Hsp90 um alvo potencial para terapias anticâncer e outras doenças, como as causadas por protozoários. Estas aplicações serão discutidas adiante no texto.

As Hsp90 possuem aproximadamente 82–96 kDa e formam homodímeros flexíveis, onde o principal contato intermolecular se situa nos 190 aminoácidos da região C-terminal (Li et al, 2012; Nemoto et al, 1995; Pearl & Prodromou, 2006; Wegele et al, 2004). Estruturalmente, estas proteínas se organizam em três domínios (Figura 2): um domínio N-terminal de aproximadamente 25 kDa (domínio N), um domínio intermediário (domínio M) de cerca de 35 kDa, e um domínio C-terminal (domínio C) (Krukenberg et al, 2011; Li et al, 2012). O domínio N possui um sítio de ligação ao ATP, com baixa atividade ATPásica, que é essencial para a funcionalidade *in vivo* da Hsp90 e que liga peptídeos e co-chaperonas (Ali et al, 2006; Krukenberg et al, 2011; Obermann et al, 1998; Panaretou et al, 1998; Pearl & Prodromou, 2006; Wegele et al, 2004), além de dimerizar durante o ciclo funcional das Hsp90 (Chadli et al, 2000). O domínio N é conectado, por meio de um *linker* carregado positivamente de tamanho variável, ao domínio M, que participa diretamente na hidrólise de ATP, além de interagir com proteínas-clientes e co-chaperonas (Hainzl et al, 2009; Meyer et al, 2003; Meyer et al, 2004), funcionando com uma região transdutora de sinal entre os domínios N e C (Soti et al, 2002; Wandinger et al, 2008). Ainda, o domínio M possui dois resíduos de aminoácidos conservados (Arg380 e Gln384, relativos à Hsp90 de levedura) localizados dentro de uma volta catalítica que interage com o fosfato γ do ATP ligado ao domínio N e que são essenciais para a atividade ATPásica da Hsp90 (Krukenberg et al, 2011; Meyer et al, 2003). O domínio C é responsável pela dimerização e possui sítios para interação com proteínas clientes. O motivo MEEVD na extremidade do C-terminal é responsável pela ligação de proteínas que contém o domínio *tetratricopeptide repeat* (TPR) (Krukenberg et al, 2011; Li et al, 2012; Onuoha et al, 2008).

Figura 2 – Estrutura da Hsp90. Estrutura tridimensional do dímero da Hsp90 interagindo com a p23 de levedura (omitida da estrutura) (PDB ID: 2CG9). Os domínios N, M e C de um dos protômeros estão indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. O outro protômero é mostrado em cinza.

Fonte: Adaptado de (Ali et al, 2006).

As Hsp90 são altamente flexíveis e dinâmicas, e mudanças conformacionais estão intrinsicamente ligadas a hidrólise de ATP (Krukenberg et al, 2011; Richter et al, 2008). Na ausência de nucleotídeos, as Hsp90 existem em um equilíbrio de múltiplos estados conformacionais e a ligação de nucleotídeos parece influenciar sutilmente este equilíbrio. Todavia, os nucleotídeos possuem papel importante no direcionamento do ciclo funcional das Hsp90 e na sua associação com co-chaperonas e proteínas-cliente (Mickler et al, 2009; Ratzke et al, 2012; Southworth & Agard, 2008). Ao menos três estados conformacionais são observados para as Hsp90: aberto, fechado e compacto (Figura 3). Na forma apo, esta chaperona molecular transita entre estados abertos e fechados, ao passo que na presença de ATP, o equilíbrio de conformações da Hsp90 tende ao estado fechado (Southworth & Agard, 2008). Na presença de ADP, as conformações das Hsp90 tendem a um estado compacto, que é visitado rapidamente e/ou é pouco populado (Mickler et al, 2009; Southworth & Agard, 2008). As Hsp90 de diferentes organismos apresentam respostas diferentes à adição de nucleotídeos, sendo os efeitos no seu equilíbrio conformacional mais pronunciados naqueles organismos cuja Hsp90 apresenta maior taxa de hidrólise de ATP, evidenciando que a mudança conformacional constitui a etapa limitante na atividade ATPásica (Southworth & Agard, 2008).

Figura 3 – Estados conformacionais das Hsp90. Na forma apo, as Hsp90 existem em um equilíbrio de múltiplos estados conformacionais (1 e 1b). Na presença de ATP, o equilíbrio conformacional das Hsp90 tende a ser deslocado para um estado fechado (2). Quando ocorre a hidrólise do ATP e as Hsp90 permanecem ligadas ao ADP, a conformação destas proteínas é deslocada para um estado compacto (3). Com a liberação deste nucleotídeo, as Hsp90 retornam ao equilíbrio de conformações inicial.

Fonte: Adaptado de (Southworth & Agard, 2008).

É importante ressaltar que as mudanças conformacionais das Hsp90 são estocásticas e a ligação de ATP facilita estas alterações, mas não prende as Hsp90 em um determinado estado, e a presença de proteínas-cliente e co-chaperonas podem regular o ciclo conformacional das Hsp90 (Mickler et al, 2009; Ratzke et al, 2012; Ratzke et al, 2014). Em adição, vários sítios de ligação a co-chaperonas, proteínas-cliente e de modificação pós-traducional podem ser criados na presença de múltiplas conformações em equilíbrio (Mayer & Le Breton, 2015; Ratzke et al, 2012).

A função das Hsp90 depende estritamente da sua baixa atividade ATPásica, que é regulada pela dimerização dos domínios N, pela sua própria sequência de aminoácidos, por co-chaperonas e por mudanças conformacionais que afetam a taxa de hidrólise de ATP (Ali et al, 2006; Cunningham et al, 2008; Hessling et al, 2009; Krukenberg et al, 2011; Meyer et al, 2003; Panaretou et al, 1998; Panaretou et al, 2002). Em levedura, um mutante da Hsp90 defectivo na hidrólise de ATP não substitui a proteína selvagem, sugerindo que o ciclo ATPásico regula a interação da Hsp90 com proteínas-cliente e é essencial para a sua função (Chadli et al, 2000; Obermann et al, 1998; Panaretou et al, 1998). Como abordado em parágrafos anteriores, a ligação de ATP no domínio N ocasiona mudanças conformacionais nas Hsp90, de forma que os domínios N de cada protômero se dimerizam, se aproximam do domínio M e a hidrólise do ATP acontece (Cunningham et al, 2008; Hessling et al, 2009; Meyer et al, 2003; Mickler et al, 2009; Wandinger et al, 2008). Durante o ciclo funcional das

Hsp90, ocorre a associação de proteínas-cliente e co-chaperonas com a Hsp90, formando heterocomplexos dinâmicos que resultam no enovelamento proteico, como apresentado na Figura 1 (Hawle et al, 2006; Krukenberg et al, 2011; Li et al, 2012; Pratt et al, 2008). O mecanismo deste ciclo parece universal à primeira vista, porém sutis diferenças existem entre vários organismos devido ao repertório de co-chaperonas, modificações pós-traducionais, pequenos ligantes e as próprias proteínas-cliente (Hainzl et al, 2009; Krukenberg et al, 2011; Li et al, 2012; Owen et al, 2002; Wandinger et al, 2008). Por exemplo, em protozoários as modificações pós-traducionais das Hsp90, como acetilação e fosforilação, parecem realizar um importante papel na regulação da montagem de complexos (Morales et al, 2010; Pallavi et al, 2010a). Assim, parasitos podem exibir diferenças no ciclo funcional das Hsp90 quando comparados com o sistema Hsp90 humano.

A associação de co-chaperonas é responsável por modular o ciclo funcional das Hsp90. Como exemplo, pode-se citar a Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*), uma proteína que possui 3 domínios TPR, um que reconhece o segmento EEVD da região C-terminal da Hsp90, outro que reconhece o mesmo motivo na porção C-terminal das Hsp70 citoplasmáticas e o terceiro com função estrutural (Onuoha et al, 2008; Scheufler et al, 2000); as imunofilinas FKBP506 e Cyp40, que interagem com as Hsp90 também via domínio TPR; e a CHIP, que é responsável por encaminhar proteínas ligadas ao complexo para a degradação, via ubiquitinação, quando o ciclo da Hsp90 é interrompido (Connell et al, 2001; Pearl & Prodromou, 2006). Duas co-chaperonas atuam controlando o ciclo funcional das Hsp90 através da regulação de sua atividade ATPásica: a p23 e a Aha1. A p23 é uma pequena proteína ácida que inibe a atividade ATPásica das Hsp90, prolongando o tempo de interação da Hsp90 com proteínas-cliente antes de dissociar deste (McLaughlin et al, 2006); já a co-chaperona Aha1 atua como um ativador da baixa atividade ATPásica das Hsp90 e é responsável por auxiliar na maturação de proteínas quinase (Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010). Embora todas as co-chaperonas tenham sua importância frente ao ciclo funcional das Hsp90, a estrutura e função da Aha1 serão abordadas adiante em maiores detalhes.

1.3 Aha1

A Aha1 foi inicialmente descoberta em *Saccharomyces cerevisiae* como uma proteína regulada positivamente por diversos tipos de estresse e como homóloga a proteína Hch1 (Panaretou et al, 2002). A Hch1 é uma proteína supressora da mutação E381K na Hsp82 (isoforma da Hsp90 de levedura induzida por choque-térmico), que torna esta chaperona

molecular termoinstável (Nathan et al, 1999). Apesar de homólogas, é proposto que a Aha1 e Hch1 regulem a Hsp90 de levedura por meio de mecanismos distintos (Armstrong et al, 2012; Horvat et al, 2014). A organização estrutural canônica da Aha1, observada nas proteínas de levedura e humana, consiste na presença do domínio N-terminal (Aha1N), similar a Hch1, e do domínio C-terminal (Aha1C), sendo ambos os domínios conectados por uma região desestruturada (Horvat et al, 2014; Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010). Por meio destes dois domínios, a Aha1 interage com a Hsp90 e estimula sua atividade ATPásica (Horvat et al, 2014; Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010). Um baixo grau de estimulação da Hsp90 é alcançado na presença do domínio Aha1N de levedura (Horvat et al, 2014; Meyer et al, 2004; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010) ou Aha1C de humano (Retzlaff et al, 2010), entretanto a estimulação máxima da Hsp90 apenas ocorre na presença da Aha1 completa (Harst et al, 2005; Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010).

O cerne da interação da Aha1 com a Hsp90 é composto pelo domínio Aha1N e domínio M da Hsp90 (Figura 4), onde alguns contatos hidrofóbicos estabilizados por uma rede de interações iônicas, interações mediadas por moléculas de água e ligações de hidrogênio direcionam a ligação entre estas duas proteínas (Meyer et al, 2004). Parte do mecanismo molecular onde reside a estimulação da Hsp90 vem do remodelamento de resíduos catalíticos da Hsp90 pelo motivo RKXX localizado no domínio Aha1N (Figura 4) (Horvat et al, 2014; Meyer et al, 2004). Este motivo é responsável por liberar o resíduo de Arg380 (relativo a Hsp90 de levedura) de interações intramoleculares no domínio M da Hsp90, permitindo seu direcionamento para os domínios N, onde seu papel catalítico é executado resultando na hidrólise do ATP (Meyer et al, 2004). Interessantemente, na presença da Aha1, a volta flexível cuja Arg380 se encontra na Hsp90 apresenta localização espacial similar na qual a Hsp90 assume no estado fechado e competente para a hidrólise de ATP (Krukenberg et al, 2011; Meyer et al, 2004). Ademais, a interação adicional do domínio Aha1C com os domínios N dimerizados da Hsp90 contribui para a estimulação da atividade ATPásica desta chaperona molecular (Koulov et al, 2010; Retzlaff et al, 2010).

Figura 4— Influência da interação da Aha1 na Hsp90 de levedura na estimulação da atividade ATPásica. O domínio N da Aha1 (azul) interage com o domínio M da Hsp90 (verde), compondo o cerne do complexo. Esta interação resulta no remodelamento de uma volta catalítica da Hsp90 contendo o resíduo Arg380, induzido pelo motivo RKXXK na Aha1. À direita, a estrutura desta região é destacada na Hsp90 nos estados aberto (cataliticamente inativo) e fechado (cataliticamente ativo), comparado ao na presença do domínio Aha1N. É proposto que o remodelamento desta região seja um dos fatores responsáveis pela estimulação da atividade ATPásica da Hsp90 pela Aha1.

Fonte: Adaptado de (Krukenberg et al, 2011).

A Aha1 compete pela ligação à Hsp90 com outras co-chaperonas na formação de complexos, se ligando preferencialmente a complexos tardios, como ilustrado na Figura 1 (Harst et al, 2005; Sun et al, 2012). Neste sentido, é importante ressaltar a potencialidade da Hsp90 realizar interações assimétricas, ou seja, cada um dos protômeros do dímero de Hsp90 pode interagir diferencialmente tanto com uma única co-chaperona, quanto com diferentes proteínas. Duas moléculas de Aha1 são capazes de se ligar a Hsp90, cada uma interagindo em interfaces opostas do dímero (Koulov et al, 2010; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010), entretanto a interação de apenas uma molécula de Aha1 é suficiente para estimular a Hsp90 (Retzlaff et al, 2010). Assim, uma molécula de Aha1 interage via domínio Aha1N com o domínio M de um dos protômeros da Hsp90, e a assimetria característica deste complexo permite que o domínio Aha1C interaja com o domínio N do outro protômero da Hsp90, estimulando a atividade ATPásica (Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010). Em trabalho recente, foi sugerido que quatro moléculas de Aha1 poderiam interagir por dímero de Hsp90 (Lepvriert et al, 2015) indicando sítios de interação localizados nos domínios N e M desta chaperona molecular.

Um mecanismo de estimulação da Hsp90 pela Aha1 é proposto em levedura (Figura 5) (Li et al, 2013a). Neste mecanismo, a conformação da Hsp90 sofre influência das diversas co-chaperonas que se associam e é direcionada por nucleotídeos (Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010). A Aha1 teria o papel de estabilizar a Hsp90 em um estado fechado e competente na hidrólise de ATP por meio da interação em dois sítios, os domínios Aha1N e Aha1C (Li et al, 2013a).

Figura 5 – Participação da Aha1 no ciclo funcional da Hsp90 de levedura. Inicialmente, a Hsp90 (verde) encontra-se na forma apo em um equilíbrio de conformações. A ligação de ATP nos domínios N do dímero de Hsp90, concomitante a interação com a Hop (também conhecida como Sti1, rosa) estabiliza a Hsp90 no estado aberto. A Hsp70 (azul), carregando uma proteína-cliente (laranja), forma um complexo com a Hsp90 e transfere a proteína-cliente. A ligação da Aha1 (magenta) à Hsp90 desloca a Hsp70 do complexo, acelerando a formação de um estado fechado 1 da Hsp90 e a hidrólise de ATP. Após a estabilização do estado fechado 1, mas antes de ocorrer a hidrólise de ATP, a p23 (amarelo) pode deslocar a Aha1 do complexo e estabilizar a Hsp90 no estado fechado 2, retardando a hidrólise de ATP. Quando o ATP é hidrolisado em ADP e P_i , a proteína-cliente é liberada enovelada, o complexo co-chaperona – Hsp90 é desmontado, e a Hsp90 retorna ao seu estado inicial.

Fonte: Adaptado de (Li et al, 2013a).

Funcionalmente, a Aha1 atua com a Hsp90 na maturação de proteínas quinase (Lotz et al, 2003; Sun et al, 2012) e receptores de hormônios corticóides (Harst et al, 2005). Outras proteínas, como enzimas envolvidas no metabolismo celular, proteínas mitocondriais, transportadores de membranas, proteínas do citoesqueleto, transporte vesicular e proteínas relacionadas com sistemas de degradação proteica, também são clientes da Aha1, embora não seja claro se as interações ocorrem de maneira direta ou por intermédio da Hsp90 (Sun et al, 2015). A Aha1 humana possui atividade chaperona intrínseca e atua no encaminhamento de proteínas desenoveladas ou mal enoveladas para a ubiquitinação, via CHIP, e posterior degradação (Tripathi et al, 2014). É importante salientar que modificações pós-traducionais tanto na Aha1 como na Hsp90 direcionam a interação entre estas proteínas (Dunn et al, 2015; Mollapour et al, 2014; Wang et al, 2012; Xu et al, 2012). Em humano, a fosforilação da Hsp90 em regiões distintas aumenta sua afinidade pela Aha1 (Wang et al, 2012; Xu et al, 2012); reciprocamente, a fosforilação da Aha1 aumenta sua afinidade pela Hsp90 (Dunn et al, 2015).

A interação da Aha1 com a Hsp90 diminui consideravelmente sua afinidade a inibidores (Zurawska et al, 2010). As modificações pós-traducionais desempenham importante papel na sensibilidade da Hsp90 frente a inibição. Como exemplos, a ligação da Aha1 e de inibidores à Hsp90 sumoilada é mutuamente exclusiva e a inibição da fosforilação da Aha1 sensibiliza células cancerígenas a inibidores de Hsp90 (Dunn et al, 2015; Mollapour et al, 2014). Um inibidor que se liga ao domínio C da Hsp90, a novobiocina, interfere na sua interação com a Aha1 e diminui a migração celular, ressaltando um potencial efeito antimetástase (Ghosh et al, 2015). Assim, a Aha1 possui um importante papel no ciclo funcional da Hsp90 e em mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças, como o câncer, e de resistência terapêutica.

Os dados existentes na literatura são, em sua maioria, relativos ao estudo da Aha1 em sistema humano e de levedura. Entretanto, proteínas Aha1 de parasitos possuem organização estrutural e mecanismos moleculares de interação com a Hsp90 que diverge do modelo proposto para a hAha1 e yAha1 (Chua et al, 2012; Singh et al, 2014). Em *Plasmodium falciparum*, duas proteínas Aha1 são encontradas: uma homóloga ao domínio Aha1C de levedura, e outra homóloga domínio Aha1N (Chua et al, 2012). De fato, esta última possui dois domínios e ambos são ortólogos ao domínio Aha1N de levedura (trabalho em progresso). Neste sistema, ambos os domínios interagem com o domínio M da Hsp90 de modo a estimular sua atividade ATPásica (Chua et al, 2012). Em *Entamoeba histolytica*, apenas uma proteína correspondente ao domínio Aha1C é encontrada e, mesmo na ausência do motivo RKXX, esta proteína é capaz de estimular a Hsp90 (Singh et al, 2014). Haja vista a organização estrutural distinta, co-chaperonas Aha1 de diferentes organismos são passíveis de interagir por mecanismos particulares com a Hsp90. Assim, a investigação destas proteínas é essencial para a compreensão do ciclo funcional da Hsp90 de protozoários.

1.4 Hsp90 como alvo terapêutico

1.4.1 Câncer

O desenvolvimento do câncer está associado a desregulação de diversas vias de transdução de sinais. Este efeito pode advir de mutações em proteínas regulatórias e as Hsp90 podem permitir que estas mutações se acumulem por estabilizar estas proteínas (Hong et al, 2013; Patki & Pawar, 2013). Alterações em diversos moduladores de vias de transdução de sinais são frequentemente associadas a fenótipos malignos e um considerável número desses moduladores são proteínas cliente da Hsp90 (Hong et al, 2013; Mahalingam et al, 2009). Desta forma, a Hsp90 é um fator comum a todas estas proteínas e vias as quais elas regulam,

tornando-se um bom alvo terapêutico e fazendo com que sua inibição afete diversas vias simultaneamente (Barrott & Haystead, 2013; Patki & Pawar, 2013). As Hsp90 auxiliam células de câncer a lidar com diversos tipos de estresse, como instabilidade genômica, estresse proteotóxico e aumento na demanda nutricional; além disso, participam ativamente na manutenção de algumas características de células cancerígenas, como a auto-suficiência em sinais de crescimento, evasão da apoptose, angiogênese e metástase (Barrott & Haystead, 2013; Hong et al, 2013; Miyata et al, 2013).

Mutações ou inibidores que afetam o ciclo funcional das Hsp90 podem levar à morte celular. Aproximadamente 44 compostos são inibidores da Hsp90, dentre os quais 17 estão em fase de testes clínicos e 2 finalizados; dentre estes 2, a geldanamicina (GA) é um inibidor específico da Hsp90, mas é altamente hepatotóxico, e a cisplatina se liga a diversos alvos celulares além da Hsp90 (Hong et al, 2013; Itoh et al, 1999; Patki & Pawar, 2013; Sancho-Martinez et al, 2012). É importante ressaltar que estes inibidores se ligam em diferentes sítios das Hsp90 como, por exemplo, a GA e análogos, que se ligam no sítio de ligação do ATP no domínio N (Stebbins et al, 1997); o domínio C das Hsp90 é sítio de interação com os inibidores novobiocina (Marcu et al, 2000) e cisplatina (Itoh et al, 1999). A ligação da GA nas Hsp90 direciona proteínas-cliente para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Biamonte et al, 2010; Krukenberg et al, 2011; Pratt et al, 2008). Células cancerígenas apresentam maior sensibilidade à inibição das Hsp90 do que as células saudáveis, matando seletivamente as células do câncer (Barrott & Haystead, 2013; Hong et al, 2013). As Hsp90 destas células possuem elevada atividade ATPásica e atuam em heterocomplexos (Barrott & Haystead, 2013; Patki & Pawar, 2013). Interessantemente, inibidores das Hsp90, como GA e análogos, apresentam afinidade 100 vezes superior quando as Hsp90 estão participando de heterocomplexos com a Hsp70, Hsp40, Hop e p23 (Kamal et al, 2003). O mesmo é válido para vários outros tipos de inibidores de Hsp90 (Powers & Workman, 2007; Soti et al, 2002). Apesar do exposto, a modulação da atividade ATPásica das Hsp90 através de interações com suas co-chaperonas pode também comprometer a resposta terapêutica (Holmes et al, 2008). Por exemplo, a ligação da co-chaperona Aha1 pode reverter o efeito inibitório causado pelo GA nas Hsp90 (Zurawska et al, 2010). Portanto, o efeito das co-chaperonas no mecanismo funcional das Hsp90 é essencial para a compreensão desta chaperona molecular, não apenas em células saudáveis, mas também no estado patológico.

1.4.2 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são compostas por um grupo de dezessete doenças causadas por agentes virais, bactérias, protozoários e helmintos, como por exemplo, a doença de chagas, dengue, esquistossomose, cisticercose, lepra, leishmaniose, entre outras (Canuto et al, 2015; Rafati et al, 2015). Embora possuam baixa mortalidade, a alta morbidade causada por estas doenças impacta na educação, gera deficiências físicas, interfere na saúde maternal durante e após a gravidez, reduz a produtividade de trabalhadores, promovendo um estigma social para pacientes infectados e prejudicando o desenvolvimento econômico de países (Canuto et al, 2015; Rafati et al, 2015; Seraphim et al, 2014). Estas doenças estão comumente associadas a pobreza, sendo encontradas nas Américas, África Subsaariana, Ásia, Oceania e Oriente Médio. Estimou-se que em 2008 o Brasil apresentou o maior número de doenças tropicais negligenciadas do ocidente, sendo comum entre milhões de pessoas que vivem em condições de pobreza (Hotez, 2014). O tratamento destas doenças é limitado pela alta toxicidade de algumas drogas empregadas, alto custo, necessidade de hospitalização, abandono da terapia pelos pacientes e a resistência frequentemente desenvolvida pelos agentes etiológicos (Canuto et al, 2015; Seraphim et al, 2014). Assim, a busca por novos fármacos mais efetivos ou por terapias combinadas se faz necessário, de modo a combater estas doenças. Neste sentido, as chaperonas moleculares tem se tornado bons alvos terapêuticos, especialmente visando o tratamento de doenças causadas por parasitos protozoários, haja vista a importância destas proteínas para a homeostase celular (Morales et al, 2010; Seraphim et al, 2014; Shonhai et al, 2011; Van der Ploeg et al, 1985). A chaperona molecular Hsp90 de protozoários do gênero *Leishmania*, causadores de uma das principais doenças tropicais negligenciadas, é um bom exemplo de chaperona molecular utilizada como alvo terapêutico (Seraphim et al, 2014; Silva et al, 2013). A leishmaniose, a importância das chaperonas moleculares no agente causador e a potencialidade da inibição da Hsp90 como estratégia de tratamento são descritas a seguir.

1.4.2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Três tipos de leishmaniose, definidos como visceral, cutânea e mucocutânea, ocorrem em 98 países e é estimado que surjam cerca de 900 mil a 1,6 milhões de novos casos ao ano (Alvar et al, 2012). Dentre estes, de 200 a 400 mil pertencem a forma visceral da doença, levando a óbito de 20 a 50 mil pessoas ao ano. Já os casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea perfazem, aproximadamente, de 700 mil a 1,2 milhões dos casos que,

embora não letais, resultam em estigma social para as pessoas infectadas (Alvar et al, 2012; Seraphim et al, 2014). É importante mencionar que cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea advêm do Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Algéria, Irã, Brasil e Peru; e 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Murray et al, 2005).

A *Leishmania spp* possui um ciclo de vida digenético, onde a primeira fase acontece em um hospedeiro invertebrado pecilotérmico, as moscas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito-palha; a segunda fase do ciclo ocorre em um hospedeiro mamífero homeotérmico (Beattie & Kaye, 2011; Dostalova & Volf, 2012). A transmissão da leishmaniose, ilustrada na Figura 6, ocorre quando uma fêmea do mosquito-palha pica o hospedeiro mamífero, infectando-o com promastigotas metacíclicos flagelados, que são fagocitados por células do sistema imune (Beattie & Kaye, 2011; Dostalova & Volf, 2012). O englobamento dos promastigotas metacíclicos por fagolisossomos induz, por alterações ambientais, como diminuição do pH, aumento da temperatura e disponibilidade nutricional, a diferenciação dos parasitos para formas amastigotas, ocorrendo a retração do flagelo e alterações na superfície celular (Beattie & Kaye, 2011). Os amastigotas são metabolicamente mais ativos e proliferam dentro do ambiente ácido do fagolisossomo (Beattie & Kaye, 2011; Leiriao et al, 2004). Quando uma fêmea de *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* ingere sangue contendo macrófagos contaminados pela forma amastigota de *Leishmania spp*, o parasito sofre uma nova transformação, induzida pela alteração da temperatura e pH, para a forma promastigota procíclica e, posteriormente, fatores adicionais levam o parasito a se transformar na forma infectiva promastigota metacíclica (Dostalova & Volf, 2012).

Além da atuação na homeostase proteica, as chaperonas moleculares estão envolvidas em diversos processos importantes para o desenvolvimento e patogênese de protozoários intracelulares (Shonhai et al, 2011). Os efeitos das alterações de pH, temperatura, estresse oxidativo e degradação enzimática enfrentados por estes parasitos são contrapostos pela expressão de chaperonas moleculares, que permitem a diferenciação celular e adaptação (Pallavi et al, 2010a; Shonhai et al, 2011). Considerando o ciclo de vida digenético, as mudanças da temperatura geram nestes protozoários uma resposta ao choque térmico, causando a síntese *de novo* de Hsps a fim de auxiliar na adaptação a um novo ambiente (Van der Ploeg et al, 1985). Algumas espécies de *Leishmania* sofrem transformação da forma promastigota para a amastigota somente sob influência da temperatura, embora isto não seja um mecanismo comum a todas as espécies. Algumas delas necessitam de fatores adicionais

para que a diferenciação de promastigota para amastigota ocorra (Shapira et al, 1988; Van der Ploeg et al, 1985). As Hsps também são induzidas quando células de *Leishmania spp* são submetidas a outras condições de estresse, como a privação nutricional, condição encontrada no mosquito-palha, e a exposição a ambientes oxidativos, como em células de mamífero (Shapira et al, 1988). As chaperonas moleculares ainda estão envolvidas na virulência de *L. donovani*, uma vez que perfis diferenciais de expressão destas proteínas são observados em cepas virulentas e atenuadas (Salotra et al, 1994; Shonhai et al, 2011). Ademais, estas proteínas parecem estar envolvidas com mecanismos de resistência terapêutica (Matrangolo et al, 2013).

Figura 6 – Esquema do ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania spp*. (1) Promastigotas metacíclicos infectam o hospedeiro mamífero através da picada da fêmea do mosquito-palha. (2) Estes promastigotas são fagocitados por células do sistema imune, como o macrófago. (3) Dentro dos fagolisossomos, a alteração de pH e temperatura induzem a diferenciação dos parasitos para a forma amastigota. Nesta etapa, as chaperonas moleculares Hsp70 e Hsp90 executam papel essencial na adaptação e diferenciação dos parasitos. Os amastigotas se reproduzem e (4) são transmitidos para o inseto vetor quando este pica o hospedeiro mamífero infectado. (5) No inseto, os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicos, seguido pela forma promastigota metacíclica, e a transmissão para um hospedeiro mamífero inicia um novo ciclo de vida.

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

O papel essencial das chaperonas moleculares Hsp90 e Hsp70 na proteostase reflete nos respectivos perfis de expressão, de forma que estas proteínas perfazem de 2,1% a 2,8% do total de proteínas expressas em promastigotas do gênero *Leishmania* (Brandau et al, 1995). O alto nível de expressão destas proteínas é observado em todas as fases de crescimento de promastigotas, com exceção da fase estacionária, onde ocorre a diminuição metabólica destes organismos (Shapira et al, 1988; Van der Ploeg et al, 1985). Na forma amastigota, as Hsp90 e Hsp70 permanecem com alto nível de expressão e se tornam fosforiladas após a adaptação

dos parasitos a uma nova temperatura (Bente et al, 2003; Morales et al, 2010). As chaperonas moleculares atuam disparando mudanças no desenvolvimento da *Leishmania*, atuando como sensores ambientais como, por exemplo, a Hsp90. A inibição das Hsp90 interfere no crescimento celular e diferenciação em *Leishmania donovani*, e nos últimos anos tem se tornado um alvo em potencial para tratamentos contra protozoários (Pallavi et al, 2010a; Wiesgigl & Clos, 2001a; Wiesgigl & Clos, 2001b). Apesar disso, estes parasitos são capazes de reverter os efeitos da inibição através da superexpressão das Hsp90 (Wiesgigl & Clos, 2001a). *Leishmania major* possui 19 genes que codificam para a Hsp90, o que permite a produção de altos níveis desta proteína e que são submetidos a regulação pós-transcricional (Folgueira & Requena, 2007; Ivens et al, 2005).

A interferência na homeostase das Hsp90 induz a síntese de proteínas associadas a forma amastigota e promove a transformação da forma promastigota para a amastigota (Bente et al, 2003; Shonhai et al, 2011; Wiesgigl & Clos, 2001a). A transformação de células de *Leishmania spp* pode ser realizada em culturas axênicas pela adição do inibidor específico das Hsp90, a GA, evidenciando a necessidade destas chaperonas moleculares na transformação destes parasitos (Wiesgigl & Clos, 2001a). É proposto que estresse causado às células de *Leishmania* pelo aumento da temperatura, quando estas são transmitidas do inseto vetor ao hospedeiro mamífero, atua de maneira análoga a inibição da Hsp90, levando a redistribuição das moléculas desta chaperona para atividades como estabilizar proteínas-cliente termolábeis, reduzindo o a população de Hsp90 livre e ativando os efeitos de transformação e adaptação destes protozoários (Shonhai et al, 2011; Wiesgigl & Clos, 2001a).

A Hsp90 de *L. braziliensis* (LbHsp90) é altamente conservada em comparação com outros tripanosomatídeos e humanos, possuindo sítios de ligação a proteínas-cliente por toda sua estrutura. A LbHsp90 apresenta baixa atividade ATPásica, que é inibida na presença do inibidor GA (Silva et al, 2013). Apesar da similaridade com proteínas ortólogas de humano e levedura, o grau de inibição da LbHsp90 por GA parece ser maior do que a determinada para a Hsp90 de levedura, e é comparável à proteína humana (Pallavi et al, 2010b). A LbHsp90 compartilha de diversas características estruturais e funcionais com Hsp90 ortólogas, entretanto seu domínio N possui particularidades que podem ser exploradas no sentido de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose (Silva et al, 2013).

Todos os aspectos abordados ressaltam a importância das Hsp90 para o ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania*, sugerindo-as como potenciais candidatas a alvos terapêuticos no tratamento da leishmaniose. Embora as Hsp90 de diferentes organismos, como, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* e *L. braziliensis* possuam propriedades semelhantes,

particularidades podem ser utilizadas a fim de inibir seletivamente as chaperonas moleculares destes organismos. Uma destas particularidades diz respeito às co-chaperonas da Hsp90, que possuem baixa similaridade entre si (Batista et al, 2015; Seraphim et al, 2013). Assim, diferenças entre complexos da Hsp90 com suas co-chaperonas, como a Aha1, poderiam ser explorados com o intuito de inibir seletivamente o ciclo funcional das Hsp90 de protozoários. Neste sentido, este trabalho visou caracterizar estruturalmente a co-chaperona Aha1 da Hsp90 de *L. braziliensis* e determinar seu mecanismo de ação na estimulação da atividade ATPásica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos

2.1.2 Gerais

Este trabalho objetivou caracterizar os aspectos estruturais da proteína Aha1 de *L. braziliensis* (LbAha1) e o mecanismo de interação envolvido na estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90.

2.1.3 Específicos

- Identificação e análise da sequência de aminoácidos da LbAha1;
- Produção da LbAha1 e de seus domínios N e C-terminais (LbAha1N e LbAha1C) recombinantes;
- Identificação da LbAha1 *in vivo* em extratos de *L. braziliensis*;
- Determinação dos elementos de estrutura secundária e terciária da LbAha1;
- Caracterização das propriedades hidrodinâmicas e estado oligomérico;
- Determinação da estrutura em baixa resolução da LbAha1 e a dinâmica dos seus domínios em solução;
- Análise da atividade chaperona intrínseca da LbAha1;
- Mapeamento da interação da LbAha1 com a LbHsp90;
- Investigação do papel dos domínios da LbAha1 no equilíbrio conformacional da LbHsp90;
- Analisar a funcionalidade da LbAha1 e domínios na estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90;

2.2 Material e métodos

2.2.1 Bioinformática e modelagem molecular

A busca da co-chaperona Aha1 no banco de dados de *L. braziliensis* foi realizada no TriTrypDB (Aslett et al, 2010) utilizando a sequência de aminoácidos da Aha1 humana como molde (hAha1 – GenPept ID: NP_036243) e o programa BLASTp do próprio banco de dados. A sequência de DNA codante para a LbAha1 (TriTryp ID: LBRM2903_180007300) foi obtida dentro do mesmo banco de dados. O programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi utilizado para a identificação de domínios conservados. O alinhamento global da sequência de aminoácidos da LbAha1 com proteínas ortólogas de humano e de levedura (yAha1 – NCBI GenPept ID: NP_010500) foi realizado pelos programas ClustalW2

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin et al, 2007; Thompson et al, 1994) e EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) (Rice et al, 2000). A predição de regiões desordenadas foi realizada pelo programa MeDor (Lieutaud et al, 2008) e potenciais sítios de fosforilação na LbAha1 foram preditos pelo programa NetPhos 2.0 (Blom et al, 1999).

A modelagem molecular dos domínios N- e C-terminal da LbAha1 foi realizada pelo programa Swiss-Model, utilizando como molde a estrutura cristalográfica do domínio N-terminal da Aha1 de levedura (22% de identidade com o domínio LbAha1N) (Meyer et al, 2004), e a estrutura em solução do domínio C-terminal da Aha1 humana (32% de identidade com o domínio LbAha1C) (PDB ID: 1X53), respectivamente. A qualidade estereoquímica dos modelos gerados foi avaliada pelos programas Procheck (Laskowski et al, 1993) e Verify 3D (Eisenberg et al, 1997).

2.2.2 Clonagem

A clonagem da sequência de DNA codante para a LbAha1 foi realizada conforme descrito em (Seraphim et al, 2013). Com o emprego do vetor pET28a::LbAha1 como molde, os DNAs codantes para os domínios da LbAha1 respectivos as regiões dos resíduos de aminoácidos 1-171 (domínio N-terminal da LbAha1, nomeado LbAha1N) e 172-351 (*linker* e domínio C-terminal da LbAha1, nomeado LbAha1C) foram amplificados por PCR. Os fragmentos de DNA, digeridos pelas enzimas de restrição *Nde* I e *Eco*R I, foram inseridos em vetor pET28a entre os sítios de restrição para as enzimas mencionadas. Todos os DNAs codantes para as proteínas-alvo foram clonados em fusão com uma sequência codante para 20 aminoácidos contendo 6 resíduos de histidina em tandem (His-tag).

2.2.3 Soluções-tampão

A Tabela 2 descreve a composição e a finalidade das soluções-tampão utilizadas.

Tabela 2 – Tampões utilizados nos procedimentos experimentais.

Solução-tampão	Composição	Finalidade
A	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM	Lise bacteriana e etapa lavagem na cromatografia de afinidade
B	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM	Eluição das proteínas na cromatografia de afinidade
C	Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM	Cromatografia de exclusão molecular
D	Fosfato de Sódio 25 mM (pH 7,0), NaCl 50 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM	Ensaio para caracterização biofísica e atividade chaperona
E	HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 5 mM	Ensaio de atividade ATPásica e de interação com a LbHsp90
F	Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 5 mM, Nonidet P-40 1%	Lise de parasitos
G	Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%	Experimentos de <i>Western blot</i>

Fonte: Autoria própria

2.2.4 Expressão e purificação

As proteínas LbAha1, LbAha1N, LbAha1C e LbHsp90M recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* cepa BL21(DE3). As células transformadas foram pré-inoculadas em 50 mL de meio de cultura LB e incubadas 16-18 horas a 37 °C. Posteriormente, uma cultura 5% (v/v) em 500 mL de meio LB foi realizada e incubada a 37 °C até o crescimento bacteriano atingir $OD_{600nm} \approx 0,6$. A temperatura de incubação foi reduzida para 30 °C e adicionou-se IPTG à cultura bacteriana até concentração final de 0,4 mM, a fim de induzir a expressão das proteínas recombinantes. Após 4 horas, as células foram coletadas por centrifugação (18.000 x g) e ressuspensas em tampão A (15 mL por L de cultura); foram adicionados lisozima (Sigma), na concentração final de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 5 U de DNase (Sigma), seguido de incubação em gelo por 30 minutos. As células foram rompidas por sonicação e o extrato celular centrifugado a 18.000 x g durante 30 minutos. O precipitado celular foi desprezado e as proteínas-alvo foram purificadas do sobrenadante.

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada pelos métodos cromatográficos de afinidade ao Ni^{2+} e de exclusão molecular preparativa. Na etapa cromatográfica de afinidade, o extrato celular foi aplicado na coluna HisTrap Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Lifesciences), seguido por uma etapa de lavagem de 10 volumes de coluna (VC) com o tampão A; após a lavagem, as proteínas foram eluídas em 2 VC de tampão B. Às proteínas eluídas, adicionou-se 1 U de trombina bovina (Sigma) para cada 5-10 mg de proteína e a mistura foi incubada por 12 horas a 4°C. A etapa cromatográfica de exclusão molecular preparativa foi realizada em coluna Superdex 200 16/60 ou 26/60 (GE Healthcare Lifesciences) equilibrada com o tampão C.

A LbHsp90 e a construção LbHsp90NM foram expressas e purificadas conforme descrito em (Silva et al, 2013).

2.2.5 Propriedades físico-químicas das proteínas

As propriedades físico-químicas teóricas das proteínas-alvo foram obtidas a partir das respectivas composições de aminoácidos pelo programa Sednterp. As propriedades são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas das proteínas-alvo.

Proteínas	ϵ_{280nm} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	MM (kDa)	Vbar (cm ³ g ⁻¹)	R ₀ (Å)	Nº aminoácidos
LbAha1 [#]	64.400	38	0,7340	23	354
LbAha1N [#]	27.960	19	0,7294	18	174
LbAha1C [#]	36.440	20	0,7376	18	184
LbHsp90 [§]	57.300	83	0,7342	29	724
LbHsp90NM [§]	48.820	62	0,7352	26	542
LbHsp90M [§]	31.400	33	0,7373	21	279

[#]Valores calculados considerando a proteína após clivagem do His₆-tag.

[§]Valores considerando a proteína com His₆-tag.

N.D.: não determinado.

Fonte: Autoria própria

2.2.6 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas por espectrofotometria UV/VIS. A absorbância das proteínas foi monitorada a 280 nm e a lei de Beer-Lambert foi empregada no cálculo da concentração molar (Equação 1).

$$\text{Equação 1} \quad A = C \times l \times \epsilon$$

Onde, A é a absorbância em unidades arbitrárias, C é a concentração molar, l é o caminho óptico em centímetros, e ϵ é o coeficiente de extinção molar em M⁻¹ cm⁻¹ (Tabela 2).

2.2.7 Cultivo de parasitos e Western blot

A identificação das proteínas Aha1 e Hsp90 foi realizada em *Leishmania* (V.) *braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Os parasitos foram cultivados a 26°C em meio M199 contendo 10% soro fetal bovino, 40 mM HEPES (pH 7,4), 0,36 mg mL⁻¹ NaHCO₃, 50 µg mL⁻¹ gentamicina, 1 µg mL⁻¹ biotina, 14 µg mL⁻¹ hipoxantina, 0,1 mM adenina, 6 µM biopterina e 250 µg mL⁻¹ hemina. Quando em fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 1x10⁷ parasitos/mL de cultura), a cultura foi dividida em dois frascos, cada um contendo 30 mL, que foram incubados a 26 °C e 37 °C. Após 2, 4 e 6 horas de incubação, alíquotas de 10 mL foram removidas, as células coletadas por centrifugação (800 x g por 10 minutos, 4°C) e lavadas três vezes com meio RPMI (Sigma). Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão F, contendo coquetel inibidor de proteases (Roche), e foram incubadas em gelo por 10 minutos. A lise dos parasitos ocorreu por três ciclos de congelamento em N₂ líquido/descongelamento em banho térmico a 37 °C. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos (4 °C) e o sobrenadante armazenado a -80°C.

Para os experimentos de Western blot, alíquotas dos lisados celulares foram submetidas a SDS-PAGE 15%; posteriormente, as proteínas foram transferidas para

membrana de nitrocelulose 0,22 μm . A membrana foi bloqueada por 1 hora (temperatura ambiente) com solução G contendo 5% (v/v) de leite em pó desnatado. Os anticorpos policlonais primários produzidos em coelho (anti-LbHsp90 – título 1:2.000; anti-LbAha1 – título 1:250; Célula B – Serviço de produção de anticorpos) e monoclonal primário produzido em camundongo (anti- α -tubulina – título 1:30.000; Sigma, clone B5-1-2) foram incubados com a membrana por 1 hora (temperatura ambiente). Após três lavagens da membrana com solução G, os anticorpos secundários, anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo (ambos, título 1:30.000, Sigma), conjugados com a fosfatase alcalina foram adicionados e incubados por 1 hora. A membrana foi lavada 3 vezes com tampão G e revelada com NBT e BCIP, do kit AP conjugate substrate (Bio-Rad).

2.2.8 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

Os experimentos de CD foram realizados em espectropolarímetro J-815 (JASCO) acoplado com sistema Peltier para controle de temperatura. Os espectros da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C foram obtidos com concentrações de proteínas de 0,15 mg mL^{-1} a 0,68 mg mL^{-1} em tampão D, utilizando cubetas de 0,02 cm e 0,1 cm de caminho óptico. Os experimentos de estabilidade térmica foram realizados de 20 °C a 90 °C em cubeta de 0,1 cm contendo 0,14 e 0,25 mg mL^{-1} de LbAha1N ou LbAha1C, e 0,5 mg mL^{-1} de LbAha1, todas preparadas em tampão D. A taxa de aquecimento utilizada foi de 1 °C/minuto e o sinal de CD a 220 nm foi monitorado a cada 0,5 °C.

Todos os dados de CD foram normalizados para elipticidade molar residual média (EMR), conforme descrito por (Corrêa & Ramos, 2009) e pela equação 2.

$$\text{Equação 2} \quad \text{EMR} = \frac{\theta \times 100 \times MM}{n \times c \times l}$$

Onde, θ é o sinal de CD em graus, MM é a massa molecular em kDa, n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, l é o caminho óptico em cm, e c é a concentração de proteínas em mg mL^{-1} .

O ajuste dos dados de desenovelamento térmico foi realizado com o uso da função de Boltzmann, no programa Origin. Assim, o valor de T_m (temperatura média da transição) foi determinado.

2.2.9 Espectroscopia de fluorescência

Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência, os resíduos de Trp foram utilizados como sondas intrínsecas. Os espectros foram coletados no equipamento F-4500 (Hitachi) e as

proteínas preparadas na concentração de 5 μM em tampão D. As amostras, em cubeta de 1,0 cm x 0,2 cm (0,5 cm de caminho óptico), foram excitadas a 295 nm e os espectros de emissão de fluorescência foram coletados de 300 nm a 420 nm, com intervalos de 1 em 1 nm. Após a coleta, os dados foram tratados para a obtenção do centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$), conforme a equação 3, abaixo:

Equação 3
$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum F_i \lambda_i}{\sum F_i}$$

Onde, F_i são as intensidades de fluorescência e λ_i os respectivos comprimentos de onda.

Os experimentos de desenovelamento químico foram realizados com os mesmos parâmetros experimentais descritos acima. Os espectros de fluorescência das proteínas, tituladas com concentrações crescentes de GndCl, foram tratados para $\langle \lambda \rangle$ utilizando a faixa de 310 a 420 nm. Os ajustes dos dados foram realizados pelo programa Origin, com as funções de Boltzmann, para uma transição, ou Double Boltzmann, no caso de duas transições. A partir destes ajustes, o valor de C_m , isto é, a concentração de agente desnaturante no ponto médio de uma transição, foi obtida.

2.2.10 Cromatografia de exclusão molecular analítica

As cromatografias de exclusão molecular analítica (aSEC) foram realizadas em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Lifesciences), equilibrada com o tampão D contendo NaCl 150 mM, e com o equipamento Äktä Prime (GE Healthcare Lifesciences). Foram utilizados 25 μM de LbAha1, LbAha1N e LbAha1C, e os volumes de eluição das proteínas foram monitorados por absorbância a 280 nm. Como padrão, proteínas globulares com respectivos raios de Stokes (R_s) e MM conhecidas foram utilizadas na concentração de, aproximadamente, 1 mg mL⁻¹ (apoferritina, 61 Å; γ -globulina, 48 Å; albumina sérica bovina, 36 Å; anidrase carbônica, 24 Å; e citocromo C, 17 Å – todas as proteínas adquiridas na Sigma). O volume morto da coluna foi determinado pela corrida de blue dextran 1 mg mL⁻¹ (Sigma).

Os volumes de eluição das proteínas foram utilizados para os cálculos dos respectivos coeficientes de partição (K_{av}), segundo a equação abaixo:

Equação 4
$$K_{av} = \frac{V_t - V_e}{V_t - V_0}$$

na qual V_t é o volume total da coluna, V_e é o volume de eluição da proteína e V_0 é o volume morto da coluna, todos em mL. Um gráfico de R_s em função de $-(\log K_{av})^{1/2}$ foi construído e

os respectivos R_s da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C foram obtidos empregando-se a equação da reta e os coeficientes angular e linear resultantes do ajuste linear das proteínas-padrão, feito pelo programa Origin.

2.2.11 Ultracentrifugação analítica

Experimentos de velocidade de sedimentação foram realizados em uma ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman) equipada com o rotor AN-60 Ti. As corridas foram realizadas a 30.000 rpm, na temperatura de 20 °C. Foram utilizadas concentrações de proteína de 0,3 a 1,0 mg mL⁻¹ em tampão D, e os perfis de sedimentação foram monitorados em 286 nm. Os dados foram analisados pelo programa Sedfit 12.2 (Schuck, 2000) e a razão friccional (f/f_0) foi utilizada como parâmetro de regularização. Os valores de s foram normalizados para condições padrão, $s_{20,w}$ (coeficiente de sedimentação em água, a 20 °C), utilizando a densidade do tampão (1,0037 g mL⁻¹), viscosidade (0,00102 Poise) e V_{bar} da LbAha1 (0,7346 cm³ g⁻¹). Todos estes valores foram estimados pelo programa Sednterp (http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Main_Page). O valor de $s_{20,w}^0$ (coeficiente de sedimentação em condições padrão para diluição infinita) da LbAha1 foi estimado através da regressão linear do gráfico de $s_{20,w}$ em função das concentrações de proteína utilizando o programa Origin.

2.2.12 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

As coletas de dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas na linha SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPEM, Campinas-SP). As medidas foram realizadas com feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1,488$ Å) e distância detector-amostra de, aproximadamente, 1000 mm. As amostras foram medidas em célula com janela de mica com 1 mm de caminho óptico. Os padrões de espalhamento foram coletados por um detector MarCCD durante 300 segundos para a LbAha1, e 10 e 30 segundos para a LbAha1N e LbAha1C. As concentrações de proteínas utilizadas foram 1,1 mg mL⁻¹, 1,9 mg mL⁻¹ e 3,2 mg mL⁻¹ para a LbAha1; 1,0 mg mL⁻¹, 1,5 mg mL⁻¹ e 2 mg mL⁻¹ para a LbAha1N e LbAha1C. Todas as medidas foram realizadas com as proteínas preparadas em tampão D, cujo perfil de espalhamento foi subtraído das amostras.

As curvas de SAXS foram normalizadas pelas concentrações de proteína e a qualidade dos dados foi avaliada manualmente e pelo programa Primus (Konarev et al, 2003); as MMs foram estimadas pelo programa SAXSMoW (Fischer et al, 2010). Para o cálculo das funções de distribuição das distâncias da partícula (PDDF) o programa GNOM foi utilizado (Svergun, 1992). Os modelos *ab initio* das proteínas foram gerados pelo programa DAMMIN (Svergun,

1999), que usa o método de *simulated annealing* para posicionar átomos-modelo espacialmente de forma a refletir a curva experimental de SAXS. Foram gerados de 10 a 15 modelos para cada proteína e os mais prováveis foram obtidos com o uso do pacote de programas DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003). Para a análise da dinâmica conformacional da LbAha1, o método de *Ensemble Optimization* (EOM) foi implementado (Bernado et al, 2007). A partir das estruturas tridimensionais dos domínios N- e C-terminal da LbAha1, obtidos por modelagem molecular, foram gerados 10.000 confôrmeros pelo programa RanCh (*Random Chain*). Em um segundo momento, o programa GAJOE (*Genetic Algorithm Judging Optimization Ensemble*) selecionou o conjunto de confôrmeros cuja curva teórica de SAXS foi consistente com a curva experimental de SAXS.

Para validação das estruturas em baixa resolução, as propriedades hidrodinâmicas do modelo *ab initio* final, gerado pelo programa DAMAVER, e dos confôrmeros selecionados pelo EOM, foram analisados pelo programa Hydropro (Ortega et al, 2011).

2.2.13 Crosslinking

Os experimentos de *crosslinking* foram realizados em tampão E contendo 25 μM de LbAha1, LbAha1N ou LbAha1C, e a mistura de LbAha1N e LbAha1C a 25 μM cada. O agente *crosslinker* bifuncional DSS (Thermo) foi utilizado na concentração de 1,25 mM e todas as reações ocorreram com concentração final de 1,25% (v/v) de DMSO. Após 30 minutos de incubação das proteínas com o DSS (temperatura ambiente), adicionou-se a solução Tris-HCl (pH 8,0) até a concentração final de 1 mM e a mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente com a finalidade de interromper a reação. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

2.2.14 Calorimetria de titulação isotérmica

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados no equipamento iTC200 (GE Healthcare Lifesciences). As proteínas utilizadas foram dialisadas por 10 a 12 horas em tampão E. A LbHsp90 e construções, LbHsp90NM e LbHsp90M, foram sempre utilizadas na célula em concentrações de 10 a 20 μM de monômeros; a LbAha1, LbAha1N e LbAha1C foram empregadas na seringa em concentrações de 130 a 300 μM . O regime de injeção variou de 1,65 μL a 3,00 μL , dependendo da intensidade de sinal observado nas titulações. Os experimentos de interação da LbHsp90 com a LbAha1 foram realizados nas temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C, enquanto os demais experimentos foram realizados em 20 °C.

Na análise dos dados, o calor da interação (Q) foi determinado a partir da integração das áreas dos picos a cada injeção ($\mu\text{cal seg}^{-1}$), as quais são proporcionais ao volume da célula (V_{cel}), concentração de ligante ($[L]$) e ΔH . O calor de diluição do titulante e do titulado foi calculado a partir da linha de base ao final da titulação, em condições onde todos os sítios foram saturados, e foi subtraído do calor de interação determinado. O Q obtido por mol de ligante injetado foi analisado em função da razão molar entre titulante/titulado e os valores de ΔH , n e K_A foram estimados pelo ajuste dos dados, realizado com auxílio do programa Origin Microcal segundo a equação abaixo (Equação 5):

$$\text{Equação 5} \quad Q = \left(\frac{n[M]\Delta H V_{cel}}{2} \right) \left\{ 1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} - \sqrt{\left[\left(1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} \right)^2 - \frac{4[L]}{(n[M])}} \right]} \right\}$$

Onde, $[M]$ é a concentração molar do titulado e ΔH é a variação de entalpia, em cal mol^{-1} . Neste procedimento, o programa Origin Microcal supôs, inicialmente, valores de n , K_A e ΔH , calculando a variação do calor (ΔQ) em cada injeção e comparando-os com o calor medido experimentalmente em cada injeção. Os valores de n , K_A e ΔH foram otimizados progressivamente até melhoras significativas nestes valores não fossem mais observadas (Leavitt & Freire, 2001; Pierce et al, 1999).

A variação de entropia aparente (ΔS_{app}) e variação de energia livre de Gibbs aparente (ΔG_{app}) foram calculadas segundo a equação 6.

$$\text{Equação 6} \quad \Delta G_{app} = -RT \ln K_A = \Delta H_{app} - T\Delta S_{app}$$

Onde, R é a constante dos gases em $\text{cal K}^{-1} \text{M}^{-1}$, e T é a temperatura absoluta em K. A variação da capacidade calorífica aparente da interação ($\Delta C_{p,app}$) foi calculada pela dependência da ΔH_{app} em função da temperatura, segundo a equação 7.

$$\text{Equação 7} \quad \Delta C_{p,app} = \frac{\Delta \Delta H_{app}}{\Delta T}$$

2.2.15 Atividade ATPásica

A estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 foi investigada pelo monitoramento da concentração de Pi liberado a partir da hidrólise do ATP pela LbHsp90 em concentrações crescente da LbAha1 e domínios. A quantificação de Pi foi realizada com o kit EnzChek (Life Technologies), como descrito em (Seraphim et al, 2013; Silva et al, 2013). Este kit se baseia na conversão do reagente MESG, que possui máximo de absorbância em 330 nm, nos produtos ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercaptop-7-metilpurina. Este último possui máximo de

absorção em 360 nm e a reação de conversão do MESG ocorre na presença de Pi e da enzima PNP (purina nucleosídeo fosforilase). Os experimentos foram realizados em tampão E contendo 2 mM MgCl₂, e a concentração final de ATP foi 0,5 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C e as amostras foram coletadas de modo que a leitura do sinal em 360 nm ficasse entre os limites de 0,2 e 0,8 unidades de absorbância. Para o cálculo da concentração final de Pi liberado, uma curva padrão de 0 a 100 µM de Pi foi construída, conforme protocolo do fornecedor.

Os dados foram tratados para velocidade inicial (V_0) e plotados graficamente em função da concentração de LbAha1. A curva resultante foi ajustada com a função de Hill com auxilia do programa Origin (Equação 8).

Equação 8
$$y = V_{max} \left(\frac{x^n}{k^n + x^n} \right)$$

Onde y é a fração de saturação, V_{max} é a velocidade máxima, x é a concentração de LbAha1, k é a constante de Michaelis-Menten e n é o número de sítios cooperativos, ou coeficiente de Hill.

2.2.16 Atividade chaperona

Os ensaios de atividade chaperona foram realizados em tampão D com 1, 5 e 10 µM das proteínas LbAha1, LbAha1N e LbAha1C. As proteínas-clientes, luciferase de *Photinus pyralis* (Sigma) e malato desidrogenase (MDH) de coração de *Sus scrofa* (Sigma), foram empregadas na concentração final de 1 µM. Estes experimentos foram executados em placas de 96 poços UV-Star Half-area (Greiner), à 42 °C, e a agregação de proteínas foi monitorada a 320 nm em leitor de placas MultiskanGO (Thermo). Controles contendo a LbAha1 e domínios apenas, nas concentrações indicadas, foram realizados para verificar a agregação destas proteínas.

2.3 Resultados

2.3.1 Análises bioinformáticas e modelagem molecular

Na busca de co-chaperonas da Hsp90 de *L. braziliensis* no banco de dados TriTrypBD, foi encontrada uma sequência ortóloga da co-chaperona Aha1 humana, nomeada LbAha1. O programa SMART identificou na sequência da proteína uma organização de dois domínios (Figura 7, sublinhados) separados por uma região de baixa complexidade (Figura 7, retângulo). Estes domínios foram denominados LbAha1N e LbAha1C (Figura 4A). A análise

Para auxiliar na interpretação dos dados deste trabalho, foram gerados modelos por homologia dos domínios da LbAha1 (Figura 8), conforme descrito na seção Material e Métodos. A qualidade estereoquímica dos modelos foi avaliada pelos programas Procheck (Laskowski et al, 1993), que mostrou que 100% e mais de 97% dos resíduos de aminoácidos dos domínios Aha1N e Aha1C, respectivamente, se encontraram em regiões favoráveis ou permitidas no gráfico de Ramachandran, e Verify 3D (Eisenberg et al, 1997), que resultou em valores de mais de 91% e 100% dos resíduos com índice médio 3D-1D favoráveis para a Aha1N e Aha1C, respectivamente. Assim, apesar da baixa identidade entre a LbAha1 e os moldes utilizados, os modelos foram gerados com qualidade adequada para a identificação da posição relativa dos resíduos de Trp e, posteriormente, para simulações baseadas em dados de SAXS.

Figura 8 – Estruturas 3D dos domínios da LbAha1. O modelo apresentado foi obtido através da estratégia de modelagem molecular por homologia, utilizando como molde o domínio Aha1N da yaha1 (Meyer et al, 2003) e o domínio Aha1C da hAha1 (PDB ID: 1X53). Os resíduos de triptofano estão destacados em vermelho e as regiões sem estrutura definida estão representadas pela linha tracejada. Entre os domínios da Lbaha1, situa-se o *linker*. Os resíduos de triptofano ausentes nas estruturas 3D são representados por círculo com a representação W.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

Concluindo, a LbAha1 é pouco conservada, mas apresentou a organização canônica reportada para as proteínas Aha1, com dois domínios conectados por um *linker* flexível.

2.3.2 Identificação da LbAha1 in vivo

A identificação da proteína LbAha1 em células de *L. braziliensis* foi realizada através de experimentos de *Western blot*. Para isto, foram empregados anticorpos policlonais produzidos contra a proteína recombinante, cuja obtenção será abordada adiante. O mesmo procedimento foi realizado para a chaperona molecular LbHsp90.

Extratos celulares de culturas axênicas de *L. braziliensis*, incubadas em vários tempos a 26 °C e 37 °C, foram submetidos a experimentos de *Western blot*. Bandas referentes a LbAha1 (38 kDa) e LbHsp90 (90 kDa) foram visualizadas em todos os tempos e temperaturas testados (Figura 9). Não foi possível estabelecer os efeitos da temperatura e tempo na expressão da LbAha1 e LbHsp90, uma vez que a α -tubulina foi empregada como controle interno e, posteriormente, sugeriu-se que variações na sua expressão ocorrem em função da temperatura (Ramirez et al, 2013). Nos controles de MM, a LbHsp90 recombinante apresentou MM superior que a LbHsp90 endógena devido a presença do His-tag no N-terminal. Por outro lado, a LbAha1 recombinante migrou com MM levemente inferior do que a LbAha1 endógena e especulou-se que este evento poderia decorrer de modificações pós-traducionais. Utilizando a ferramenta NetPhos 2.0 (Blom et al, 1999), 23 potenciais sítios de fosforilação foram preditos na sequência de aminoácidos da LbAha1. Portanto, a LbAha1 e LbHsp90 foram identificadas como proteínas cognatas em *L. braziliensis* e especulou-se que modificações pós-traducionais possam ocorrer na LbAha1.

Figura 9 – Identificação *in vivo* da LbAha1. A LbAha1 e LbHsp90 foram identificadas em culturas de *L. braziliensis* crescidas a 26 °C e 37 °C, em diferentes intervalos de tempo, por experimentos de *Western blot*. A α -tubulina foi utilizada como controle interno e as proteínas recombinantes como controle de MM.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

2.3.3 Obtenção da LbAha1 e domínios recombinantes

Após a confirmação da expressão da LbAha1 *in vivo*, o estudo prosseguiu para a caracterização *in vitro* desta co-chaperona. Baseado na identificação de domínios previamente apresentada, três construções foram feitas para a LbAha1: 1) LbAha1 intacta, 2) o domínio LbAha1N, e 3) o domínio LbAha1C contendo o *linker* (Figura 10A).

Figura 10 – Obtenção da LbAha1 e construções dos domínios recombinantes. A) Esquema das construções da LbAha1 utilizadas neste trabalho. Os domínios LbAha1N (vermelho), LbAha1C (verde) e o *linker* (azul) estão representados. B) SDS-PAGE 15% contendo as proteínas recombinantes purificadas e com His-tag removida. As três construções foram obtidas com pureza final >95% (análise em gel corado com Coomassie Brilliant Blue).

Fonte: Autoria própria.

Conforme descrito na seção Material e Métodos, a LbAha1 e domínios foram expressos em *E. coli* e purificados até a homogeneidade pelas técnicas cromatográficas de afinidade e de exclusão molecular. Entre as duas etapas cromatográficas, a His-tag fusionada às proteínas foi removida pela incubação com trombina. Todas as proteínas foram obtidas com pureza >95% (Figura 10B).

2.3.4 Caracterização da estrutura secundária e terciária das proteínas recombinantes

Com o intuito de verificar se as proteínas recombinantes foram obtidas enoveladas e caracterizar os elementos estruturais da LbAha1, foram realizados experimentos de CD e fluorescência intrínseca do triptofano.

O espectro de CD mostrou que a LbAha1, LbAha1N e LbAha1C foram obtidas com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α e folha β (Figura 11A). A deconvolução dos espectros (Tabela 4) indicou o predomínio de estrutura secundária tipo folha β para as construções LbAha1 e LbAha1C, ao passo que a construção LbAha1N apresentou predominância de hélices α . Adicionalmente, o somatório dos espectros da LbAha1N e da LbAha1C apresentou formato muito similar ao espectro da LbAha1 intacta (Figura 11B).

Figura 11 – Caracterização da estrutura secundária LbAha1. **A)** Espectros de CD da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C mostrando que as proteínas recombinantes foram obtidas com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α e folha β . **B)** Sobreposição dos espectros normalizados da LbAha1 intacta e da somatória LbAha1N + LbAha1C. A similaridade entre ambos sugeriu que os domínios da LbAha1 enovelam-se independentemente.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Propriedades estruturais e espectroscópicas da LbAha1.

Técnicas	Propriedades	Proteínas		
		LbAha1	LbAha1N	LbAha1C
CD	Hélice α (%)	17 [☆]	38	13
	Folha β (%)	31 [☆]	21	34
Fluorescência	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	340 $\pm$ 1	333 $\pm$ 1	340 $\pm$ 1
	$\lambda_{\text{máx.}}$ 6M GndCl (nm)	350 $\pm$ 1	350 $\pm$ 1	352 $\pm$ 1
	$\langle \lambda \rangle$ (nm)	347,4 $\pm$ 0,1	343,3 $\pm$ 0,1	348,5 $\pm$ 0,1
	$\langle \lambda \rangle$ 6M GndCl (nm)	358,7 $\pm$ 0,1	358,1 $\pm$ 0,1	359,4 $\pm$ 0,1

Fonte: [☆] Adaptado de (Seraphim et al, 2013) / Autoria própria.

A LbAha1 possui 9 resíduos de triptofano, onde 4 deles se encontram no domínio LbAha1N e 5 no domínio LbAha1C. Estes resíduos foram utilizados como sondas de estrutura terciária local nos experimentos de fluorescência (Figura 12A). Em condição não

desnaturante, todas as proteínas apresentaram valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$ menores que os observados em condições desnaturantes (Tabela 4), indicando que os Trps se localizavam em ambientes completamente ou parcialmente protegidos do solvente. Na comparação de espectros normalizados, a soma das curvas de fluorescência das construções dos domínios reconstituiu parcialmente o espectro da LbAha1 intacta, apresentando $\lambda_{\text{máx}} = 338 \text{ nm}$ e $\langle\lambda\rangle = 344,5 \pm 0,1 \text{ nm}$ (Figura 12B). Adicionalmente, quando a construção LbAha1N foi excitada a 280 nm observou-se fluorescência dos resíduos de Tyr, ao passo que na LbAha1 intacta estes resíduos foram suprimidos (dados não mostrados).

Figura 12 – Caracterização da estrutura terciária da LbAha1. A) Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C, excitados a 295 nm, em condição nativa e desnaturante. O deslocamento dos espectros das proteínas nativas quando na presença de 6 M de GndCl indicou que as proteínas foram obtidas com estrutura terciária. B) Sobreposição das curvas normalizadas da LbAha1 e da somatória LbAha1N + LbAha1C. A divergência dos espectros sugeriu que a conexão entre os domínios, via *linker*, interfere na estrutura terciária de um ou outro domínio da LbAha1.

Fonte: Autoria própria.

Em conjunto, estes dados mostraram que a LbAha1 e suas construções, LbAha1N e LbAha1C, foram obtidas enoveladas. Ainda, a conexão entre os domínios, via *linker*, pareceram não ter interferido na estrutura secundária da LbAha1, mas permitiu especular que a estrutura terciária possa ter sofrido interferência.

2.3.5 Investigação da estabilidade térmica e química da LbAha1

Ensaio de estabilidade térmica e química da LbAha1 foram realizados com o objetivo de compreender sua organização estrutural. Inicialmente, o desenovelamento térmico da LbAha1 e das construções dos domínios foi monitorado pelo sinal de CD a 220 nm (Figura 13, Tabela 5). A LbAha1 e a LbAha1N desenovelaram por meio de uma única transição no intervalo entre 50 °C e 60 °C, com $T_m = 55,2 \pm 0,5 \text{ °C}$ e $T_m = 54,1 \pm 0,5 \text{ °C}$, respectivamente. A construção LbAha1C, embora também tenha desenovelado por uma única transição, esta ocorreu no intervalo de 58°C e 68 °C, com $T_m = 63,1 \pm 0,5 \text{ °C}$.

Figura 13 – Estabilidade térmica da LbAha1. Desenovelamento térmico da LbAha1 e das construções dos domínios monitorado pelo sinal de CD a 220 nm. As três proteínas desenovelaram através de uma única transição, com T_m de $55,2 \pm 0,5$ °C para a LbAha1, $54,1 \pm 0,5$ °C para a LbAha1N e $63,1 \pm 0,5$ °C para a LbAha1C.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 – Parâmetros de estabilidade térmica e química da LbAha1.

Técnicas	Parâmetros	Proteínas		
		LbAha1	LbAha1N	LbAha1C
CD	T_m (°C)	$55,2 \pm 0,5$	$54,1 \pm 0,5$	$63,1 \pm 0,5$
Fluorescência	Cm_1^a transição (M de GndCl)	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$
	Cm_2^a transição (M de GndCl)	$2,8 \pm 0,1$	N.A.	N.A.

Fonte: Autoria própria.

A estabilidade química da LbAha1 foi monitorada por fluorescência intrínseca do triptofano em concentrações crescentes de GndCl. A curva de desenovelamento da LbAha1 apresentou duas transições (Figura 14A): uma discreta, com $Cm = 1,7 \pm 0,2$ M de GndCl, e outra mais proeminente, com $Cm = 2,8 \pm 0,1$ M de GndCl (Tabela 5). Para verificar se cada transição seria referente a um domínio da LbAha1, ensaios de estabilidade química foram executados com as construções dos domínios da proteína (Figura 14B). Em ambas as construções apenas uma transição foi observada, com $Cm = 1,9 \pm 0,1$ M de GndCl para a LbAha1N, e $Cm = 2,4 \pm 0,1$ M de GndCl para a LbAha1C (Tabela 5).

Os dados apresentados sugeriram que a LbAha1 desenovelou-se quimicamente por um mecanismo sequencial, onde no início há perda de estrutura no domínio N-terminal e, posteriormente, no domínio C-terminal.

Figura 14 – Estabilidade química da LbAha1. A) Perfil de desenovelamento químico da LbAha1, monitorado por fluorescência. A primeira transição apresentou $C_m = 1,7 \pm 0,2$ M de GndCl e a segunda transição $C_m = 2,8 \pm 0,1$ M de GndCl. B) Desenovelamento químico das construções dos domínios da LbAha1 monitorado por fluorescência. A LbAha1N e LbAha1C apresentaram, respectivamente, $C_m = 1,9 \pm 0,1$ M de GndCl e $C_m = 2,4 \pm 0,1$ M de GndCl. Estes dados indicaram que o desenovelamento da LbAha1 ocorreu, inicialmente, pelo domínio N-terminal e, posteriormente, pelo domínio C-terminal.

Fonte: Autoria própria.

2.3.6 Caracterização hidrodinâmica e estado oligomérico

A determinação das propriedades hidrodinâmicas da LbAha1 e a investigação do estado oligomérico foi realizada através das técnicas de aSEC e AUC. Nos experimentos de aSEC, a LbAha1 eluiu com 14,8 mL, próxima a proteína padrão de 67 kDa, enquanto a LbAha1N e LbAha1C eluíram, respectivamente, com 16,6 e 16,4 mL, próximos a proteína padrão de 29 kDa (Figura 15A). As propriedades hidrodinâmicas calculadas pelos experimentos de aSEC (Figura 15B) são apresentadas na Tabela 6.

Figura 15 – Cromatografia de exclusão molecular analítica da LbAha1 e domínios. A) Perfis cromatográficos da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C. As MM referentes aos picos de eluição das proteínas padrão estão indicadas. A presença de apenas um pico sugere que estas proteínas estavam monodispersas em solução. B) Gráfico para determinação de R_S . Foram determinados $R_S = 36 \pm 2$ Å para a LbAha1, $R_S = 24 \pm 1$ Å para a LbAha1N e $R_S = 25 \pm 1$ Å para a LbAha1C.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

Tabela 6 – Propriedades hidrodinâmicas da LbAha1 e domínios.

Técnicas	Propriedades	Proteínas		
		LbAha1 [☆]	LbAha1N	LbAha1C
AUC	$s_{20,w}^0$ (S)	$2,62 \pm 0,02$	N.D.	N.D.
	MM (kDa)	42 ± 2	N.D.	N.D.
	ff_0	$1,65 \pm 0,04$	N.D.	N.D.
aSEC	R_{Stokes} (Å)	32 ± 2	24 ± 1	25 ± 1
	ff_0	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$

N.D.: não determinado.

Fonte: [☆] Adaptado de (Seraphim et al, 2013) / Autoria própria.

Ensaio de velocidade de sedimentação, por AUC, resultaram no valor de $MM = 42 \pm 2$ kDa para a LbAha1. A proteína sedimentou como apenas uma espécie, com $s_{20,w}^0 = 2,62 \pm 0,02$ S e $ff_0 = 1,65 \pm 0,04$ (Figura 16, Tabela 6).

Figura 16 – Ensaio de velocidade de sedimentação (AUC) com a LbAha1. A) Distribuição dos coeficientes de sedimentação da LbAha1. A proteína sedimentou como apenas uma espécie, com $MM = 42 \pm 2$ kDa e $ff_0 = 1,65 \pm 0,04$. *Inserto:* Determinação do $s_{20,w}^0$ por regressão linear dos valores de $s_{20,w}$. O $s_{20,w}^0$ obtido foi de $2,62 \pm 0,02$ S. Estes resultados revelaram que a LbAha1 é um monômero alongado em solução.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

Estes dados, em conjunto, indicaram que a LbAha1 é um monômero alongado em solução, bem como seus domínios, embora estes apresentem formato menos alongado.

2.3.7 Estrutura em baixa resolução e dinâmica conformacional

Objetivando compreender a estrutura global e dinâmica da LbAha1 em solução foram realizados experimentos de SAXS. As curvas coletadas da LbAha1 intacta, bem como das construções de seus domínios, são apresentadas na Figura 17A e sugeriram que as três proteínas são alongadas. A qualidade dos dados foi inspecionada pela análise da região de Guinier (Figura 17B) e a linearidade observada sugeriu que os sistemas eram monodispersos.

Todas as proteínas analisadas foram encontradas na forma monomérica, com R_g estimado de 36 ± 2 Å para a LbAha1, 27 ± 1 Å para a LbAha1N e 28 ± 1 Å para a LbAha1C (Tabela 7). Os gráficos de Kratky atestaram que as proteínas estavam estruturadas (Figura 17C).

Tabela 7 – Dimensões da LbAha1 e das construções dos domínios derivadas dos experimentos de SAXS.

Propriedade	Proteínas								
	LbAha1 [⊙]			LbAha1N			LbAha1C		
	Experimental	<i>Ab initio</i>	EOM	Experimental	<i>Ab initio</i>	EOM	Experimental	<i>Ab initio</i>	EOM
MM (kDa)	43,5	N.A.	N.A.	23,5	N.A.	N.A.	28,5	N.A.	N.A.
R_g (Å)	36 ± 2	38	37 ± 8	27 ± 1	28	N.A.	28 ± 1	32	N.A.
D_{max} (Å)	140 ± 10	147	120 ± 20	95 ± 5	99	N.A.	105 ± 5	115	N.A.
R_s (Å)	32 ± 2	34	36 ± 3	24 ± 1	28	N.A.	25 ± 1	34	N.A.
$s_{20,w}^0$ (S)	$2,62 \pm 0,02$	2,6	$2,5 \pm 0,2$	N.D.	1,6	N.A.	N.D.	1,4	N.A.

N.A.: não aplicável.

Fonte: [⊙] Adaptado de (Seraphim et al, 2013) / Autoria própria.

Figura 17 – Análise dos dados de SAXS da LbAha1 e domínios. **A)** Curvas de SAXS da LbAha1, LbAha1N e LbAha1C sobrepostas com as curvas calculadas pelo programa GNOM. As curvas para a LbAha1N e LbAha1C foram divididas por 10 e 100, respectivamente, para fins comparativos. **B)** Verificação da região de Guinier da LbAha1 e domínios. Foram estimados R_g de 36 ± 2 Å para a LbAha1, 26 ± 1 Å para a LbAha1N e 28 ± 1 Å para a LbAha1C. A linearidade das curvas sugeriu sistemas monodispersos. **C)** Gráficos de Kratky indicando que a LbAha1 e domínios estavam estruturados.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

Com uso do programa GNOM, as curvas de SAXS foram convertidas matematicamente do espaço recíproco para o espaço real, e a PDDF para cada proteína foi construída (Figura 18A). As PDDFs foram compatíveis com estruturas prolatas e revelaram distâncias máximas de 140 ± 10 Å para a LbAha1, 95 ± 5 Å para a LbAha1N e 105 ± 5 Å para a LbAha1C (Tabela 7). Os modelos *ab initio* foram construídos baseados no ajuste das curvas simuladas pelo programa DAMMIN às curvas experimentais de SAXS (Figura 18B), e a estrutura em baixa resolução mais provável para cada proteína foi resultado da média de vários modelos, feito pelo pacote de programas DAMAVER (Figura 18C). As propriedades hidrodinâmicas das estruturas em baixa resolução foram estimadas pelo programa Hydropro e são apresentadas na Tabela 7.

Figura 18 – Construção dos modelos *ab initio* da LbAha1 e domínios. **A)** PDDFs calculadas pelo programa GNOM. Os valores estimados de $D_{\text{máx}}$ para a LbAha1, LbAha1N e LbAha1C foram, respectivamente, 140 ± 10 Å, 95 ± 5 Å e 105 ± 5 Å. As PDDFs apresentaram formato característico de proteínas prolatas. **B)** Curvas simuladas médias dos modelos *ab initio* sobrepostas às curvas experimentais de SAXS. Os valores de χ dos ajustes foram: LbAha1 = $1,34 \pm 0,08$; LbAha1N = $2,06 \pm 0,01$; e LbAha1C = $1,77 \pm 0,02$. **C)** Modelos *ab initio* para a LbAha1 (esquerda), LbAha1N (centro) e LbAha1C (direita). As estruturas 3D dos domínios da LbAha1 foram ajustadas manualmente aos envelopes dos modelos *ab initio*. O domínio N-terminal está representado em vermelho, o C-terminal em verde e o linker pela linha tracejada.

Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

Para a investigação da dinâmica da LbAha1 em solução, o método de *Ensemble Optimization* foi implementado. Entre 10.000 confôrmeros gerados, um conjunto representativo da curva experimental de SAXS foi selecionado (Figura 19A). A análise das dimensões e tamanhos dos confôrmeros presentes neste conjunto revelou que a LbAha1 apresentou notável flexibilidade, ocupando uma ampla gama de conformações em solução (Figura 19B). A representação das conformações assumidas pela LbAha1 é mostrada na Figura 19C e as propriedades hidrodinâmicas médias dos confôrmeros são apresentados na Tabela 7.

O estudo da LbAha1 por SAXS mostrou que a proteína possui dimensão suficiente para interagir simultaneamente com os domínios N e M da LbHsp90. Além disso, os domínios LbAha1N e LbAha1C são conectados por um *linker* que confere alta dinâmica e permite que diversas conformações sejam adotadas em solução.

Figura 19 – Estudo da dinâmica da LbAha1 pelo método de *Ensemble Optimization*. **A)** Curva teórica de SAXS do conjunto de confôrmeros selecionados em comparação com a curva experimental de SAXS da LbAha1 ($\chi=1.96$). **B)** Distribuição de dimensões e tamanhos dos confôrmeros presentes no conjunto selecionado em comparação com os 10.000 confôrmeros gerados para a LbAha1. Estes dados sugeriram que a LbAha1 é flexível e assume diversas conformações em solução. **C)** Conformações da LbAha1 encontradas no conjunto de confôrmeros selecionados. As construções LbAha1N e LbAha1C estão representados em verde e vermelho, respectivamente; as regiões onde a estrutura 3D não foi definida, entre elas o *linker*, são mostradas em azul.

Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

2.3.8 Verificação de interações intra e intermoleculares da LbAha1 por crosslinking

A investigação de uma possível associação entre monômeros de LbAha1, bem como o mapeamento da região envolvida, foi realizada utilizando o *crosslinker* bifuncional DSS. A LbAha1, LbAha1N e LbAha1C, além da mistura equimolar LbAha1N:LbAha1C, foram incubadas com DSS e o resultado foi visualizado por SDS-PAGE 15% (Figura 20). As proteínas recombinantes apresentaram padrões de banda bem definidos na ausência de DSS, entretanto, na presença do *crosslinker* foram observadas bandas difusas, inclusive com menor MM. Não foram observadas bandas cujas MM indiquem associação entre as proteínas. Estes dados estão de acordo com o modelo da LbAha1 como monômero, mostrando que seus domínios não interagem entre si.

Figura 20 – Análise de interações por crosslinking. A LbAha1 e domínios foram incubados com DSS para a investigação de possíveis interações entre os domínios N- e C-terminal. As amostras, na ausência e presença de DSS, foram analisadas por SDS-PAGE 15%. As bandas respectivas a cada proteína sem o DSS estão indicadas por setas. Não foram detectadas interações entre moléculas de LbAha1, confirmando a independência entre os domínios LbAha1N e LbAha1C.

Fonte: autoria própria.

2.3.9 Atividade chaperona intrínseca

A atividade chaperona intrínseca da LbAha1 sobre proteínas-cliente modelo foi avaliada pela capacidade de prevenir a agregação térmica destas proteínas. A LbAha1, LbAha1N, LbAha1C ou a mistura equimolar LbAha1N:LbAha1C foram incubadas com as proteínas-cliente MDH ou Luc, a 42°C, nas razões molares de 1:1, 5:1 e 10:1 e a agregação foi investigada por espalhamento de luz a 320 nm em função do tempo. Embora a LbAha1 e as construções dos domínios não tenham agregado nas condições testadas, elas não foram capazes de prevenir a agregação das proteínas-cliente MDH e Luc (Figura 21), o que indicou que a LbAha1 não apresentou atividade chaperona, ao menos sobre as proteínas-cliente modelo testadas. Ademais, pouco ou nenhum efeito de co-agregação da co-chaperona com as

proteínas-cliente foram observados, sugerindo que a LbAha1 e construções dos domínios não se ligaram ou se ligaram pouco as proteínas-cliente.

Figura 21 – Análise da atividade chaperona. Perfis cinéticos de agregação da A) malato desidrogenase (MDH) e C) luciferase frente a adição de 10 vezes o excesso molar de LbAha1 ou domínios. As porcentagens de agregação da B) MDH e D) luciferase foram calculadas em várias concentrações molares de LbAha1 e domínios. Todos os valores de agregação foram calculados considerando a agregação máxima da MDH ou Luc como 100%. A LbAha1 não apresentou atividade chaperona, ao menos sobre as proteínas clientes testadas.

Fonte: Autoria própria.

2.3.10 Análise termodinâmica da interação entre a LbAha1 e LbHsp90

A caracterização termodinâmica da interação molecular entre a LbAha1 e LbHsp90 foi realizada por meio da técnica de ITC. A LbAha1 recombinante foi titulada na LbHsp90 (Figura 22A, Tabela 8), resultando na interação com $K_d = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ e estequiometria de 2 moléculas de LbAha1 para 1 dímero de LbHsp90. A interação apresentou $\Delta H_{\text{app}} = -18,0 \pm 0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = -34 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, portanto entalpicamente dirigida, mas entropicamente desfavorável. O esquema lateral da Figura 22A ilustra a possível consequência da interação da LbAha1 com a LbHsp90 e a ordem de grandeza das propriedades termodinâmicas, ΔH_{app} e ΔS_{app} , envolvidas.

Com intenção de investigar as forças moleculares que dirigem a interação, a LbAha1 foi titulada na LbHsp90 em diferentes temperaturas. Os valores determinados de ΔH_{app} , juntamente com os valores calculados de $T\Delta S_{app}$ e ΔG_{app} , foram plotados graficamente em função da temperatura (Figura 22B). A ΔG_{app} permaneceu aproximadamente constante em todas as temperaturas, indicando um mecanismo compensatório de entalpia-entropia e a $\Delta C_{p,app}$ calculada foi de $260 \pm 80 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Assim, os dados calorimétricos da interação LbAha1-LbHsp90 sugeriram que a ligação entre as duas proteínas ocorre por intermédio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, e que a LbAha1 parece encaminhar a LbHsp90 para um estado fechado, com baixa entropia conformacional.

Figura 22 – Interação da LbAha1 com a LbHsp90. A) Termograma da interação entre a LbAha1 e Hsp90 a 20 °C. O esquema ao lado do gráfico ilustra a interação da LbAha1 (verde) e as possíveis consequências na conformação da LbHsp90 (vermelho). Ainda, a ordem de grandeza dos parâmetros termodinâmicos é indicada. B) Variação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH_{app} , $T\Delta S_{app}$ e ΔG_{app}) em função da temperatura e determinação da $\Delta C_{p,app}$ da interação LbAha1-LbHsp90 ($260 \pm 80 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Estes dados indicaram que interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio direcionam a interação.

Fonte: Adaptado de (Seraphim et al, 2013).

2.3.11 Mapeamento dos domínios da LbAha1 envolvidos na interação com a LbHsp90

A avaliação do papel dos domínios LbAha1N e LbAha1C na associação com a LbHsp90 foi realizada por ITC. Duas moléculas de LbAha1N ligaram-se a um dímero de LbHsp90, com $K_d = 2,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$, $\Delta H_{app} = -1,4 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{app} = 21 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 23A, Tabela 8). Portanto, a interação foi favorável tanto entalpicamente, quanto

entropicamente, e a reação é ilustrada no esquema da Figura 23A. A ligação do domínio LbAha1C à LbHsp90 não foi detectada pela técnica empregada.

O próximo passo consistiu em verificar se a interação LbAha1C-LbHsp90 ocorreu sem ser detectada, se seria dependente da formação de pré-complexos LbHsp90-LbAha1N, ou ainda dependente da interação simultânea do domínio LbAha1N na LbHsp90. Inicialmente, o pré-complexo LbHsp90-LbAha1C foi titulado com a LbAha1N e a interação apresentou $K_d = 5 \pm 2 \mu\text{M}$, $\Delta H_{\text{app}} = -2,0 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = 18 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 23B, Tabela 8). Em um segundo momento, o pré-complexo LbHsp90-LbAha1N foi titulado com o domínio LbAha1C, entretanto a interação não foi detectada. Por fim, a titulação da mistura equimolar dos domínios LbAha1N e LbAha1C na LbHsp90 resultou em valores de $K_d = 1,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $\Delta H_{\text{app}} = -1,1 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = 23 \pm 2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 23C, Tabela 8). A estequiometria determinada para ambas as titulações foram compatíveis com o modelo de duas moléculas de LbAha1 por dímero de LbHsp90 (Tabela 8). As evidências observadas em cada experimento estão esquematizadas ao lado dos respectivos termogramas na Figura 23.

Os parâmetros termodinâmicos das interações testadas indicaram que o domínio LbAha1N é o principal sítio de ancoramento da LbAha1 na LbHsp90. Adicionalmente, a conexão entre os domínios via *linker* é essencial para direcionar a LbHsp90 para o estado fechado.

Tabela 8 – Parâmetros termodinâmicos de interação da LbHsp90 com os domínios da LbAha1.

Titulado	Titulante	$\Delta H_{\text{app}} (\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta S_{\text{app}} (\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$	$K_d (\mu\text{M})$	n
LbHsp90 [#]	LbAha1	$-18,0 \pm 0,4$	-34 ± 2	$1,0 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
	LbAha1N	$-1,4 \pm 0,1$	21 ± 1	$2,6 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,3$
	LbAha1C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	LbAha1N+C	$-1,1 \pm 0,2$	23 ± 2	$1,5 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,2$
LbHsp90 [#] +LbAha1C	LbAha1N	$-2,0 \pm 0,1$	18 ± 1	5 ± 2	$1,4 \pm 0,2$
LbHsp90 [#] +LbAha1N	LbAha1C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LbHsp90NM [§]	LbAha1	$-1,7 \pm 0,1$	20 ± 1	$2,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1$
	LbAha1N	$-3,4 \pm 0,4$	15 ± 1	$2,7 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,1$
LbHsp90M [§]	LbAha1	$-2,1 \pm 0,1$	20 ± 1	$1,5 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$
	LbAha1N	$-3,1 \pm 0,2$	15 ± 1	$1,6 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$

[#] Considerada como homodímeros

[§] Considerada como monômeros

N.D.: não detectado

Fonte: Autoria própria.

Figura 23 – Interação dos domínios da LbAha1 com a LbHsp90. Termogramas e ajuste de dados das titulações A) domínio LbAha1N na LbHsp90, B) domínio LbAha1N no pré-complexo LbHsp90-LbAha1C e C) mistura equimolar dos domínios LbAha1N e LbAha1C na LbHsp90. Os esquemas ao lado de cada termograma representam as interpretações das reações, baseadas nas propriedades termodinâmicas determinadas. A LbHsp90 e LbAha1 são ilustradas em vermelho e verde, respectivamente. Não foram detectadas interações da LbHsp90 com o domínio LbAha1C. Os resultados confirmam que o domínio LbAha1N é o cerne da interação com a LbHsp90, e que sua interação não direciona a LbHsp90 para o estado fechado.

Fonte: Autoria própria.

2.3.12 Mapeamento das regiões da LbHsp90 envolvidas na interação com a LbAha1

De maneira recíproca às análises do item anterior, foram realizados experimentos visando identificar a contribuição dos domínios da LbHsp90 na interação com a LbAha1. A co-chaperona intacta foi titulada na construção LbHsp90NM, se ligando com $K_d = 2,2 \pm 0,6$

μM e estequiometria de uma LbAha1 por monômero de LbHsp90NM. A reação ocorreu com $\Delta H_{\text{app}} = -1,7 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = 20 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 24A, Tabela 8). Parâmetros similares foram observados na interação da LbAha1 com a LbHsp90M, que apresentou $K_d = 1,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$, estequiometria de uma LbAha1 por LbHsp90M, $\Delta H_{\text{app}} = -2,1 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = 20 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 24B, Tabela 8).

Figura 24 – Ensaio de interação da LbAha1 com os domínios da LbHsp90. Termogramas e ajustes dos dados das interações da **A)** LbAha1 intacta com a construção LbHsp90NM, e da **B)** LbAha1 intacta com o domínio M da LbHsp90. A conclusão dos experimentos é ilustrada pelos esquemas ao lado de cada termograma (construções da LbHsp90: vermelho; LbAha1: verde). Concluiu-se que o domínio M da LbHsp90 é suficiente para a interagir com a LbAha1.

Fonte: Autoria própria.

Como o domínio LbAha1N compõe o cerne de interação com a LbHsp90, sua ligação às construções LbHsp90NM e LbHsp90M também foi investigada. Com $K_d = 2,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$, uma molécula de LbAha1N interagiu por molécula de LbHsp90NM, sendo observados um $\Delta H_{\text{app}} = -3,4 \pm 0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ e um $\Delta S_{\text{app}} = 15 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 25A, Tabela 8). Similarmente, o complexo LbAha1N-LbHsp90M apresentou $K_d = 1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$, estequiometria de uma LbAha1N por monômero de LbHsp90M, $\Delta H_{\text{app}} = -3,1 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = 15 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 25B, Tabela 8).

Figura 25 – Análise da interação do domínio LbAha1N com os domínios da LbHsp90. Termogramas e ajustes dos dados das interações A) LbAha1N-LbHsp90NM e B) LbAha1N-LbHsp90M. Os esquemas adjacentes aos termogramas ilustram as reações (LbHsp90: vermelho; LbAha1: verde). Os dados aqui apresentados sugeriram que os domínios LbAha1N e LbHsp90M formam o cerne da interação entre as duas proteínas.

Fonte: Autoria própria.

Em conjunto, os dados apresentados mostraram que os domínios LbAha1N e LbHsp90M formam a região de ligação principal no complexo LbAha1-LbHsp90. Ainda, o estado oligomérico da LbHsp90 não interferiu em sua associação com a LbAha1.

2.3.13 Estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 pela LbAha1

Experimentos de cinética enzimática foram realizados com o intuito de determinar a funcionalidade da LbAha1 frente a LbHsp90. Concentrações crescentes de LbAha1 intacta foram adicionadas à LbHsp90 e observou-se um estímulo máximo de sua atividade ATPásica basal em cerca de 10 vezes. O perfil sigmoide da curva cinética, ajustado pela equação de Hill, gerou um coeficiente de Hill de $1,7 \pm 0,2$, indicando um mecanismo de cooperatividade positiva (Figura 26). Em contraste, os domínios LbAha1N, LbAha1C e a mistura equimolar de ambos foram incapazes de estimular a atividade ATPásica da LbHsp90, mesmo em concentrações cerca de 2,5 vezes superior que a maior concentração de LbAha1 (Figura 26).

Estes ensaios revelaram que a LbAha1 age de maneira cooperativa na estimulação da LbHsp90 e ressaltaram o importante papel funcional da conexão entre os domínios LbAha1N e LbAha1C, via *linker*.

Figura 26 - Estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90. Concentrações crescentes de LbAha1 e dos domínios foram adicionadas à LbHsp90 e a taxa de hidrólise de ATP foi mensurada. A LbAha1 intacta estimulou a LbHsp90 em, aproximadamente, 10 vezes. Em contraste, os domínios LbAha1N, LbAha1C ou a mistura de ambos (LbAha1N+C) não estimularam a LbHsp90. A curva cinética da LbAha1 foi ajustada pela equação de Hill, sugerindo um mecanismo de cooperatividade positiva. Estes resultados evidenciaram a importância da conexão física, via *linker*, dos domínios da LbAha1.

Fonte: Autoria própria.

2.4 Discussão

2.4.1 A LbAha1 possui organização estrutural canônica

As proteínas yAha1 e hAha1 possuem estruturas organizadas em dois domínios: um N-terminal (Aha1N) e um domínio C-terminal (Aha1C) (Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Panaretou et al, 2002). Estes dois domínios são conectados via uma sequência variável e flexível, o *linker* (Koulov et al, 2010; Retzlaff et al, 2010), e este tipo de organização estrutural é denominado canônico. Outros organismos possuem proteínas Aha1 com organizações diferentes da canônica: *P. falciparum* contém duas proteínas Aha1, uma correspondente ao domínio Aha1C e outra formada por dois domínios Aha1N (trabalho em progresso) (Chua et al, 2012); *E. histolytica* apresenta uma proteína correspondente apenas ao domínio Aha1C (Singh et al, 2014). Utilizando um banco de dados de tripanosomatídeos, somente uma proteína Aha1 foi encontrada em *L. braziliensis* e a análise de sua sequência de aminoácidos indica uma organização estrutural canônica, com a presença de um *linker* flexível entre os seus domínios. Embora similar no aspecto mencionado, LbAha1 apresenta baixa conservação em relação a yAha1 e hAha1 (Figura 7). Os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com a Hsp90, identificados em trabalhos prévios com a yAha1 (Meyer et al, 2004) e hAha1 (Koulov et al, 2010), também são pouco conservados nas três proteínas (Figura 1, setas vermelhas), com exceção do motivo RKXX (Figura 7, setas verdes). Em levedura, este motivo é responsável pelo remodelamento de uma região entre os aminoácidos 370 a 390 no domínio M da yHsp90 (Horvat et al, 2014; Meyer et al, 2003;

Meyer et al, 2004), permitindo que o resíduo Arg380 seja direcionado para os domínios N e atue no mecanismo de hidrólise de ATP (Meyer et al, 2003; Meyer et al, 2004). Resíduos equivalentes a Arg380 da yHsp90 são conservados na Hsp90 humana e de *L. braziliensis* (Silva et al, 2013). Estas evidências apontam para a possibilidade do mecanismo de estimulação da Hsp90 ser comum nas três proteínas, entretanto particularidades no mecanismo de interação com a Hsp90 parecem existir, conforme discutido adiante.

2.4.2 *LbAha1* e *LbHsp90* são proteínas cognatas *in vivo*

A expressão da Aha1 é recorrentemente associada a condições de estresse, como o choque-térmico, correlacionando-se com a expressão de outras chaperonas moleculares (Panaretou et al, 2002). De fato, a deleção da Aha1 em levedura resulta em um fenótipo sensível a temperatura (Armstrong et al, 2012; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002). Com objetivo de confirmar se a Aha1 é expressa em *L. braziliensis*, bem como o efeito da temperatura em seus níveis celulares, a sua identificação *in vivo* foi realizada (Figura 9). Os resultados mostram que a LbAha1 e a LbHsp90 são expressas nas condições testadas e, portanto, devem apresentar papel fisiológico *in vivo*. Embora especulativo, o fato da LbAha1 recombinante possuir MM inferior à LbAha1 endógena pode advir de modificações pós-traducionais pois diversos sítios potenciais de fosforilação são preditos na sequência de aminoácidos da LbAha1. Estes processos comumente estão envolvidos na regulação de chaperonas moleculares em vários organismos, como humanos, plantas e protozoários do gênero *Leishmania* (Mollapour et al, 2011; Morales et al, 2010; Rohl et al, 2015; Tosoni et al, 2011; Wang et al, 2012; Xu et al, 2012). Reportou-se recentemente que a fosforilação da hAha1 direciona sua interação com a hHsp90 (Dunn et al, 2015). Assim, a fosforilação da LbAha1 poderia constituir um mecanismo regulatório desta co-chaperona, porém isto precisa ser devidamente averiguado.

2.4.3 A *LbAha1* recombinante foi obtida enovelada

O estudo do papel celular da chaperona molecular Hsp90 de protozoários tem sido alvo de estudos passados e atuais, inclusive em espécies do gênero *Leishmania* (Seraphim et al, 2014); a Hsp90 de *L. braziliensis* foi recentemente caracterizada em relação à sua estrutura, função e propriedades inibitórias (Silva et al, 2013). Apesar disto, pouco se conhece a respeito de sua biologia, principalmente quando comparado a sistemas mais bem caracterizados, como levedura e humano. O conhecimento das co-chaperonas da Hsp90 de protozoários é ainda restrito: em *P. falciparum*, estudos foram realizados com as co-chaperona p23 (Chua et al, 2010), Aha1 (Chua et al, 2012) e Hop (Gitau et al, 2012;

Hatherley et al, 2015; Zininga et al, 2015); em *T. gondii*, a p23 foi investigada (Echeverria et al, 2010); e em *L. braziliensis*, trabalhos recentes caracterizaram as proteínas p23 (Batista et al, 2015) e Aha1 (Seraphim et al, 2013) – este último alvo da tese de doutoramento e parcialmente descrito neste documento. Neste contexto, a LbAha1 recombinante e duas construções referentes aos domínios canônicos foram expressas heterologicamente e purificadas até homogeneidade (Figura 10) para a caracterização estrutural, funcional e de seu mecanismo de ação sobre a LbHsp90.

O resultado da investigação da estrutura secundária da LbAha1 por CD (Figura 11A, Tabela 4) claramente mostra que a proteína recombinante foi obtida enovelada, com quantidade de hélices α e folhas β similar às proteínas yAha1 e hAha1 (Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Retzlaff et al, 2010). Os dados de fluorescência indicam a presença de estrutura terciária na LbAha1 recombinante, haja vista que o deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle \lambda \rangle$ de comprimentos de onda menores, em condição nativa, para valores maiores, em condição desnaturante (Figura 12A, Tabela 4).

2.4.4 Os domínios da LbAha1 enovelam-se independentemente e possuem diferentes estabilidades

Com intenção de compreender a organização estrutural da LbAha1, foram realizados experimentos de estabilidade. Apesar de conter dois domínios, a LbAha1 desenovela termicamente por uma única transição cooperativa (Figura 13, Tabela 5). Foi reportado que a yAha1 também desenovela por uma transição, entretanto as curvas individuais de estabilidade térmica das construções dos domínios revelaram que a construção yAha1N tem menor estabilidade que a yAha1C (Retzlaff et al, 2010). A partir destas informações pode-se especular então que os domínios da LbAha1 possuem estabilidades térmicas similares, embora a presença de interdependência entre eles não possa ser descartada.

Em contraste, o desenovelamento químico da proteína-alvo acontece através de duas transições, uma primeira discreta e uma segunda mais pronunciada (Figura 14A, Tabela 5). Com amparo dos modelos gerados por homologia, os resíduos de Trp, utilizados como sondas nestes experimentos, foram localizados (Figura 8). No domínio LbAha1N, três dos quatro resíduos de Trp se encontram em uma região desestruturada, com maior grau de exposição ao solvente, assim como observado na estrutura cristalográfica da yAha1 (Meyer et al, 2004); o quarto resíduo de Trp se encontra enterrado na estrutura da proteína. Os resíduos de Trp do domínio LbAha1C foram identificados em regiões com parcial ou pouco acesso ao solvente. Deste modo, o desenovelamento químico do domínio N-terminal levaria a uma sutil alteração

no valor de $\langle\lambda\rangle$, enquanto que o desenovelamento do C-terminal acarretaria um deslocamento mais acentuado no $\langle\lambda\rangle$. Com base nestes argumentos, elaborou-se a hipótese de um mecanismo de desenovelamento onde a LbAha1 perde estrutura, primeiramente, pelo domínio Aha1N e, secundariamente, pelo domínio Aha1C. Experimentos de desenovelamento químico monitorados pelo sinal de CD (dados não mostrados) corroboram com o comportamento observado por fluorescência, entretanto, por se tratar de uma técnica que utiliza a estrutura secundária como sonda global, não é possível determinar a quais domínios as transições pertencem.

Para comprovar a hipótese proposta, entre outras razões discutidas ao longo do texto, as construções respectivas aos domínios LbAha1N e LbAha1C (Figura 2A) foram expressas heterologicamente e obtidas puras (Figura 10B). Ambos os domínios apresentam estrutura secundária, como atestado por CD (Figura 11A). A deconvolução dos espectros sugere que o conteúdo de hélices α da LbAha1N é menor em comparação com o observado para a estrutura cristalográfica da yAha1N (Meyer et al, 2004); já o domínio LbAha1C, comparado a estrutura em solução do domínio hAha1C (PDB ID: 1X53), apresenta tendência similar de quantidade de estrutura secundária. Ademais, a curva resultante da soma de espectros da LbAha1N e LbAha1C é similar ao formato do espectro da LbAha1 intacta (Figura 11B), indicando que os domínios enovelam-se, considerando a estrutura secundária, independentemente. O mesmo comportamento pode ser observado para a co-chaperona ortóloga de humano e experimentos de RMN confirmaram que ambos os domínios isolados da hAha1 estavam enovelados corretamente (Koulov et al, 2010), corroborando com os dados aqui apresentados.

A estrutura terciária dos domínios da LbAha1 foi avaliada por fluorescência e o deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$, quando da condição nativa para uma condição desnaturante, evidenciam que as proteínas possuem estrutura terciária. As informações contidas nos espectros de fluorescência tornam possível a comparação com as estruturas 3D obtidas por modelagem molecular por homologia e a validação da localidade dos resíduos de Trp. O espectro da LbAha1N permite identificar ao menos dois ambientes distintos onde os resíduos de Trp podem se encontrar: um ambiente não acessível ao solvente, próximo a 310 nm, e outro com maior exposição ao solvente, próximo a 340 nm (Figura 12A). Embora o espectro da LbAha1C seja de difícil interpretação em relação a posição dos resíduos de Trp, seu único pico a 340 nm e sua ampla base sugerem que estes resíduos podem variar de um ambiente pouco exposto a parcialmente exposto ao solvente. Estas interpretações estão em concordância com a localização discutida dos resíduos de Trp na estrutura 3D da LbAha1 (Figura 8). Em contraste com os dados de CD, a soma e normalização dos espectros de

fluorescência da LbAha1N e LbAha1C apresenta ligeira diferença em comprimentos de onda menores, comparado com o espectro da LbAha1 intacta (Figura 12B). Com isto, pode-se especular que a região onde o resíduo Trp95 se encontra sofre influência do domínio LbAha1C, pois na proteína intacta ocorre supressão de fluorescência na região de 300 – 320 nm do espectro. Por outro lado, nos espectros do domínio LbAha1N e da soma de domínios, esta região apresenta um sinal de fluorescência mais pronunciado. Em adição, a supressão da fluorescência dos resíduos de Tyr na LbAha1 intacta corrobora para a hipótese de que o domínio LbAha1C influencia o LbAha1N, afetando a estrutura terciária local deste domínio e, consequentemente, o ambiente dos resíduos de Tyr (dados não mostrados).

Com a obtenção dos domínios enovelados, as hipóteses construídas a partir dos experimentos de estabilidade térmica e química com a LbAha1 intacta foram testadas. A construção LbAha1N é termicamente menos estável que a LbAha1C, entretanto ambas desenovelam por meio de uma única transição (Figura 13), tendências também observadas para os domínios da yAha1 (Retzlaff et al, 2010). A diferença dos perfis de desnaturação térmica entre os domínios e o fato da LbAha1C não desenovelar dentro do intervalo observado para a LbAha1 intacta sugere que a conexão com o domínio LbAha1N interfere em sua estabilidade. No mesmo sentido, os dados de desenovelamento químico das construções dos domínios da LbAha1 confirmam que a LbAha1N é menos estável quimicamente que a LbAha1C, validando o mecanismo de desenovelamento proposto para a proteína. Cabe aqui ressaltar que, ao passo que o valor de C_m da LbAha1N é similar àquele determinado para a primeira transição da LbAha1 intacta, a segunda transição difere ligeiramente do valor de C_m da LbAha1C. Interessantemente, a T_m do domínio LbAha1C é de 63 °C, enquanto a da LbAha1 é de 54°C, portanto o domínio LbAha1N perturba a estabilidade do domínio C-terminal acarretando na redução de sua estabilidade térmica; concomitante a isto, o domínio LbAha1C perturba o domínio N-terminal suprimindo o Trp95.

Como um todo, estas informações sugerem que a LbAha1 é composta de dois domínios que se enovelam de maneira independente e possuem estabilidades diferentes. Em adição, o aumento da dinâmica da LbAha1 promovida pela conexão dos domínios via *linker* permite que ambos se afetem reciprocamente, apesar de, aparentemente, não interagirem entre si (dados discutidos adiante no texto).

2.4.5 A LbAha1 é um monômero alongado em solução

Na literatura, estudos estruturais das co-chaperonas Aha1 de levedura e humano, mostraram indiretamente que tanto a proteína completa quanto os domínios, consistem em

moléculas alongadas e monoméricas em solução (Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Retzlaff et al, 2010). Recentemente, as propriedades hidrodinâmicas da hAha1 foram determinadas diretamente, caracterizando-a como um monômero alongado (Lepvrier et al, 2015). Em concordância com estas informações, os cálculos das características da LbAha1 em solução, bem como das construções LbAha1N e LbAha1C (Figuras 15 e 16, Tabela 6), mostram que estas proteínas são exclusivamente monoméricas e alongadas em solução. Com base nos mecanismos propostos da interação Aha1-Hsp90 (Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010), é interessante mencionar que o formato alongado é uma característica marcante destas proteínas, contribuindo para que a interação com domínios distintos da Hsp90 seja possível, inclusive de maneira assimétrica.

2.4.6 As dimensões e flexibilidade da LbAha1 são compatíveis com o modelo de interação que envolve os domínios N e M da LbHsp90

Informações estruturais acerca da Aha1 vêm de estudos cristalográficos e por RMN e construções respectivas aos domínios isolados (PDB ID: 1X53) (Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Retzlaff et al, 2010) e não das proteínas intactas em solução. No sentido de compreender o comportamento da proteína, a estrutura em baixa resolução e a dinâmica da LbAha1 foram investigadas por SAXS. Tanto a LbAha1 intacta como as construções LbAha1N e LbAha1C compõem sistemas monodispersos, com MMs compatíveis com monômeros, em concordância com os dados hidrodinâmicos apresentados previamente (Figura 17, Tabela 7). Os gráficos de PDDF (Figura 18A) atestam para o formato alongado destas proteínas e foram utilizados na geração dos modelos *ab initio*. As curvas simuladas pelo programa DAMMIN (Figura 18B) se ajustam muito bem às curvas experimentais de SAXS, e todos os modelos construídos enfatizam o formato alongado destas proteínas em solução. As estruturas em baixa resolução LbAha1 e LbAha1N apresentam propriedades muito similares às determinadas experimentalmente (Tabela 7); em contraste, as propriedades do modelo da LbAha1C são ligeiramente superiores às experimentais (Tabela 7). Isto pode ser justificado pela flexibilidade conferida pelo *linker*, localizada na porção N-terminal da construção LbAha1C. É importante ressaltar que as curvas de SAXS são médias temporais das conformações assumidas pelas proteínas em solução (Bernado et al, 2007), e os modelos *ab initio* são reconstruções estáticas que representam a média destas conformações.

Levando em conta estas características da técnica de SAXS, a natureza modular ou de multi-domínios da LbAha1 e a presença de um *linker* predito como flexível, a estratégia EOM se mostrou adequada para auxiliar na interpretação da dinâmica desta proteína em solução.

Dentre os 10.000 confôrmeros gerados para a LbAha1, o conjunto cuja curva teórica de espalhamento melhor se ajusta à curva experimental foi selecionado (Figura 19A). Este conjunto (Figura 19C) mostra ampla distribuição nas propriedades de $D_{\text{máx}}$ e R_g , se assemelhando à curva que descreve as dimensões adotadas pelos 10.000 confôrmeros gerados (Figura 19B). Estes dados indicam que o *linker* possui flexibilidade e não interfere na orientação relativa dos domínios LbAha1N e LbAha1C. Uma vez que todas as conformações selecionadas pelo EOM devem estar presentes em solução, a propriedade hidrodinâmica média do conjunto selecionado deveria se assemelhar às propriedades determinadas para a LbAha1. A Tabela 6 claramente indica que estes valores estão em concordância, portanto validando a LbAha1 como uma proteína flexível e com alta dinâmica estrutural em solução.

No modelo proposto para o sistema Aha1-Hsp90 de levedura, a interação assimétrica coordenada dos domínios Aha1N e Aha1C, respectivamente com os domínios M e N da Hsp90, direciona a chaperona para um estado fechado competente na hidrólise do ATP (Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010). Estendendo este modelo para *L. braziliensis*, os dados obtidos a partir da técnica de SAXS enfatizam importantes características estruturais da LbAha1: o formato alongado e a flexibilidade conferida pelo *linker*. Estas duas características permitem que a LbAha1, cujo $D_{\text{máx}}$ é de cerca de 140 Å, interaja simultaneamente com ambos os domínios N e M da LbHsp90, que possuem dimensão de, aproximadamente, 120 Å de uma extremidade a outra (dados não publicados). Ainda, a flexibilidade da LbAha1 permite que um mecanismo de interação assimétrica, observado no complexo Aha1-Hsp90 em levedura, seja passível de ocorrer no sistema de *L. braziliensis*.

2.4.6 Os domínios da LbAha1 não interagem entre si

Previamente neste trabalho, a caracterização estrutural da LbAha1 sugeriu que os domínios LbAha1N e LbAha1C são independentes em termos de enovelamento, mas se afetam reciprocamente quando conectados pelo *linker*; as características em solução desta proteína apontaram um sistema monodisperso, monomérico e flexível. A despeito destas conclusões, interações intra ou intermoleculares de baixa afinidade ou frequência poderiam ocorrer, mas não serem estáveis suficientes para serem detectadas pelas técnicas empregadas, o que poderia explicar a perturbação recíproca mencionada acima. Em um cenário onde estas interações acontecem, a estabilização covalente das mesmas permite a detecção pela alteração na MM visualizada por SDS-PAGE. Em adição, o uso de um agente *crosslinker* revelou que a yAha1 é capaz homodimerizar *in vivo* através do domínio yAha1N (Berg et al, 2014). O padrão de MM observado para a LbAha1 na presença do *crosslinker* DSS (Figura 20)

confirma que a proteína é monomérica, entretanto a presença de uma banda de MM menor poderia sugerir interações entre os domínios Aha1N e Aha1C da LbAha1. Nas construções LbAha1N e LbAha1C, após tratamento com DSS, bandas difusas de igual ou menor MM são observadas, indicando a diminuição de MM ocorre devido a formação de ligações covalentes dentro de cada domínio. O tratamento da mistura equimolar da LbAha1N com a LbAha1C com o *crosslinker* apresenta o mesmo padrão de bandas que as construções dos domínios sozinhos. Portanto, além da confirmação que a LbAha1 é monomérica, os resultados apresentados apontam que a associação entre os domínios da proteína não foi observada.

2.4.7 A LbAha1 não possui atividade chaperona

Várias chaperonas e co-chaperonas moleculares, como a Hsp70, Hsp40, Hsp90, p23 e Aha1 (Borges et al, 2005; Seraphim et al, 2015; Silva et al, 2013; Terada & Oike, 2010; Tripathi et al, 2014; Young et al, 1997), entre outras, tem a capacidade de ligar proteínas desenoveladas, prevenindo-as da agregação, sendo tal habilidade conhecida como atividade chaperona intrínseca. Em humanos, apenas a hAha1 intacta apresenta tal atividade, que foi atribuída ao 22 resíduos de aminoácido iniciais do domínio hAha1N (Tripathi et al, 2014). Interessantemente, a porção N-terminal da LbAha1 apresenta 77% de identidade a esta região da hAha1 especulando-se, portanto, a possível presença de atividade chaperona. Apesar desta evidência, nos experimentos de prevenção de agregação utilizando a MDH e a luciferase como modelos de proteínas-cliente, nem a LbAha1, tampouco os domínios, são capazes de evitar a agregação das proteínas-clientes modelo desenoveladas termicamente (Figura 21). Resultado similar também é observado para a yAha1 (Tripathi et al, 2014), e embora a LbAha1 e hAha1 compartilhem de algumas características, a baixa identidade de sequência entre estas proteínas permite elaborar a hipótese de que regiões adicionais podem estar envolvidas na capacidade de ligação e prevenção de agregação de outras proteínas. Ainda, é importante ressaltar que, embora a LbAha1 não apresente atividade chaperona sobre as proteínas-cliente modelo testadas, deve-se considerar a hipótese que outras proteínas-cliente possam interagir especificamente com esta co-chaperona molecular, como mostrado por (Zhong et al, 2009).

2.4.8 Duas moléculas de LbAha1 se ligam ao dímero de Lbhsp90 através de interações polares, direcionando-a para o estado fechado

A interação molecular entre a LbAha1 e a LbHsp90 foi investigada por ITC (Figura 22). O valor de Kd para a interação (Tabela 8) é similar aos valores determinados previamente para a yAha1 (Li et al, 2013a; Meyer et al, 2004; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010;

Siligardi et al, 2004) e hAha1 (Koulov et al, 2010), com ordem de grandeza de baixo micromolar. Outras co-chaperonas também interagem com a Hsp90 com afinidade similar, como por exemplo, a Hop e a p23. A Hop participa no ciclo da Hsp90 em um estágio precoce, impedindo a dimerização dos domínios N da Hsp90 e mantendo-a na conformação aberta (Richter et al 2003). Em levedura, o Kd da interação Hop-Hsp90 é de cerca de 0,3 μM (Prodromou et al, 1999; Siligardi et al, 2004); no sistema humano o Kd é de cerca de 0,7 μM , aproximadamente, e a Hop liga-se com menor afinidade a um mutante da Hsp90 cuja dimerização dos domínios N é estabilizada (Onuoha et al, 2008). Dados preliminares da interação LbHop-LbHsp90 sugerem um Kd de 1 μM (dados não publicados). A p23, uma co-chaperona do estado tardio, estabiliza a Hsp90 num estado fechado cataliticamente incompetente (estado fechado 2), inibindo sua atividade ATPásica (Krukenberg et al, 2011; Li et al, 2013a; Siligardi et al, 2004). Na ausência de nucleotídeos, a p23 de levedura interage com a Hsp90 com Kd de 120 μM ; em contraste, na presença de AMP-PNP a p23 apresenta afinidade cerca de 60 vezes maior pela Hsp90 (Siligardi et al, 2004). No sistema humano, constatou-se que o complexo Hsp90-p23 possui Kd de 17 μM e 1,5 μM , na ausência e presença de nucleotídeos, respectivamente (McLaughlin et al, 2006). O mesmo comportamento é observado para a interação p23-Hsp90 de *L. braziliensis* (Batista et al, 2015). Portanto, as afinidades com que Hop e p23 interagem com a Hsp90 são comparáveis às aquelas determinadas para a Aha1, inclusive no sistema de *L. braziliensis*. Esta análise se torna relevante considerando que estas três co-chaperonas participam em momentos distintos do ciclo da Hsp90 (Hop - estado aberto, Aha1 - estado fechado 1, e p23 - estado fechado 2), competindo pela ligação e direcionando o ciclo desta chaperona molecular (Harst et al, 2005; Li et al, 2013a; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010). Pode-se especular então que, em *L. braziliensis*, o direcionamento do ciclo da Hsp90 pelas suas co-chaperonas ocorre de maneira análoga aos sistemas em levedura e humano.

A estequiometria definida para a interação LbAha1-LbHsp90 (2 monômeros de LbAha1 para 1 dímero de LbHsp90 – Tabela 8) está de acordo com o observado para os sistemas de levedura (Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010) e de humano (Koulov et al, 2010). No sistema híbrido Hsp90 porcina-Aha1 humana, complexos formados por *crosslinking* sugerem a estequiometria de até 4 moléculas de Aha1 por dímero de Hsp90 (Lepvrier et al, 2015), entretanto não foram observados tais indícios em *L. braziliensis*. A estequiometria de 2:1 pode ser interpretada de forma que duas moléculas de LbAha1 seriam passíveis de interagir, cada uma, em interfaces opostas dos domínios M e N do dímero de LbHsp90. Embora a estequiometria de 1 monômero de LbAha1 para 1 dímero de LbHsp90

não tenha sido observada, em levedura esta proporção é suficiente para estimular a atividade ATPásica da Hsp90, o que preconiza o fato de múltiplas co-chaperonas poderem se ligar a Hsp90 simultaneamente, formando um complexo assimétrico (Harst et al, 2005; Li et al, 2013a; Retzlaff et al, 2010; Sun et al, 2012).

O intenso valor negativo de ΔH_{app} decorrente da associação da LbAha1 com a LbHsp90 pode ser atribuído a formação de interações, tanto diretamente envolvidas na associação da LbAha1 à LbHsp90, quanto por consequência da interação, como o remodelamento conformacional da LbHsp90. Este dado é suportado pelo custo entrópico da interação, evidenciado pelo valor negativo de ΔS_{app} , sugerindo a restrição da liberdade conformacional da Hsp90 (provavelmente o direcionamento para o estado fechado – Figura 22A, esquema). Resultados similares de ΔS_{app} são observados para as proteínas p23 de *L. braziliensis*, co-chaperona que sabidamente estabiliza a Hsp90 no estado fechado (Batista et al, 2015).

Por fim, experimentos de ITC em diversas temperaturas revelam uma clara compensação entre os termos de entálpicos e entrópicos, de forma a manter a ΔG_{app} da interação aproximadamente constante. A $\Delta C_{p,app}$ do complexo LbAha1-LbHsp90 foi estimada (Figura 22B) e seu valor positivo indica que interações eletrostáticas, interações mediadas por moléculas de água e ligações de hidrogênio direcionam a associação da LbAha1 à LbHsp90 (Niedzwiecka et al, 2002; Zhou et al, 2005). Assim, a interface de interação envolvida no complexo LbAha1-LbHsp90 deve possuir características similares ao que ocorre no complexo de levedura (Meyer et al, 2004).

2.4.9 O domínio LbAha1N é o cerne de interação com a LbHsp90 e sua conexão com o domínio LbAha1C é essencial para induzir o remodelamento desta chaperona molecular

Os experimentos de ITC, visando mapear a contribuição dos domínios da LbAha1 envolvidos na ligação com a LbHsp90, mostraram que o domínio LbAha1N interage com a LbHsp90 (Figura 23A, Tabela 8) com K_d e estequiometria similar ao observado para a LbAha1 intacta, sugerindo que este domínio é suficiente para que o complexo com a LbHsp90 seja formado. Estes parâmetros são compatíveis com aqueles determinados para os complexos yAha1N-yHsp90 e hAha1N-hHsp90 (Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Siligardi et al, 2004). O valor negativo, porém reduzido, de ΔH_{app} e a ΔS_{app} positiva, quando comparados com a interação da LbAha1 intacta com a LbHsp90, sugerem que a construção LbAha1N é incapaz de deslocar a conformação da LbHsp90 para o estado fechado. Resultado similar é

descrito em levedura, onde os domínios yAha1N e yAha1C não estabilizam a yHsp90 no estado fechado, como faz a yAha1 intacta (Retzlaff et al, 2010).

A associação do domínio LbAha1C com a LbHsp90 não foi observada, contrastando com os sistemas de humano e levedura, onde sutis interações entre o domínio Aha1C com os domínios N do dímero de Hsp90 ocorrem (Koulov et al, 2010; Retzlaff et al, 2010). Em *E. histolytica*, uma proteína Aha1 homóloga ao C-terminal da yAha1 e hAha1 se liga e estimula a atividade ATPásica da Hsp90 (Singh et al, 2014). Desta forma, tanto a interação do domínio LbAha1C, quanto o direcionamento da LbHsp90 para o estado fechado, podem depender da presença concomitante do domínio LbAha1N.

Considerando o exposto, a construção LbAha1N foi titulada no pré-complexo formado entre a LbHsp90 e LbAha1C (Figura 23B), e os parâmetros termodinâmicos da interação não apresentaram diferenças estatisticamente significativas daqueles do complexo LbAha1N-LbHsp90 (Tabela 8). Analogamente, a construção LbAha1C foi titulada no pré-complexo LbAha1N-LbHsp90 e, assim como na titulação com a LbHsp90 somente, sinais de interação da construção LbAha1C não foram detectados. Para excluir a possibilidade da interação prévia da LbAha1N à LbHsp90 interferir na ligação subsequente do domínio LbAha1C, a mistura equimolar das construções dos domínios foi titulada na LbHsp90 (Figura 23C). Os parâmetros termodinâmicos obtidos foram novamente similares aos observados para a interação LbAha1N-LbHsp90 (Tabela 8). É relevante mencionar que nas interações detectadas do LbAha1N e LbHsp90, os valores de ΔH_{app} e a ΔS_{app} indicam que não há encaminhamento da LbHsp90 para o estado fechado. Como apenas a LbAha1 intacta é capaz de causar tal efeito na conformação da LbHsp90, hipotetiza-se que a conexão física entre os domínios LbAha1N e LbAha1C, via *linker*, seria essencial para a função desta co-chaperona.

2.4.10 O domínio M da LbHsp90 é o cerne de interação com a LbAha1

Conforme discutido, o domínio LbAha1N é suficiente para que ocorra a interação da LbAha1 com a LbHsp90. Reciprocamente ao realizado para LbAha1, os domínios da LbHsp90 envolvidos na interação foram mapeados. Inicialmente, a LbAha1 intacta foi titulada nas construções LbHsp90NM e LbHsp90M (Figura 24), e os parâmetros termodinâmicos de interação observados foram similares entre si (Tabela 8). Estes resultados evidenciam que o domínio M da LbHsp90 é o cerne de interação com a LbAha1 e que o domínio C-terminal da LbHsp90 não participa da interação, ainda que seja importante para a manutenção do ciclo conformacional e atividade ATPásica da mesma (Silva et al, 2013). A titulação da construção LbAha1N nas construções LbHsp90NM e LbHsp90M também foram

termodinamicamente semelhantes entre si (Figura 25, Tabela 8) e confirmam que o domínio M da LbHsp90 é suficiente para interagir com o domínio LbAha1N da LbAha1. A interação da yAha1 e yAha1N com a construção yHsp90M ocorre com afinidade semelhante ao determinado para as proteínas de *L. braziliensis* (Meyer et al, 2004). Mesmo que na literatura seja descrito o domínio Aha1C interaja com os domínios N da Hsp90 (Koulov et al, 2010; Li et al, 2013a; Meyer et al, 2004; Retzlaff et al, 2010), ao menos no estado monomérico esta região na LbHsp90 parece ser dispensável para a interação com a LbAha1. Pode-se especular que a interação com o domínio N da LbHsp90 seja sutil ou tênue e ocorra somente quando estes domínios se encontrem dimerizados ou em uma conformação intermediária ativa. Assim, todas estas evidências indicam que a interface de interação LbAha1-LbHsp90 se dá, primariamente, pelos domínios LbAha1N e LbHsp90M. Ainda que o domínio LbAha1N possa ter um sítio de interação adicional no domínio N da Hsp90, como observado em levedura (Retzlaff et al, 2010), esta interação parece não contribuir para a formação do complexo, uma vez que as afinidades determinadas para os complexos testados apresentam valores similares.

2.4.11 O linker da LbAha1 é essencial para a estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90

A funcionalidade da LbAha1 foi avaliada a partir de experimentos de cinética enzimática. A atividade ATPásica da LbHsp90 é estimulada em, aproximadamente, 10 vezes na presença da LbAha1 (Figura 26), em concordância com o que ocorre nos sistemas de levedura e humano (Koulov et al, 2010; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010), mas contrastando com a baixa estimulação em *P. falciparum* e *E. histolytica* (Chua et al, 2012; Singh et al, 2014). Embora cuidados devam ser tomados neste tipo de comparação, devido a diferentes metodologias aplicadas nos experimentos, não se pode descartar que organizações estruturais divergentes de proteínas Aha1 ortólogas resultem em graus de estimulação distintos da Hsp90.

A curva cinética da LbHsp90 em função da concentração de LbAha1 possui um perfil sigmoide evidente (Figura 26), com coeficiente de Hill que indica um mecanismo de cooperatividade positiva. Considerando as altas razões molares alcançadas nestes experimentos, além do fato da K_d para a interação LbAha1-LbHsp90 ser da ordem de 1 µM, pode-se especular que a origem deste efeito vem da interação de duas moléculas de LbAha1 por dímero de LbHsp90. É mostrado na literatura que uma molécula de Aha1 é suficiente para induzir o remodelamento do dímero de Hsp90 para o estado fechado, estimulando sua

atividade ATPásica (Retzlaff et al, 2010). Em adição, quando a Hsp90 se encontra num estado previamente fechado, a Aha1 se liga com maior afinidade (Li et al, 2010). Desta forma, é proposto que o efeito cooperativo positivo decorra da ligação de moléculas de LbAha1 a complexos pré-formados de uma LbAha1 por dímero de LbHsp90. Baseado nos sistemas yAha1-yHsp90 e hAha1-hHsp90, onde dois sítios de interação da Aha1 existem na Hsp90 (Koulov et al, 2010; Retzlaff et al, 2010), pode-se especular ainda que o mecanismo cooperativo possa advir da interação sequencial dos domínios LbAha1N e LbAha1C na LbHsp90.

Estudos funcionais sugerem que, individualmente, os domínios das proteínas Aha1 de humano e levedura falham em estimular eficientemente a Hsp90 (Horvat et al, 2014; Koulov et al, 2010; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010) e a adição conjunta de ambos os domínios truncados reconstitui parcialmente o estímulo da atividade ATPásica (Retzlaff et al, 2010). Neste contexto, a estimulação da LbHsp90 pelas construções LbAha1N, LbAha1C e pela mistura equimolar de ambos foi verificada (Figura 20). Nos três casos mencionados, não ocorre estímulo da atividade ATPásica da LbHsp90, corroborando com os dados de ITC, que mostram que o direcionamento da LbHsp90 para o estado fechado ocorre apenas com a LbAha1 intacta.

Em conjunto, estes resultados convergem para a importância da LbAha1 intacta no ciclo funcional da LbHsp90, e ressaltam o papel do *linker* que conecta ambos os domínios da LbAha1 como um elemento crítico no mecanismo funcional desta proteína. Ademais, é mostrado que a estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 é dependente de seu encaminhamento para o estado fechado, uma vez que todas as construções que falham neste direcionamento, também não estimulam a atividade ATPásica da LbHsp90.

2.4.12 Modelo proposto de estimulação da LbHsp90 pela LbAha1

Com base nos resultados discutidos, é proposto um mecanismo de ação cooperativo na estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 pela LbAha1 (Figura 27). A LbHsp90 como um dímero (Silva et al, 2013), assim como Hsp90 de outros eucariotos (Mickler et al, 2009; Ratzke et al, 2012; Southworth & Agard, 2008), existe em um equilíbrio dinâmico de conformações em solução (Figura 27, 1). A co-chaperona LbAha1, que possui um *linker* flexível que lhe confere alta dinâmica em solução, interage primeiramente através de seu domínio LbAha1N com o domínio M da LbHsp90 (Figura 27, 2), formando um hipotético estado intermediário onde a LbHsp90 está no estado aberto e o domínio LbAha1C apresenta alta mobilidade. Secundariamente, o domínio LbAha1C interage com a LbHsp90,

estabilizando-a num estado conformacional fechado e competente para a hidrólise de ATP (Figura 27, 3). A cooperatividade observada no mecanismo de estimulação da LbHsp90 poderia decorrer tanto da interação da LbAha1 em ambas as faces do dímero de LbHsp90, como da existência de dois sítios sequenciais de interação, ou de um efeito aditivo de ambos. É importante destacar o papel crítico executado pelo *linker*, uma vez que na sua ausência a LbHsp90 não é direcionada para o estado fechado, nem estimulada. Portanto, algumas funções para o *linker* são propostas: 1) o *linker* atuaria como limitador difusional para o domínio LbAha1C, aumentando a probabilidade da ocorrência de interações produtivas após a ancoragem inicial da LbAha1 pelo domínio N-terminal na LbHsp90; 2) o *linker* funcionaria como um transdutor de sinal entre os domínios da LbAha1, considerando a perturbação recíproca na estrutura secundária e terciária observada; 3) determinadas conformações preferenciais, quando da interação entre proteínas parceiras, poderiam ser especificadas pelo *linker*; e 4) a possível interação do *linker* com a Hsp90 também deve ser considerada. Embora diferentes hipóteses sejam propostas, a coexistência de duas ou mais delas pode ser especulada. Nem a interação do domínio LbAha1N (Figura 27, 4), tampouco do domínio LbAha1C, ou ambos os domínios desconectados (Figura 27, 5), foram capazes de direcionar a LbHsp90 para o estado fechado, consequentemente, falhando em estimular sua atividade de hidrólise do ATP.

Diferenças podem ser encontradas entre o mecanismo proposto e os sistemas de humano e de levedura. Nestes organismos, a presença de apenas um ou outro domínio é capaz de estimular a atividade ATPásica da Hsp90, embora em menor grau do que a proteína inteira (Horvat et al, 2014; Koulov et al, 2010; Meyer et al, 2004; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010). Em levedura, apenas o domínio Aha1N é reportado como capaz de estimular a Hsp90 (Horvat et al, 2014; Meyer et al, 2004; Panaretou et al, 2002; Retzlaff et al, 2010), enquanto que em humano o domínio Aha1C é capaz de estimular a Hsp90 (Koulov et al, 2010). Em comum, as proteínas Aha1 de *L. braziliensis*, levedura e humano possuem organização de domínios canônica e o núcleo de interação Aha1-Hsp90 reside na associação entre o domínio Aha1N e o domínio M da Hsp90. Recentemente, a caracterização de duas proteínas Aha1 de protozoários (*P. falciparum* e de *E. histolytica*) mostram diferentes organizações de domínios e de mecanismo de interação/estimulação da Hsp90. Neste contexto, o trabalho aqui apresentado, além de caracterizar estruturalmente a LbAha1, mapear as regiões de interação do complexo LbAha1-LbHsp90 e identificar o *linker* da LbAha1 como uma nova região essencial para a funcionalidade da proteína, direciona para a existência de diferenças espécie-específicas nos mecanismos de atuação da Aha1 sobre a Hsp90. Tais

diferenças podem ser cruciais para a compreensão do mecanismo funcional da Hsp90 em protozoários, inclusive visando esta chaperona molecular e/ou suas co-chaperonas como alvo terapêutico.

Figura 27 – Mecanismo molecular proposto de interação da LbAha1 com a LbHsp90. Baseados nos experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, calorimetria de titulação isotérmica e cinética enzimática, o seguinte modelo é proposto para o sistema LbAha1-LbHsp90 (discutido em detalhes no texto). É importante destacar que a conexão entre os domínios da LbAha1, via *linker*, além de conferir flexibilidade, é essencial para o mecanismo de ação desta co-chaperona no encaminhamento da LbHsp90 para o estado fechado e consequente estimulação da atividade ATPásica.

Fonte: Autoria própria

3 CONCLUSÕES

- A LbAha1 possui organização canônica (domínios Aha1N e Aha1C conectados por um *linker* desordenado), porém baixa conservação na sequência de aminoácidos, a exceção do motivo RKXX.
- A LbAha1 e a LbHsp90 são expressas a 26 °C e 37 °C em células de *L. braziliensis*. Embora especulativo, a LbAha1 poderia sofrer modificações pós-traducionais *in vivo*.
- A proteína LbAha1 intacta, bem como os domínios LbAha1N e LbAha1C, foram obtidos com pureza >95%, solúveis e enovelados.
- Os domínios da LbAha1 apresentam estabilidades térmicas se químicas distintas, enovelam-se independentemente, mas influenciam-se reciprocamente.
- A LbAha1 e as construções LbAha1N e LbAha1C são monoméricas, alongadas e existem como apenas uma espécie em solução. Em adição, ambos os domínios são similares hidrodinamicamente.
- A elevada dinâmica conformacional, conferida pelo *linker* flexível, e dimensões da LbAha1 são compatíveis com o mecanismo assimétrico de interação com os domínios N e M da LbHsp90, na forma *cis* ou *trans*.
- Os domínios da LbAha1 não se dimerizam, ainda que em baixa afinidade ou de forma inespecífica.
- A LbAha1 não é capaz de ligar e prevenir a agregação de proteínas-modelo desenoveladas.
- A interação da LbAha1 com a LbHsp90 ocorre com afinidade de baixo micromolar, com estequiometria de 2 moléculas de LbAha1 por dímero de LbHsp90. Sendo assim, cada molécula de LbAha1 poderia se associar a interfaces opostas do dímero de LbHsp90.
- O cerne da associação LbAha1-LbHsp90 ocorre entre os domínios N-terminal da LbAha1 e M da LbHsp90 por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio.
- A LbAha1 direciona o equilíbrio conformacional da LbHsp90 para o estado fechado.
- O encaminhamento da LbHsp90 para o estado fechado é dependente da presença do *linker* que conecta os domínios LbAha1N e LbAha1C.

- A LbAha1 estimula a atividade ATPásica da LbHsp90 em, aproximadamente, 10 vezes por meio de um mecanismo cooperativo positivo.
- A estimulação da atividade ATPásica da LbHsp90 somente ocorre com a proteína LbAha1 intacta. Os domínios LbAha1N e LbAha1C falham em estimular a LbHsp90.
- A conexão entre os domínios LbAha1N e LbAha1C é essencial para a atividade da LbAha1, seja no encaminhamento da LbHsp90 para o estado fechado ou na estimulação de sua atividade ATPásica. Assim, propomos o *linker* como uma nova região crítica para a função da LbAha1.

4 REFERÊNCIAS

- Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH (2006) Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **440**: 1013-1017
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WHOLC (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one* **7**: e35671
- Angeletti PC, Walker D, Panganiban AT (2002) Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell stress & chaperones* **7**: 258-268
- Armstrong H, Wolmarans A, Mercier R, Mai B, LaPointe P (2012) The co-chaperone Hch1 regulates Hsp90 function differently than its homologue Aha1 and confers sensitivity to yeast to the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922. *PloS one* **7**: e49322
- Arndt V, Rogon C, Hohfeld J (2007) To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**: 2525-2541
- Ashraf GM, Greig NH, Khan TA, Hassan I, Tabrez S, Shakil S, Sheikh IA, Zaidi SK, Akram M, Jabir NR, Firoz CK, Naeem A, Alhazza IM, Damanhour GA, Kamal MA (2014) Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS & neurological disorders drug targets* **13**: 1280-1293
- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gardner MJ, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Hertz-Fowler C, Houston R, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Logan FJ, Miller JA, Mitra S, Myler PJ, Nayak V, Pennington C, Phan I, Pinney DF, Ramasamy G, Rogers MB, Roos DS, Ross C, Sivam D, Smith DF, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ, Subramanian S, Thibodeau R, Tivey A, Treatman C, Velarde G, Wang HM (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* **38**: D457-D462
- Barrott JJ, Haystead TA (2013) Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *Febs J* **280**: 1381-1396
- Batista FAH, Almeida GS, Seraphim TV, Silva KP, Murta SMF, Barbosa LRS, Borges JUC (2015) Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. *Febs J* **282**: 388-406
- Beattie L, Kaye PM (2011) *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cellular microbiology* **13**: 1659-1667
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* **3**: 1811-1829

- Berg M, Michalowski A, Palzer S, Rupp S, Sohn K (2014) An In Vivo Photo-Cross-Linking Approach Reveals a Homodimerization Domain of Aha1 in *S. cerevisiae*. *PLoS one* **9**
- Bernado P, Mylonas E, Petoukhov MV, Blackledge M, Svergun DI (2007) Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* **129**: 5656-5664
- Biamonte MA, Van de Water R, Arndt JW, Scannevin RH, Perret D, Lee WC (2010) Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. *Journal of medicinal chemistry* **53**: 3-17
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology* **294**: 1351-1362
- Borges JC, Fischer H, Craievich AF, Ramos CH (2005) Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. DJA1 from subfamily A and DJB4 from subfamily B have different quaternary structures. *The Journal of biological chemistry* **280**: 13671-13681
- Borges JC, Ramos CH (2005) Protein folding assisted by chaperones. *Protein and peptide letters* **12**: 257-261
- Bozaykut P, Ozer NK, Karademir B (2014) Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free radical biology & medicine* **77**: 195-209
- Brandau S, Dresel A, Clos J (1995) High Constitutive Levels of Heat-Shock Proteins in Human-Pathogenic Parasites of the Genus *Leishmania*. *Biochem J* **310**: 225-232
- Brandvold KR, Morimoto RI (2015) The Chemical Biology of Molecular Chaperones-Implications for Modulation of Proteostasis. *Journal of molecular biology*
- Cano LQ, Lavery DN, Bevan CL (2013) Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology* **369**: 52-62
- Canuto GA, da Cruz PL, Faccio AT, Klassen A, Tavares MF (2015) Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. *Electrophoresis*
- Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12524-12529
- Chua CS, Low H, Goo KS, Sim TS (2010) Characterization of *Plasmodium falciparum* co-chaperone p23: its intrinsic chaperone activity and interaction with Hsp90. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1675-1686
- Chua CS, Low H, Lehming N, Sim TS (2012) Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**: 233-245
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature cell biology* **3**: 93-96

Corrêa DHA, Ramos CHI (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* **3**: 9

Cunningham CN, Krukenberg KA, Agard DA (2008) Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *The Journal of biological chemistry* **283**: 21170-21178

da Silva KP, Borges JC (2011) The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotrophic allosteric mechanism. *Protein Pept Lett* **18**: 132-142

Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, Pratt WB (1997) 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. *The Journal of biological chemistry* **272**: 21213-21220

Dostalova A, Volf P (2012) Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors* **5**: 276

Dunn Diana M, Woodford Mark R, Truman Andrew W, Jensen Sandra M, Schulman J, Caza T, Remillard Taylor C, Loisel D, Wolfgeher D, Blagg Brian SJ, Franco L, Haystead Timothy A, Daturpalli S, Mayer Matthias P, Trepel Jane B, Morgan Rhodri ML, Prodromou C, Kron Stephen J, Panaretou B, Stetler-Stevenson William G, Landas SK, Neckers L, Bratslavsky G, Bourboulia D, Mollapour M (2015) c-Abl Mediated Tyrosine Phosphorylation of Aha1 Activates Its Co-chaperone Function in Cancer Cells. *Cell Reports*: no prelo

Echeverria PC, Figueras MJ, Vogler M, Kriehuber T, de Miguel N, Deng B, Dalmaso MC, Matthews DE, Matrajt M, Haslbeck M, Buchner J, Angel SO (2010) The Hsp90 co-chaperone p23 of *Toxoplasma gondii*: Identification, functional analysis and dynamic interactome determination. *Mol Biochem Parasit* **172**: 129-140

Eckl JM, Richter K (2013) Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights. *International journal of biochemistry and molecular biology* **4**: 157-165

Eisenberg D, Luthy R, Bowie JU (1997) VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Method Enzymol* **277**: 396-404

Fink AL (2005) Natively unfolded proteins. *Current opinion in structural biology* **15**: 35-41

Fischer H, Neto MD, Napolitano HB, Polikarpov I, Craievich AF (2010) Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *Journal of Applied Crystallography* **43**: 101-109

Flynn JM, Mishra P, Bolon DN (2015) Mechanistic Asymmetry in Hsp90 Dimers. *Journal of molecular biology*

Folgueira C, Requena JM (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS microbiology reviews* **31**: 359-377

- Forget KJ, Tremblay G, Roucou X (2013) p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. *PloS one* **8**: e69242
- Ghosh S, Shinogle HE, Garg G, Vielhauer GA, Holzbeierlein JM, Dobrowsky RT, Blagg BS (2015) Hsp90 C-terminal inhibitors exhibit antimigratory activity by disrupting the Hsp90alpha/Aha1 complex in PC3-MM2 cells. *ACS chemical biology* **10**: 577-590
- Gitau GW, Mandal P, Blatch GL, Przyborski J, Shonhai A (2012) Characterisation of the Plasmodium falciparum Hsp70-Hsp90 organising protein (PfHop). *Cell stress & chaperones* **17**: 191-202
- Gong H, Yang X, Zhao Y, Petersen RB, Liu X, Liu Y, Huang K (2015) Amyloidogenicity of p53: a hidden link between protein misfolding and cancer. *Current protein & peptide science* **16**: 135-146
- Gross SP (2004) Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport. *Physical biology* **1**: R1-11
- Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K (2009) The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *The Journal of biological chemistry* **284**: 22559-22567
- Harst A, Lin H, Obermann WM (2005) Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *The Biochemical journal* **387**: 789-796
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858
- Hatherley R, Clitheroe CL, Faya N, Tastan Bishop O (2015) Plasmodium falciparum Hop: detailed analysis on complex formation with Hsp70 and Hsp90. *Biochemical and biophysical research communications* **456**: 440-445
- Hawle P, Siepmann M, Harst A, Siderius M, Reusch HP, Obermann WM (2006) The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Molecular and cellular biology* **26**: 8385-8395
- Hessling M, Richter K, Buchner J (2009) Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nature structural & molecular biology* **16**: 287-293
- Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**: 589-598
- Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S, Workman P (2008) Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer research* **68**: 1188-1197
- Hong DS, Banerji U, Tavana B, George GC, Aaron J, Kurzrock R (2013) Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer treatment reviews* **39**: 375-387

Horvat NK, Armstrong H, Lee BL, Mercier R, Wolmarans A, Knowles J, Spyropoulos L, LaPointe P (2014) A mutation in the catalytic loop of Hsp90 specifically impairs ATPase stimulation by Aha1p, but not Hch1p. *Journal of molecular biology* **426**: 2379-2392

Hotez PJ (2014) Ten global "hotspots" for the neglected tropical diseases. *PLoS neglected tropical diseases* **8**: e2496

Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**: 225-236

Itoh H, Ogura M, Komatsuda A, Wakui H, Miura AB, Tashima Y (1999) A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone HSP90. *The Biochemical journal* **343 Pt 3**: 697-703

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**: 407-410

Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 579-592

Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* **36**: 1277-1282

Koulov AV, LaPointe P, Lu B, Razvi A, Coppinger J, Dong MQ, Matteson J, Laister R, Arrowsmith C, Yates JR, 3rd, Balch WE (2010) Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Molecular biology of the cell* **21**: 871-884

Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA, Agard DA (2011) Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys* **44**: 229-255

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948

Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291

Leavitt S, Freire E (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology* **11**: 560-566

Leiriao P, Rodrigues CD, Albuquerque SS, Mota MM (2004) Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. *EMBO reports* **5**: 1142-1147

Lepvrier E, Moullintraffort L, Nigen M, Goude R, Allegro D, Barbier P, Peyrot V, Thomas D, Nazabal A, Garnier C (2015) Hsp90 Oligomers Interacting with the Aha1 Cochaperone: An Outlook for the Hsp90 Chaperone Machineries. *Analytical chemistry*

Li J, Buchner J (2013) Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomedical journal* **36**: 106-117

Li J, Richter K, Reinstein J, Buchner J (2013a) Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. *Nature structural & molecular biology* **20**: 326-331

Li J, Soroka J, Buchner J (2012) The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 624-635

Li W, Zeng J, Li Q, Zhao L, Liu T, Bjorkholm M, Jia J, Xu D (2010) Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Molecular cancer* **9**: 132

Li Z, Hartl FU, Bracher A (2013b) Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. *Nature structural & molecular biology* **20**: 929-935

Lieutaud P, Canard B, Longhi S (2008) MeDor: a metaserver for predicting protein disorder. *BMC Genomics* **9 Suppl 2**: S25

Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM (2003) Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *The Journal of biological chemistry* **278**: 17228-17235

Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ (2009) Targeting HSP90 for cancer therapy. *British journal of cancer* **100**: 1523-1529

Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM (2000) The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *The Journal of biological chemistry* **275**: 37181-37186

Matrangolo FS, Liarte DB, Andrade LC, de Melo MF, Andrade JM, Ferreira RF, Santiago AS, Pirovani CP, Silva-Pereira RA, Murta SM (2013) Comparative proteomic analysis of

antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and biochemical parasitology* **190**: 63-75

Mayer MP, Le Breton L (2015) Hsp90: breaking the symmetry. *Molecular cell* **58**: 8-20

McLaughlin SH, Sobott F, Yaol ZP, Zhang W, Nielsen PR, Grossmann JG, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2006) The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J Mol Biol* **356**: 746-758

Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular cell* **11**: 647-658

Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (2004) Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *The EMBO journal* **23**: 1402-1410

Mickler M, Hessling M, Ratzke C, Buchner J, Hugel T (2009) The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 281-286

Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L (2013) The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current pharmaceutical design* **19**: 347-365

Mollapour M, Bourboulia D, Beebe K, Woodford MR, Polier S, Hoang A, Chelluri R, Li Y, Guo A, Lee MJ, Fotooh-Abadi E, Khan S, Prince T, Miyajima N, Yoshida S, Tsutsumi S, Xu W, Panaretou B, Stetler-Stevenson WG, Bratslavsky G, Trepel JB, Prodromou C, Neckers L (2014) Asymmetric Hsp90 N domain SUMOylation recruits Aha1 and ATP-competitive inhibitors. *Molecular cell* **53**: 317-329

Mollapour M, Tsutsumi S, Truman AW, Xu W, Vaughan CK, Beebe K, Konstantinova A, Vourganti S, Panaretou B, Piper PW, Trepel JB, Prodromou C, Pearl LH, Neckers L (2011) Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Molecular cell* **41**: 672-681

Morales MA, Watanabe R, Dacher M, Chafey P, Osorio y Fortea J, Scott DA, Beverley SM, Ommen G, Clos J, Hem S, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Spath GF (2010) Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 8381-8386

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577

Narlikar GJ, Herschlag D (1997) Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annual review of biochemistry* **66**: 19-59

Nathan DF, Vos MH, Lindquist S (1999) Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1409-1414

- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K (1995) Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *European journal of biochemistry / FEBS* **233**: 1-8
- Niedzwiecka A, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Sonenberg N, Stolarski R (2002) Positive heat capacity change upon specific binding of translation initiation factor eIF4E to mRNA 5' cap. *Biochemistry-Us* **41**: 12140-12148
- Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *The Journal of cell biology* **143**: 901-910
- Onuoha SC, Couistock ET, Grossmann JG, Jackson SE (2008) Structural studies on the co-chaperone hop and its complexes with Hsp90. *J Mol Biol* **379**: 732-744
- Ortega A, Amoros D, Garcia de la Torre J (2011) Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophysical journal* **101**: 892-898
- Owen BA, Sullivan WP, Felts SJ, Toft DO (2002) Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus. *The Journal of biological chemistry* **277**: 7086-7091
- Pallavi R, Acharya P, Chandran S, Daily JP, Tatu U (2010a) Chaperone expression profiles correlate with distinct physiological states of Plasmodium falciparum in malaria patients. *Malaria journal* **9**: 236
- Pallavi R, Roy N, Nageshan RK, Talukdar P, Pavithra SR, Reddy R, Venketesh S, Kumar R, Gupta AK, Singh RK, Yadav SC, Tatu U (2010b) 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. *The Journal of biological chemistry* **285**: 37964-37975
- Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO journal* **17**: 4829-4836
- Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Molecular cell* **10**: 1307-1318
- Patki JM, Pawar SS (2013) HSP90: chaperone-me-not. *Pathology oncology research : POR* **19**: 631-640
- Pearl LH, Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual review of biochemistry* **75**: 271-294
- Pierce MM, Raman CS, Nall BT (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**: 213-221

Powers MV, Workman P (2007) Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *Febs Lett* **581**: 3758-3769

Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y (2008) The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *The Journal of biological chemistry* **283**: 22885-22889

Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *Embo J* **18**: 754-762

Rafati S, Kamhawi S, Valenzuela JG, Ghanei M (2015) Building Research and Development Capacity for Neglected Tropical Diseases Impacting Leishmaniasis in the Middle East and North Africa: A Case Study. *PLoS neglected tropical diseases* **9**: e0003695

Ramirez CA, Requena JM, Puerta CJ (2013) Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. *Bmc Genomics* **14**

Ratzke C, Berkemeier F, Hugel T (2012) Heat shock protein 90's mechanochemical cycle is dominated by thermal fluctuations. *P Natl Acad Sci USA* **109**: 161-166

Ratzke C, Hellenkamp B, Hugel T (2014) Four-colour FRET reveals directionality in the Hsp90 multicomponent machinery. *Nature communications* **5**: 4192

Renner M, Melki R (2014) Protein aggregation and prionopathies. *Pathologie-biologie* **62**: 162-168

Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, Kessler H, Richter K, Buchner J (2010) Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Molecular cell* **37**: 344-354

Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**: 276-277

Richter K, Soroka J, Skalniak L, Leskovar A, Hessling M, Reinstein J, Buchner J (2008) Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *The Journal of biological chemistry* **283**: 17757-17765

Richter K, Walter S, Buchner J (2004) The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *Journal of molecular biology* **342**: 1403-1413

Rohl A, Tippel F, Bender E, Schmid AB, Richter K, Madl T, Buchner J (2015) Hop/Sti1 phosphorylation inhibits its co-chaperone function. *EMBO reports* **16**: 240-249

Saibil H (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 630-642

- Salotra P, Ralhan R, Bhatnagar R (1994) Differential expression of stress proteins in virulent and attenuated promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biochemistry and molecular biology international* **33**: 691-697
- Sancho-Martinez SM, Prieto-Garcia L, Prieto M, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ (2012) Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacology & therapeutics* **136**: 35-55
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210
- Schuck P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys J* **78**: 1606-1619
- Seraphim TV, Alves MM, Silva IM, Gomes FER, Silva KP, Murta SMF, Barbosa LRS, Borges JC (2013) Low Resolution Structural Studies Indicate that the Activator of Hsp90 ATPase 1 (Aha1) of *Leishmania braziliensis* Has an Elongated Shape Which Allows Its Interaction with Both N- and M-Domains of Hsp90. *PloS one* **8**
- Seraphim TV, Gava LM, Mokry DZ, Cagliari TC, Barbosa LRS, Ramos CHI, Borges JC (2015) The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function. *Arch Biochem Biophys* **565**: 57-67
- Seraphim TV, Ramos CHI, Borges JC (2014) The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania Parasites. In *The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation*, Houry WA (ed), Vol. 1, 17, pp 445-481. Springer New York
- Shapira M, McEwen JG, Jaffe CL (1988) Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *The EMBO journal* **7**: 2895-2901
- Shonhai A, Maier AG, Przyborski JM, Blatch GL (2011) Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept Lett* **18**: 143-157
- Siligardi G, Hu B, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2004) Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* **279**: 51989-51998
- Silva KP, Seraphim TV, Borges JC (2013) Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. *Biochimica et biophysica acta* **1834**: 351-361
- Singh M, Shah V, Tatu U (2014) A novel C-terminal homologue of Aha1 co-chaperone binds to heat shock protein 90 and stimulates its ATPase activity in *Entamoeba histolytica*. *Journal of molecular biology* **426**: 1786-1798
- Smith HL, Li W, Cheetham ME (2015) Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Seminars in cell & developmental biology* **40**: 142-152

Soti C, Racz A, Csermely P (2002) A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *The Journal of biological chemistry* **277**: 7066-7075

Southworth DR, Agard DA (2008) Species-Dependent Ensembles of Conserved Conformational States Define the Hsp90 Chaperone ATPase Cycle. *Mol Cell* **32**: 631-640

Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**: 239-250

Sun L, Hartson SD, Matts RL (2015) Identification of proteins associated with Aha1 in HeLa cells by quantitative proteomics. *Biochimica et biophysica acta* **1854**: 365-380

Sun L, Prince T, Manjarrez JR, Scroggins BT, Matts RL (2012) Characterization of the interaction of Aha1 with components of the Hsp90 chaperone machine and client proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1092-1101

Svergun DI (1992) Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *Journal of Applied Crystallography* **25**: 495-503

Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical journal* **76**: 2879-2886

Terada K, Oike Y (2010) Multiple molecules of Hsc70 and a dimer of DjA1 independently bind to an unfolded protein. *The Journal of biological chemistry* **285**: 16789-16797

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680

Tirol-Cepeda AO, Ramos CH (2011) An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Pept Lett* **18**: 101-109

Tosoni K, Costa A, Sarno S, D'Alessandro S, Sparla F, Pinna LA, Zottini M, Ruzzene M (2011) The p23 co-chaperone protein is a novel substrate of CK2 in Arabidopsis. *Molecular and cellular biochemistry* **356**: 245-254

Tripathi V, Darnauer S, Hartwig NR, Obermann WM (2014) Aha1 can act as an autonomous chaperone to prevent aggregation of stressed proteins. *The Journal of biological chemistry* **289**: 36220-36228

Van der Ploeg LH, Giannini SH, Cantor CR (1985) Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* **228**: 1443-1446

Volkov VV, Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* **36**: 860-864

Wandinger SK, Richter K, Buchner J (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry* **283**: 18473-18477

- Wang X, Lu XA, Song X, Zhuo W, Jia L, Jiang Y, Luo Y (2012) Thr90 phosphorylation of Hsp90 α by protein kinase A regulates its chaperone machinery. *The Biochemical journal* **441**: 387-397
- Wegele H, Muller L, Buchner J (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **151**: 1-44
- Wiesiggl M, Clos J (2001a) Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Molecular biology of the cell* **12**: 3307-3316
- Wiesiggl M, Clos J (2001b) The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Medical microbiology and immunology* **190**: 27-31
- Xu W, Mollapour M, Prodromou C, Wang S, Scroggins BT, Palchick Z, Beebe K, Siderius M, Lee MJ, Couvillon A, Trepel JB, Miyata Y, Matts R, Neckers L (2012) Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Molecular cell* **47**: 434-443
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of cell biology* **154**: 267-273
- Young JC, Schneider C, Hartl FU (1997) In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *Febs Lett* **418**: 139-143
- Zhao R, Houry WA (2005) Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **83**: 703-710
- Zhong XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & development* **23**: 482-495
- Zhou YL, Liao JM, Du F, Liang Y (2005) Thermodynamics of the interaction of xanthine oxidase with superoxide dismutase studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. *Thermochim Acta* **426**: 173-178
- Zininga T, Makumire S, Gitau GW, Njunge JM, Pooe OJ, Klimek H, Scheurr R, Raifer H, Prinsloo E, Przyborski JM, Hoppe H, Shonhai A (2015) Plasmodium falciparum Hop (PfHop) Interacts with the Hsp70 Chaperone in a Nucleotide-Dependent Fashion and Exhibits Ligand Selectivity. *PloS one* **10**: e0135326
- Zurawska A, Urbanski J, Matulienė J, Baraniak J, Klejman MP, Filipek S, Matulis D, Bieganski P (2010) Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. *Biochimica et biophysica acta* **1803**: 575-583

5 LISTA DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

As publicações científicas obtidas durante o tempo de doutoramento são apresentadas abaixo. São elas:

- 1) Borges, J.C., **Seraphim, T.V.**, Mokry, D.Z., Almeida, F.C.L., Cyr, D.M., Ramos, C.H.I. (2012). Identification of regions involved in substrate binding and dimer stabilization within the central domains of yeast Hsp40 Sis1. PLoS One, 7 (12), e. 50927.
- 2) Silva, K.P., **Seraphim, T.V.**, Borges, J.C. (2013). Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. Biochimica et Biophysica Acta: Protein and Proteomics, 1834, p. 351-361.
- 3) **Seraphim, T.V.**, Alves, M.M., Silva, I.M., Gomes, F.E.R., Silva, K.P., Murta, S.M.F., Barbosa, L.R.S., Borges, J.C. (2013). Low resolution structural studies indicate that the activator of Hsp90 ATPase 1(Aha1) of *Leishmania braziliensis* has an elongated shape which allows its interaction with both N- and M-domains of Hsp90. PLoS One, 8 (6), e66822.
- 4) **Seraphim, T.V.**, Ramos, C.H.I., Borges, J.C. (2014). The interaction network of Hsp70 and Hsp90 in the *Plasmodium* and *Leishmania* parasites. Em: The molecular chaperones interaction networks in protein folding and degradation (editor: Houry, W.A.), p. 445-481, Springer New York.
- 5) Batista, F.A.H., Almeida, G.S., **Seraphim, T.V.**, Silva, K.P., Murta, S.M.F., Barbosa, L.R.S., Borges, J.C. (2015). Identification of two p23 co-chaperones isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. FEBS Journal, 282 (2), p. 388-406.
- 6) **Seraphim, T.V.**, Gava, L.M., Mokry, D.Z., Cagliari, T.C., Barbosa, L.R., Ramos, C.H., Borges, J.C. (2015). The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function. Archives of Biochemistry and Biophysics, 565, p. 57-67.
- 7) Siqueira, R.P., Barbosa, E.A.A., Polêto, M.D., Righetto, G.L., **Seraphim, T.V.**, Salgado, R.L. ; Ferreira, J.G., Barros, M.V.A., De Oliveira, L.L., Laranjeira, A.B. A., Almeida, M.R., Júnior, A.S., Fietto, J.L.R., Kobarg, J., De Oliveira, E.B., Teixeira, R.R., Borges, J.C., Yunes, J.A., Bressan, G.C. (2015). Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340). PLoS One, 10, e0134882.