UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS

COM ÊNFASE EM QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA

Dissertação de mestrado:

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA
Hsp70/Hsp90 ORGANIZING PROTEIN (Hop) DE
Plasmodium falciparum.

Candidata: Dayane Eliara Bertolino Reis

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2017

DAYANE ELIARA BERTOLINO REIS

Caracterização estrutural da *Hsp70/Hsp90 ORGANIZING
PROTEIN* (Hop) de *Plasmodium falciparum*.

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

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2017

Dedico esse trabalho a pessoa mais preciosa da minha vida. O meu melhor presente. O sorriso mais sincero, o abraço mais gostoso. Meu cansaço mais gratificante. Antes de você, eu não havia experimentado o que era amar de verdade, o que era ter o coração batendo fora do peito. Todo o meu esforço e toda a minha luta é por você, Thomas, meu filho! Te amo mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço imensamente aos meus pais, *Geraldo e Ignez*, pela vida, por todo o incentivo, pela confiança depositada na minha pessoa ao longo dos anos. Por tudo o que vocês abriram mão, por tudo o que sacrificaram para que eu pudesse ser alguém melhor. Obrigada pelo exemplo de homem que você é e ao qual eu tenho o imenso orgulho de chamar de pai. Ao meu irmão, *Diego*, por fazer jus à palavra irmandade e estar sempre presente, me fazendo ver a luz no fim do túnel, não me deixando esmorecer quando tudo parecia perdido. Obrigada por todos os momentos “brotheragem”, por todas as cervejas compartilhadas na sacada do meu ap. Por todas as divagações, por todas as coisas que você me fez enxergar ao longo desse árduo caminho.

Ao meu esposo *Valério*, companheiro de longa data, pai do meu filho, por toda a paciência, tolerância com os meus momentos de stress e nervoso. Não foi fácil, eu sei, foram muitos momentos ruins, muitas ausências, muitas dificuldades, muitas brigas, inclusive, mas você se manteve firme ao meu lado.

Ao meu filho, *Thomas*, a coisa mais linda que poderia ter me acontecido. O amor mais sincero e puro, os sorrisos e abraços que me mantiveram em pé e me fizeram ter forças pra continuar quando a vontade era ceder às adversidades e parar pelo caminho.

Ao meu querido orientador, *Prof. Dr. Júlio Borges*, pela oportunidade. Não poderia ter feito escolha mais acertada, pessoa paciente, presente, extremamente inteligente. Um exemplo como pessoa e como profissional. Obrigada por todo o tempo dedicado, por toda a paciência. Levarei os seus ensinamentos para sempre comigo.

À minha co-orientadora mais linda, *Dra Fernanda Batista*, que me ensinou a dar os “primeiros passos” e mesmo à distância, depois que ficou rica (rs) se manteve presente.

À equipe LBBP, por todo o auxílio, companhia e gordisses ao longo desses dois anos. Agradeço imenso ao Dr. *Paulo Roberto* e ao Dr. *Thiago Seraphim* pelo auxílio na coleta e tratamento dos dados de SAXS. Um agradecimento especial à *Noeli* e *Laudimir*, pela irmandade que se estabeleceu entre nós. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por todas as risadas, por suportarem as minhas crises de meia idade. Vocês são mais que especiais.

À esposa do amigo, vizinha, que se tornou uma inseparável e indispensável amiga e companheira, *Tarcilane*. Obrigada por todas as palavras, todo o companheirismo, é claro, por todos os quitutes preparados com tanto carinho.

Às minhas primas *Daniele Balista* e *Giovanna Santos* e à minha tia *Rita de Cássia*, pelos incentivos e pelo auxílio nas dificuldades técnicas e logísticas, inclusive tomando conta do meu filho inúmeras vezes, durante os períodos de férias.

Às minhas amadas amigas *Tamara Guimarães* e *Mariana Vitulio*, por todos os momentos, todas as risadas, toda compreensão, às vezes em apenas um olhar. Por todo o tempo que vocês me suportam (rs). Vocês não imaginam a falta que me fazem todos os dias nesse instituto. Obrigada por tornarem meu mundo mais colorido.

À amiga e veterana *Bruna Lobo*, pela amizade, risadas fartas, pelos caminhos previamente desbravados, pelas dicas, conselhos e injeções de ânimo.

À “cumadi”- amiga – irmã *Kevllyn Zagato*, que acompanha e apóia essa empreitada louca de nadar contra a correnteza desde o início da graduação. Obrigada por todas as conversas, por estar presente em tantos momentos importantes da minha vida. Por ter sido meu ombro amigo e meu porto seguro no momento em que mais me faltou o chão. Lembra da sua reação quando contei da gravidez (rs)? Obrigada por não deixar que as forças da vida levassem nossos barcos para caminhos separados, embora o tempo seja extremamente curto.

À *Profa. Dra. Fernanda Canduri*, pela supervisão durante o estágio PAE, por toda a abertura que me foi dada como estagiária da disciplina Laboratório de Bioquímica. Foi uma experiência extremamente enriquecedora.

Ao *IQSC – USP* por toda a infraestrutura. À *FAPESP*, *CNPq* e *CAPES* pelo suporte financeiro, que permitiram a realização deste trabalho. Ao *CNPq* pela bolsa de mestrado (processo 131168/2015-0).

À *Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI)* do *IQSC* pela disponibilização de alguns dos equipamentos necessários.

Ao *Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)* e ao *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)*, ambos do *Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM)* pela estrutura disponibilizada para a realização de alguns experimentos.

A todos que, de alguma forma contribuíram e estiveram presentes durante esses dois anos, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A malária é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp*, afeta populações em mais de 100 países ao redor do globo, apresentando 219 milhões de novos casos por ano sendo, portanto, um grave problema de saúde pública. Apresenta um ciclo complexo e digenético, necessitando do mosquito vetor e do hospedeiro vertebrado para se completar - ciclo este que envolve etapas de transformação e adaptação, já que o patógeno passa por 28 formas diferentes ao longo do ciclo, além de enfrentar situações de stress térmico, no momento do contágio e durante os picos febris. Sendo assim, é necessário que o protozoário garanta sua sobrevivência e possibilite a infecção do hospedeiro. Isso é realizado com a assistência de chaperonas moleculares, proteínas estas que são superexpressas no estágio intra-eritrocitário. Uma dessas proteínas é a Hsp90, uma *Heat shock protein* com diferentes funções, entre elas, maturação de proteínas clientes, encaminhamento de proteínas para translocação por membranas e marcação de proteínas para degradação. Para cumprir adequadamente as diversas funções, as Hsp90 contam com o auxílio de co-chaperonas, como a *Hsp70/Hsp90 Organizing Protein* (Hop) que modulam sua função. A Hop é uma co-chaperona do sistema foldossoma formado pelas Hsp70 e Hsp90 citoplasmáticas e que atua como proteína adaptadora transferindo proteínas clientes da primeira para a segunda chaperona molecular. A interação da Hop com Hsp70 e Hsp90 ocorre via domínios TPR, que se ligam ao motivo EEVD presente na extremidade C-terminal de ambas as chaperonas citoplasmáticas. É encontrada em diversos organismos, incluindo *Plasmodium falciparum*, o agente etiológico da malária. Sendo assim, conhecer a Hop de *P. falciparum* (PfHop), estrutural e funcionalmente, é importante para o entendimento do funcionamento das Hsp90 e Hsp70, proteínas essenciais para a sobrevivência do patógeno e, portanto, possíveis alvos terapêuticos. A PfHop recombinante foi obtida com pureza superior a 95%. A caracterização biofísica da mesma foi feita através de diferentes técnicas. Como outras Hops, a PfHop é majoritariamente constituída por hélices alfa. Os parâmetros hidrodinâmicos determinados sugerem que a PfHop se comporta como um equilíbrio monômero-dímero quando em solução. Dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo mostram a PfHop como uma proteína dimérica e alongada. Este trabalho de dissertação de mestrado permitiu alcançar a caracterização estrutural da PfHop e com este conhecimento, espera-se avançar na caracterização funcional da mesma sobre a Hsp70 e Hsp90.

ABSTRACT

Malaria is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* spp, affects populations in more than 100 countries around the globe, presenting 219 million new cases per year and is therefore a serious public health problem. It presents a complex and digenetic cycle, necessitating the vector mosquito and the vertebrate host to complete - this cycle involves transformation and adaptation stages, since the pathogen goes through 28 different forms along the cycle, besides facing situations of thermal stress , At the time of the contagion and during the feverish peaks. Thus, it is necessary that the protozoan guarantees its survival and makes possible a host infection. This is accomplished with the assistance of molecular chaperones, proteins that are overexpressed in the intra-erythrocyte stage. A life of proteins and Hsp90, a protection of thermal shock with different functions, among them, maturation of client proteins, routing of proteins for membrane translocation and labeling of proteins for degradation. To comply properly, for example, as Hsp90 rely on the help of co-chaperones, such as Hsp70 / Hsp90 Organizing Protein (Hop) that modulate their function. The Hop is a co-chaperone system folded by Hsp70 and Hsp90 cytoplasmic and which acts as an adapter protein transferring client proteins from the first to the second molecular chaperone. The interaction of Hop with Hsp70 and Hsp90 occurs via TPR domains, which bind to the EEVD motif present at the C-terminus of both as cytoplasmic chaperones. It is found in several organisms, including *Plasmodium falciparum*, the etiologic agent of malaria. Therefore, knowing a Hop of *P. falciparum* (PfHop), structurally and functionally, is important for the understanding of the functioning of Hsp90 and Hsp70, essential proteins for a pathogen survival and, therefore, in all the therapeutic aspects. A recombinant PfHop was obtained in greater than 95% purity. The biophysical characterization by the same brand made through different techniques. As there is Hops, a PfHop is mostly constituted by alpha helices. The indicated parameters are a PfHop behaves as a monomer-dimer balance when in solution. Higher low-angle X-ray scattering data on PfHop as a dimeric and elongated protein. This work of master's dissertation allowed to reach a structural characterization of the PfHop and with this knowledge, it is expected to advance in the functional characterization of the same in Hsp70 and Hsp90.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida do <i>P. falciparum</i> ..	2
Figura 2: Expressão de diferentes proteínas de choque térmico nos diferentes estágios do ciclo do <i>Plasmodium spp.</i>	4
Figura 3: Estrutura da Hsp70.....	5
Figura 4: Ciclo funcional da Hsp70.....	6
Figura 5: Domínios da Hsp90.....	8
Figura 6: Ciclo conformacional da Hsp90	
Figura 7: (A) Modelo Ab initio da LbHop. (B) Estrutura esquemática da disposição dos domínios da PfHop.	14
Figura 8: Ligação do domínio TPR2A ao motivo MEEVD da Hsp90.....	15
Figura 9: Sistema foldossoma..	11
Figura 10: Alinhamento das sequências referentes aos domínios TPR da Hop	31
Figura 11: Alinhamento da sequência de aminoácidos da PfHop	30
Figura 12: Purificação via SDS-Page 12% da PfHop.....	33
Figura 13: Espectro de CD obtido para a PfHop a 6 μ M..	34
Figura 14: Comparação entre espectros de CD de diferentes concentrações de PfHop.....	36
Figura 15: Desnaturação térmica acompanhada por CD para a PfHop.....	39
Figura 16: Curva de desnaturação térmica para a PfHop.	41
Figura 17: Desnaturação química para a PfHop	42
Figura 18: (A) Padrão de eluição da PfHop com relação as proteínas do padrão (B) Regressão linear do log da MM e do Kav.....	43
Figura 19: Ensaio de velocidade de sedimentação com a PfHop.	Erro! Indicador não definido.
Figura 20: Espectro de fluorescência para a PfHop	Erro! Indicador não definido.
Figura 21: Curvas experimentais de SAXS para a PfHop.....	47
Figura 22: Modelo ab initio obtido através do software DAMMIN para a PfHop	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das proteínas utilizadas neste estudo. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Amostras preparadas para análise da PfHop por fluorescência.....24

Tabela 3: Resultado do alinhamento entre as sequências da Hop de *Homo sapiens* (hHop), *Saccharomices cerevisiae* (yHop), *Leishmania braziliensis* (LbHop) e *Plasmodium falciparum* (PfHop)32

Tabela 4: Quantidade de elementos de estrutura secundária obtidos através do CDNN Deconvolution® e Dichroweb.34

Tabela 5: Resumo dos dados obtidos por aSEC, SAXS e AUC.47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

$\lambda_{\text{máx}}$: Comprimento de onda máximo de emissão, em nanômetros

ϵ : coeficiente de extinção molar, em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Å: Angstrom

ADP: Difosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

AUC: Ultracentrifugação analítica, do inglês *analytical ultracentrifugation*

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

C_m: concentração média de agente desnaturante na transição – concentração na qual 50% das espécies estão enoveladas e 50% desenoveladas

Da: Dalton – unidade de massa atômica

EMR: Elipiticidade molar residual média, em $\text{graus.cm}^3.\text{dmol}^{-1}$

f/f_0 : razão friccional

GndCl: Cloridrato de guanidina

hHop: Hop humana

Hop: Hsp70/Hsp90 Organizing Protein

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

Hsp90: nome genérico da proteína de choque térmico de 90 kDa

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

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

K_a: constante de dissociação

kDa: quilodaltons, equivalente a mil Daltons

LbHop: Hop de *Leishmania braziliensis*

LB: Lysogeny Broth

MM: Massa molecular

n: número estequiométrico

NBD: Domínio de ligação de nucleotídios, do inglês *Nucleotide binding domain*

PBD: Domínio de ligação de peptideos, do inglês *Peptide binding domain*

Pi: ortofosfato inorgânico

PfHop: Hop de *Plasmodium falciparum*

R₀: Raio de uma esfera rígida de mesma massa molecular da proteína de interesse

R_s: Raio de Stokes

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

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida da presença de Dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium dodecyl polyacrilamide gel eletroforesis*

T_m: Temperatura média de desenovelamento

Trp: Triptofano

TPR: *Tetratricopeptide Repeat*

yHop: Hop de *Shacaromices cerevisae*

*“Eu me sentiria mais otimista a respeito de um futuro
brilhante para o homem se ele gastasse menos tempo provando
que pode enganar a natureza e mais tempo sentindo sua doçura
e respeitando sua beleza.”*

WHITE, E. B., 1977

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	III
---------------------	-----

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
Sumário	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Malária	1
1.2. Heat Shock Proteins – Hsp70/Hsp90	4
1.3. Hop	10
1.4. Sistema foldosoma	Erro! Indicador não definido.
2 OBJETIVOS	16
2.1. <i>Objetivos gerais:</i>	16
2.2. <i>Objetivos específicos:</i>	16
3 METODOLOGIA	17
3.1. Propriedades físico-químicas das proteínas em estudo	17
3.2. Identificação das proteínas e alinhamento das sequências de aminoácidos	Erro! Indicador não definido.
3.3. Vetores de expressão	18
3.4. Meio de cultura	19
3.5. Transformação em células competentes	19
3.6. Expressão PfHop recombinante	19
3.7. Purificação da PfHop e PfHopTPR2AB	20
3.7.1. Cromatografia por afinidade	20
3.7.2. Cromatografia por exclusão molecular	20
3.8. Determinação da concentração da proteína	21
3.9. Testes de estabilidade	21
3.10. Caracterização estrutural	21
3.10.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo circular	22
3.10.2. Estudo da estabilidade térmica e química da PfHop	23
3.10.3. Caracterização hidrodinâmica	25
3.10.4. Fluorescência	Erro! Indicador não definido.
3.10.5. Ultracentrifugação analítica	26
3.10.6. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	27

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1.	Estudo da estrutura primária da PfHop	29
4.2.	Expressão e Purificação	32
4.3.	Testes de estabilidade.....	Erro! Indicador não definido.
4.4.	Espectropolarimetria de dicroísmo circular	34
4.4.1.	Desenovelamento térmico acompanhado por CD.	36
4.4.2.	Desenovelamento químico acompanhado por CD.	42
4.5.	Caracterização hidrodinâmica por aSEC.....	43
4.6.	Caracterização hidrodinâmica por Ultracentrifugação analítica	43
4.7.	Fluorescência.....	Erro! Indicador não definido.
4.8.	Espalhamento de raios X a baixo ângulo	46
5	CONCLUSÕES.....	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1. Malária

A malária é uma doença tropical negligenciada, que atinge populações de baixa renda em regiões tropicais, subdesenvolvidas e de baixo IDH. É a protozoonose de maior impacto mundial, atingindo cerca de 100 países e mantendo cerca de 40% da população em áreas de risco. Causada por diferentes espécies de *Plasmodium*, sendo as mais comuns no Brasil, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (GOMES et al., 2011; “www.infectologia.org.br/malaria”, [Acessado em 15/02/2017]). No continente americano, a maior relação casos/ano é encontrada no Brasil, da ordem de 300.000 casos/ano. Segundo a Organização Mundial da Saúde, WHO, cerca de 219 milhões de novos casos são registrados ao redor do mundo, sendo que 660 mil destes pacientes vão a óbito, tornando a malária um grande problema de saúde pública (GOMES et al., 2011; SCHMID et al., 2012; “www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf”, [Acessado em 18/07/2016]).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Infectologia, malária é uma doença infecciosa febril aguda causada por parasita unicelular, caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaleia, que ocorrem em padrões cíclicos, a depender da espécie de parasita infectante (“www.infectologia.org.br/malaria” [acessado em 15/02/2017]). A transmissão se dá pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, popularmente conhecido como mosquito palha, ou por meio do contato com sangue infectado. Após a picada, os parasitas chegam rapidamente ao fígado, onde se reproduzem de forma rápida e intensa. Na sequência, atingem a corrente sanguínea, onde atacam os eritrócitos, destruindo-os (“www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf”).

O ciclo do *P. falciparum* (Figura 1) é complexo, envolvendo etapas de adaptação e transformação, além de digenético, necessitando tanto do mosquito *Anopheles* quanto do hospedeiro vertebrado para se completar (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012). Durante a picada, a fêmea do mosquito transfere os esporozoítos para a corrente sanguínea do hospedeiro, que, por sua vez, migram para o fígado, se alojam nos hepatócitos e se reproduzem assexuadamente, dando origem aos merozoítos, armazenados em cápsulas denominadas esquizontes que, quando liberados na corrente sanguínea, invadem as células vermelhas (revisado em (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014)).

Nos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam num estágio jovem de trofozoíto (*ring-like*) e a transformação segue até que os trofozoítos, uma forma metabolicamente altamente ativa, na qual os parasitas se replicam e novamente formam esquizontes. Os esquizontes maduros rompem a célula e os merozoítos são lançados na corrente sanguínea, infectando novos eritrócitos. Uma pequena fração destes merozoítos se diferencia em gametócitos e podem ser ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles* durante sua alimentação (revisado em (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014; TUTEJA, 2007)), fechando o ciclo.

Figura 1: Ciclo de vida do *P. falciparum*. (1) Esporozoítos são transferidos da fêmea do *Anopheles* para o sangue do hospedeiro mamífero durante a picada, (2) migra para os hepatócitos, (3) sofre reprodução assexuada e forma esquizontes, repletos de merozoítos (4) Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, invadem as células vermelhas e (5) se transformam primeiramente em trofozoítos jovens anelares (*ring-like*), posteriormente em (6) trofozoítos maduros e novamente em (7) merozoítos, que podem se romper e (8a) infectar novos eritrócitos. Parte deles sofre reprodução sexuada, formando gametócitos (8b) que são ingeridos pelo mosquito durante a picada. No organismo do *Anopheles*, os (9) gametócitos se tornam novamente esporozoítos, reiniciando o ciclo. Importante ressaltar as mudanças de temperatura que ocorrem durante o ciclo (círculos em vermelho).

Fonte: Adaptado de (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014)

A principal manifestação clínica da malária é a febre, que coincide com o rompimento dos esquizontes ou das hemácias e a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, podendo o paciente apresentar também vômito, diarreia, dor abdominal, falta de apetite, tontura e fadiga (FREITAS et al., 2007). A gravidade do caso dependerá da espécie de parasita envolvida, sendo a mais grave causada por *P. falciparum*, considerada uma emergência médica (“www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf”).

O tratamento da malária atualmente utilizado consiste no uso de terapia combinada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) de fármacos derivados da artemisinina, além de quinino, esquizonticidas eritrocitários, que visam diminuir a parasitemia, fator determinante para a gravidade. Ambos são causadores de efeitos colaterais graves, como cinchonismo (tinido, déficit auditivo transitório, tremores e distúrbios visuais), epigastralgia, náuseas e vômitos, além de hipoglicemia quando em doses altas (FREITAS et al., 2007; GOMES et al., 2011; LINDOSO; LINDOSO, 2009). O fato dos medicamentos atualmente utilizados causarem diversos efeitos colaterais, aliado ao fato de que a malária é um problema de saúde pública, e ao fato do protozoário ter adquirido resistência a esses fármacos ao longo do tempo, torna urgente a prospecção e obtenção de novos tipos de tratamento (BLAIR et al., 2001).

Como anteriormente mencionado, o ciclo de vida do *Plasmodium spp.* exige adaptação constante do mesmo, já que passa por estágios nos quais ocorre aumento significativo de temperatura, como na passagem dos esporozoítos do mosquito (~25 °C) para o hospedeiro vertebrado (~37°C), ou rompimento dos esquizontes, ocasiona picos febris e faz com que a temperatura do hospedeiro possa alcançar os 41 °C. Além disso, exige do mesmo transformação, pois ao longo do ciclo, o parasito passa por mais de 20 formas evolutivas. É necessário manter a homeostase celular, permitindo a sobrevivência do patógeno.

Umas das proteínas que desempenham essa função são as chaperonas moleculares, classe de proteínas que interagem, estabilizam ou auxiliam outras proteínas a adquirir sua conformação funcionalmente ativa, sem estar presente na conformação final da mesma, classe na qual as *Heat Shock Proteins* (Hsps) podem estar incluídas (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Na Figura 2, observa-se a superexpressão de algumas Hsps em diferentes estágios do ciclo do *Plasmodium spp.* Observa-se uma super-expressão de chaperonas moleculares no estágio intra-eritrocitário, quando comparado ao estágio esporozoítico, sugerindo que as Hsps podem ser induzidas justamente durante a transformação do parasita de esporozoíto para merozoíto, na transmissão do mosquito vetor para o hospedeiro vertebrado, mostrando que as mesmas são essenciais para o processo de transformação, ajudando no desenvolvimento e adaptação do patógeno ao novo ambiente (PAVITHRA; KUMAR; TATU, 2007).

Figura 2: Expressão de diferentes proteínas de choque térmico nos diferentes estágios do ciclo do *Plasmodium spp.* Verifica-se uma alta expressão delas no estágio trofozoítico, fase eritrocitária, incluindo a Hsp90 e Hsp70 das quais a PfHop, alvo deste trabalho, é uma co-chaperona. O fato de ocorrer a superexpressão das Hsps justamente no momento da transmissão do patógeno pode ser um indicativo da sua importância no processo de desenvolvimento e adaptação do mesmo ao novo ambiente.

Fonte: (PAVITHRA; KUMAR; TATU, 2007)

1.2. Heat Shock Proteins – Hsp70/Hsp90

Em 1962 foi realizado um experimento no qual se verificou que células retiradas das glândulas salivares de *Drosophila buskii* e submetidas ao calor resultava no surgimento, nos cromossomos, de um novo padrão de espessamento, que representava sítios específicos de transcrição para a síntese proteica. O estresse térmico induzia a expressão dos genes que faziam com que as células estressadas produzissem uma grande quantidade de uma determinada classe de proteínas, mais tarde, denominadas Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*) (RITOSSA, F.; MITTEILUNGEN, 1962). Posteriormente, foi constatado que o fenômeno verificado para as células das glândulas salivares da mosca é um fato universal – conforme aumentava o estresse celular, aumentava-se a expressão das Hsps e a proteção se dava por meio da atuação delas como chaperonas moleculares, impedindo as proteínas parcialmente desnaturadas pelo choque térmico de agregarem além de aumentar a depuração das proteínas já desnaturadas de dentro das células (JÄÄTELÄ, M.; WISSING, 1992).

As Hsps são uma classe de proteínas altamente conservadas em organismos distintos, desde bactérias até o homem. Podem ser divididas em famílias, de acordo com a massa molecular e sequência de aminoácidos. Possuem funções essenciais no controle de qualidade das proteínas celulares, atuando ativamente na proteção celular em situações de estresse, mantendo a conformação e estabilidade proteica (ALVIRA et al., 2014; MEYER; SILVA, 1999) (Borges & Ramos, 2004).

A família mais comum de Hsps é conhecida como Hsp70 (Figura 3) monomérica, com aproximadamente 70 kDa, distribuídos em dois domínios, um N-terminal, de aproximadamente 45 kDa, conhecido como domínio de ligação ao nucleotídeo (DLN) e um C-terminal, de aproximadamente 25 kDa, conhecido como domínio de ligação ao peptídeo (DLP).

Figura 3: Estrutura da Hsp70, evidenciando dois domínios, N-terminal (DLN) de 45 kDa e um C-terminal (DLP) de 25 kDa, que contém o motivo EEVD, responsável pela ligação às co-chaperonas que contenham domínios TPR.

Fonte: Adaptado de (SAIBIL, 2013)

Atuam em quase todos os processos relacionados à homeostase celular, incluindo enovelamento de proteínas recém-sintetizadas, transporte através de membranas, exportação/importação de e para o núcleo, marcação de proteínas para a degradação, prevenção da agregação de proteínas e desagregação das já agregadas, exocitose, além de outras funções não relacionadas ao enovelamento proteico (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). São encontradas em diversos compartimentos celulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, citosol, núcleo e lisossomo. Tem como clientes, proteínas não enoveladas, parcialmente enoveladas ou enoveladas incorretamente, tendo sua afinidade por

estas regida pela ligação ao ATP. Atua como uma *foldase* - proteínas que auxiliam no enovelamento ou re-enovelamento de proteínas clientes, prevenindo a agregação e a desnaturação irreversível (MEYER; SILVA, 1999; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Quando ligada ao ATP, a Hsp70 assume uma conformação aberta, na qual o sítio hidrofóbico de ligação ao peptídeo cliente fica exposto, ligando-se provisoriamente às regiões hidrofóbicas expostas de uma proteína alvo desenovelada, enovelada parcialmente ou incorretamente, liberando e liberando rapidamente a proteína cliente enquanto o ATP estiver ligado. A hidrólise do mesmo faz com que a chaperona assume uma conformação fechada que se liga à proteína cliente com afinidade maior. Essa ligação mais forte parece facilitar o enovelamento da proteína alvo, impedindo-a de agregar com outras proteínas desnaturadas (JUNQUEIRA, 2012) (da Silva & Borges, 2011, Batista et al., 2015). A troca do ADP ligado por ATP resulta numa mudança conformacional na chaperona que resultará na liberação da proteína cliente. Se a proteína tiver sido enovelada corretamente, ela não mais conseguirá se ligar à Hsp70, enquanto que o enovelamento incorreto permite uma religação da mesma à chaperona, fornecendo uma segunda oportunidade para que a proteína adquira a sua forma necessária (JUNQUEIRA, 2012) (da Silva & Borges, 2011, Batista et al., 2015). O ciclo funcional da Hsp70 está ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Ciclo funcional da Hsp70. A J - protein, co-chaperona da Hsp70, recruta a proteína cliente a a leva até a Hsp70, que se encontra na sua conformação aberta. A ligação a proteína cliente nesse estágio é de baixa afinidade. A hidrólise do ATP leva a Hsp70 a uma conformação fechada, aumentando afinidade pela proteína cliente ligada, o que permite o enovelamento da mesma. No estado ADP ligado, este complexo formado por Hsp70 + J - protein + proteína cliente pode (1) se ligar a outra co-chaperona, como a Hop e ser encaminhado à maquinaria da Hsp90, ao proteassoma ou ao transporte intermembrana, (2) O domínio NBD libera o ADP, através da estimulação do Fator de troca de nucleotídeo (NEF) permitindo a ligação com o ATP novamente, levando a Hsp70 ao estado aberto e liberando a proteína cliente enovelada. A atividade ATPásica do domínio NBD, é responsável pela transição entre o estado aberto e/ou fechado da Hsp70.

Fonte: Adaptado de (BATISTA et al., 2015)

A Hsp70 também é capaz de transferir (através de co-chaperonas) proteínas clientes para outras chaperonas, entre elas a Hsp90, utilizando para tanto o motivo EEVD, presente na sua região C-terminal. O complexo formado por Hsp70 + J-proteína + proteína cliente é recrutado para o sistema da Hsp90 através de co-chaperonas (Hop, Tom70, SGT ou CHIP) que se ligam ao motivo EEVD e transferem a proteína cliente para a maquinaria da Hsp90 (BATISTA et al., 2015).

As chaperonas da família Hsp90 são muito conhecidas e presentes em todos os organismos, exceto em *Archea* (LODISH, BERK, KAISER, 2014). Em eucariotos, existem distintas Hsp90 localizadas em diferentes organelas. A Hsp90 é essencial para o crescimento de células eucarióticas e importante para a manutenção da conformação, estabilidade e função de uma grande variedade de proteínas (TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). Ao contrário das Hsp70, a Hsp90 é dimérica, possui aproximadamente 90 kDa e três domínios, um N-terminal, de aproximadamente 30 kDa, que contém um sítio de ligação ao ATP, seguido por uma região carregada e flexível, de tamanho variado e envolvida tanto com a dimerização quanto com regulação da atividade ATPásica. O domínio M, localizado na região intermediária (~35 kDa), é flexível e possui vários sítios de ligação para proteínas clientes e co-chaperonas. O domínio C-terminal, de ~20 kDa, é responsável pela dimerização permanente da proteína (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Ambos os domínios, C- e N-terminal estão envolvidos com a ligação a proteínas cliente, as quais são influenciadas pela ligação com nucleotídeos localizado no domínio N. A função da Hsp90 é regulada e dirigida por uma associação dinâmica com suas co-chaperonas (Hop, p23, Aha1, entre outras) e proteínas clientes para formar complexos de proteínas (TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Figura 5: Domínios da Hsp90. A) Hsp90 em sua conformação aberta e (B) esquema da disposição dos domínios da mesma.

Fonte: A) (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). B) Autoria própria.

A função das Hsp90 depende estritamente da sua fraca atividade ATPásica. A ligação ao ATP desencadeia mudanças conformacionais de um estado aberto para um fechado, como mostrado na Figura 6 (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). Inicialmente, a Hsp90 está em uma conformação aberta, que se assemelha a um V. A ligação ao ATP ao domínio N-terminal leva a um estado transiente, capaz de receber a proteína cliente, sofrendo, ao mesmo tempo, uma mudança conformacional que a leva a um estado fechado, onde o domínio N se dimeriza e facilita a interação com o domínio M, levando a hidrólise do ATP. Após a hidrólise, a dissociação do domínio N-terminal é seguida pela liberação de ADP + Pi, o qual permite o retorno da Hsp90 à sua conformação original. O ciclo ATPásico da Hsp90 também depende da interação com várias co-chaperonas, incluindo a maquinaria da família Hsp70. As

chaperonas Hsp70 e Hsp90, bem como algumas de suas co-chaperonas, se associam em um heterocomplexo denominado foldossoma. (BATISTA et al., 2015) (Buchner, 1998; Wegele et al., 2004).

Figura 6: Ciclo conformacional da Hsp90: (1) Hsp90 se encontra em sua conformação aberta, capaz de se ligar ao ATP; (2) e interagir com as proteínas clientes providas do complexo primário, assistidas por co-chaperonas como a Hop ou SGT, que se ligam ao peptídeo MEEVD C-terminal da Hsp90; (2') Mudanças conformacionais causam a dimerização do domínio N-terminal, levando a Hsp90 ao seu estado fechado. (3) Aqui, o complexo pode interagir com outras co-chaperonas como a Aha1, liberando a Hop/SGT, estabilizando o complexo no seu estado fechado. A hidrólise do ATP é favorecida, levando ao estado ADP ligado. (3') a hidrólise de ATP está sujeita à saída p23. Alternativamente, as co-chaperonas contendo domínio TPR, podem interagir com o complexo de proteína cliente Hsp90, levando a proteína cliente a um destino diferente (enovelamento, translocação ou degradação). (4) A co-chaperona p23 pode romper a interação com a Aha1, ou alternativamente, direcionar a ligação ao complexo Hsp90-proteína cliente, mantendo a Hsp90 em seu estado fechado, ATP ligado. A liberação do ADP permite a liberação da proteína cliente enovelada, que segue seu próprio caminho, permitindo que a Hsp90 retorne ao seu estado original, e inicie um novo ciclo.

Fonte: Adaptado de (BATISTA et al., 2015)

1.3. Sistema foldossoma

Embora Hsp70 e Hsp90 tenham importantes funções próprias, trabalham em maior número de ações trabalhando em conjunto. Ambas se associam temporariamente para formar uma maquinaria chaperona, um sistema dinâmico, multifuncional e multichaperona, que desempenha funções essenciais na proteção biológica de organismos contra estresses ambientais e genéticos (ALVIRA et al., 2014; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011) (Buchner, 1998; Wegele et al., 2004).

Como acima mencionado, Hsp70 e Hsp90 possuem co-chaperonas que estão associadas ao ciclo ATP-dirigido, tendo suas ações inibidas ou estimuladas por elas. Várias dessas co-chaperonas possuem um motivo TPR que interage com o motivo MEEVD C-terminal de ambas as Hsp70 e Hsp90 citoplasmáticas, atuando como um *linker*, ou proteína adaptadora, entre as chaperonas. Mais de 100 proteínas já foram identificadas como proteínas-clientes dessa maquinaria, entre fatores de transcrição, proteínas kinases e etc (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Inicialmente, a *J-protein*, uma das co-chaperonas da Hsp70, se liga às superfícies hidrofóbicas de uma proteína desenovelada, parcialmente enovelada ou enovelada incorretamente, levando-a até a Hsp70, que está no estado ATP-ligado, com baixa afinidade por proteínas clientes (*early complex*). A *J protein* e a proteína-cliente estimulam a hidrólise do ATP pela Hsp70, que vai ao seu estado ADP-ligado, que por sua vez tem alta afinidade por proteínas clientes. Aqui, a *Hsp70-interacting protein* (Hip), uma proteína com um domínio TPR pode se associar ao complexo Hsp70-ADP-proteína cliente, estabilizando-o para mantê-la ligada a proteína cliente, permitindo a via de enovelamento. Fatores de troca de nucleotídeos, (NEF's), tais como GrpE, Hsp110, HspBP1, interagem com o ADP, estimulando sua troca por ATP. Essa troca reduz a afinidade da Hsp70 pela proteína cliente, liberando-a (BATISTA et al., 2016a; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014).

Alternativamente, a proteína cliente ligada ao complexo formado por Hsp70, no estado ATP ligado e as *J protein*, pode seguir outra via, envolvendo a maquinaria chaperona da Hsp90. A Hop é uma das proteínas que conectam essas chaperonas. O complexo Hsp90-ATP-Hop, se associa com o complexo primário, formando um complexo intermediário, e a proteína cliente é então transferida da Hsp70 para a Hsp90. A ligação de

co-chaperonas, tais como Aha1, p23 a Hsp90, rompe o complexo intermediário, levando a Hsp90 ao complexo tardio, liberando Hsp70, *J protein* e Hop (BATISTA et al., 2016; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014) (Buchner, 1998; Wegele et al., 2004).

Figura 7: Sistema foldossoma. (1) A J-protein se liga à proteína cliente levando-a até a Hsp70 que se encontra em estado aberto, ATP ligado, formando um complexo primário. (2) A Hop se liga a Hsp90 e recruta o complexo primário previamente formado, formando um complexo intermediário. A Hsp90 recebe um ATP em cada um de seus protômeros, passando para um estado fechado, hidrolisa o ATP, auxiliando no enovelamento da proteína cliente. A Hsp90 libera o ADP e a proteína cliente enovelada retornando ao seu estado aberto. (3) Caso ocorra a inibição da Hsp90 por ubiquitina, o enovelamento não ocorre, encaminhando a proteína cliente para o proteassoma.

Fonte: (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014).

1.4. Hop

Proteína primeiramente identificada em levedura durante uma busca genética por fatores de trans-ativação que induziam a expressão de proteínas de choque térmico, tendo sido denominada STI1 (*Stress Inducible Protein 1*) (NICOLET, C.M.; CRAIG, 1989). Posteriormente, proteínas ortólogas foram identificadas em humanos (HONORE et al., 1992),

ratos (BLATCH et al, 1997), insetos (ADAMS, et al., 2000), plantas (ZHANG et al., 2003), protozoários (CARLTON et al., 2002) e vírus (CHENG et al., 2002). Apesar de serem proteínas ortólogas, apresentam mecanismos diferentes de ação e por conveniência as STI1 foram divididas em ySTI1, para se referir às proteínas oriundas de levedura, plantSTI1, oriundas de vegetais e animalSTI1, para as proteínas oriundas de animais, essa última, posteriormente denominada Hop (*Hsp70/Hsp90 Organizing Protein*) (BLATCH et al., 1997; HONORE et al., 1992; SMITH et al., 1993).

A Hop é uma cochaperona do sistema multichaperona Hsp70/Hsp90 que modula a atividade de ambas. Associa-se, preferencialmente, ao estado ADP ligado tanto da Hsp70 quanto da Hsp90, provavelmente servindo para coordenar as ações das Hsp nos estágios apropriados de cada ciclo do ATP das mesmas. Alguns estudos sugerem que a Hop tem função essencial e ativa na maturação funcional das proteínas clientes das Hsps, à parte da montagem e liberação das mesmas do complexo (CARRIGAN et al., 2006). Atua também como uma proteína adaptadora, transferindo proteínas clientes da Hsp70 para a Hsp90 (CHEN; SMITH, 1998; YI; DOUDEVSKI; REGAN, 2010).

A Hop é uma proteína modular, que contém três domínios TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) e dois domínios DP, um entre TPR1 e TPR2A e outro na extremidade C-terminal do domínio TPR2B (Figura 8). O DP2 compreende cinco hélices formando uma forma de V alongado enquanto DP1 contém aproximadamente as mesmas cinco hélices, com uma hélice curta adicional próxima ao N-terminal, sendo mais globular do que o DP2 (SCHMID et al., 2012). Os domínios TPR são responsáveis pelas interações específicas com a região C-terminal da Hsp70 e/ou Hsp90, sendo que o TPR2A interage preferencialmente com a Hsp90 enquanto que TPR1 e TPR2B interagem com a Hsp70 (SCHEUFLER et al., 2000; SCHMID et al., 2012).

Figura 8: Estrutura esquemática geral dos domínios da Hop.

Os domínios TPR são formados por sequências degeneradas que contêm 34 aminoácidos que se repetem num padrão hélice-volta-hélice com um sulco na superfície, sulco este que pode ser utilizado para interações intra e intermoleculares. São esqueletos conservados que medeiam interações proteína-proteína e estão envolvidos em uma gama de

funções celulares, tais como controle do ciclo celular e transcrição. Várias chaperonas contendo domínios TPR são conhecidas, estando presentes também em protozoários e trabalhando na montagem do sistema multichaperona Hsp70/Hsp90 (BLATCH; LÄSSLE, 1999). A superfície de cada domínio TPR possui regiões côncavas e convexas. As interações que são mais bem conhecidas são aquelas que ocorrem nas regiões côncavas, ligando um motivo específico no C-terminal na Hsp70 e/ou Hsp90 (HATHERLEY et al., 2015).

A Hop associa-se diretamente à Hsp70 e Hsp90, conjunta ou individualmente, facilitando a conexão destas (HATHERLEY et al., 2015; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). Quando ligada somente à Hsp70, estimula o enovelamento e reenovelamento de proteínas clientes. A Hop marca a Hsp90 como alvo para os complexos de Hsp70 previamente existentes (SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014) e é responsável também, por modular o folfossoma. Durante o ciclo foldosoma, a Hop atua como um link, transferindo proteínas clientes da Hsp70 para a Hsp90 (CARRIGAN et al., 2006; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). A interação entre Hsp70 e Hsp90 via Hop acontece via domínios TPR (GAVA et al., 2011; ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004; SCHEUFLE et al., 2000). A Figura 9 mostra a estrutura geral em baixa resolução da Hop de *Leishmania braziliensis* (BATISTA et al., 2016).

Figura 9: Modelo *ab initio* da LbHop. Estrutura em baixa resolução definida por SAXS sobreposta a um envelope de alta resolução dos domínios individuais da Hop de outros organismos. Como a PfHop, possui três domínios TPR, TPR1, TPR2A e TPR2B, além de um domínio DP, após o domínio TPR 2B e a extremidade C terminal.

Fonte: (BATISTA et al., 2016).

Estudos recentes, em levedura, mostraram que as superfícies convexas dos domínios TPR2A e TPR2B interagem respectivamente com o motivo MEEVD presente na região C-terminal da Hsp90 e com a superfície do domínio M da Hsp90. É essa interação com as regiões convexas do TPR2A que forçam a Hsp90 até a conformação que inibe a atividade ATPásica desta chaperona. O domínio TPR1 se liga ao motivo EEVD, localizado na extremidade C-terminal da Hsp70, enquanto o TPR2B se liga ao domínio intermediário da Hsp90 (HATHERLEY et al., 2015).

A interação HopTPR2A/Hsp90MEEVD C-terminal é de natureza eletrostática, envolvendo duas lisinas básicas positivamente carregadas do domínio TPR da Hop e o dicarboxilato da extremidade carboxílica do resíduo de aspartato, negativamente carregadas do motivo MEEVD, ligação esta chamada grampo de dicarboxilato (Scheufler et al, 2000)(Scheufler et al, 2000)(GAVA et al., 2011).

Figura 10: Ligação do domínio TPR2A da Hop humana ao motivo MEEVD da hHsp90. Ligação de natureza eletrostática que envolve duas lisinas do domínio TPR2A e um aspartato do motivo MEEVD da Hsp90.

Fonte: (GAVA et al., 2011)

A Hop interage com Hsp70 na presença de ADP e na ausência de nucleotídeos, enquanto ATP inibe a interação entre elas. Diferentemente da Hop humana, a Sti1 de levedura estimula a atividade ATPásica da Hsp70 de levedura, sugerindo um mecanismo diferente de ação para a Hop de mamíferos e Sti1 de levedura. A interação da Hop com a Hsp90 ocorre através da ligação dos domínios TPR2A-TPR2B ao domínio M da Hsp90 - esse processo bloqueia a dimerização transiente do domínio N-terminal da Hsp90, assim como o acoplamento ao domínio M da Hsp90 (CHEN; SMITH, 1998; HATHERLEY et al., 2015).

A Hsp90 está envolvida nos mais diversos processos celulares, sendo superexpressas em várias doenças, tais como câncer, desordens neurodegenerativas, miopatias, esclerose múltipla (TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011), além de protozoonoses, como a malária . Conhecer o processo de funcionamento do sistema da Hsp90 incluindo suas co-chaperonas, como a PfHop, foco deste trabalho, além de enriquecer o conhecimento acerca do tema, pode resultar em um alvo terapêutico importante, visto que a PfHsp90 e suas co-chaperonas que regulam sua função, são essenciais para a sobrevivência do protozoário durante a infecção.

A PfHop tem sido caracterizada em trabalhos recentes (GITAU et al., 2012; HATHERLEY et al., 2015; ZININGA et al., 2015), que objetivaram determinar características estruturais, assim como os padrões de interação com as co-chaperonas, PfHsp70 e PfHsp90.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Esse trabalho teve como objetivos caracterizar estruturalmente a Hop de *P. falciparum* (PfHop) e seu mutante de deleção PfHop^{TPR2AB} e determinar as condições de sua atuação como co-chaperona do sistema Hsp70/Hsp90.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Produção e purificação da PfHop e PfHop^{TPR2AB} recombinantes;
- ✓ Estudos comparativos sobre a estrutura primária da mesma, analisando as sequências de aminoácidos de Hops ortólogas;
- ✓ Determinação dos elementos de estrutura secundária da PfHop e do mutante;

- ✓ Caracterização hidrodinâmica, na qual foram determinados, entre outros parâmetros, massa molecular e razão friccional;
- ✓ Determinação da estrutura em baixa resolução da PfHop por espalhamento de raios X a baixos ângulos;

3 METODOLOGIA

3.1. Identificação das proteínas e alinhamento das sequências de aminoácidos

A sequência de aminoácidos da proteína de interesse, PfHop (gi|75016029) já era conhecida pelo grupo e foi utilizada para a comparação com suas ortólogas.

Foi realizado um alinhamento da sequência da PfHop com a sequência da Hop de outros organismos, tais como *Leishmania braziliensis* (LbHop - GenPept ID: XP_001562145), humano (hHop - GenPept ID: P31948) e levedura (Sti1 - GenPept ID: CAA99217). As análises foram realizadas utilizando-se o programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A PfHop^{TPR2AB}, por ser uma construção genética, um mutante de deleção no qual o domínio TPR1 foi removido, não foi submetida ao alinhamento.

3.2. Propriedades físico-químicas das proteínas em estudo

Algumas propriedades físico-químicas das proteínas em estudo foram obtidas utilizando ferramentas de bioinformática. Por meio do ProtParam, foi possível obter informações a partir da sequência de aminoácidos da proteína de interesse, tais como massa molecular (MM), ponto isoelétrico (pI), coeficiente de extinção molar (ϵ), além da presença e do número de aminoácidos aromáticos.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das proteínas utilizadas neste estudo. Os dados aqui mostrados incluem a cauda de poli-histidina (Fonte: <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>)

Proteína	Propriedade					
	GenBank	MM (kDa)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	pI	Número de AA	W/Y/F
PfHop	gi 75016029	68238	50200	7,01	584	1/30/21
PfHop^{TPR2AB}	-	49134	32780	7,64	416	0/22/17

3.3. Vetores de expressão

O DNA codante da proteína utilizadas neste trabalho, PfHop já havia sido previamente clonados em vetor pET28a gerando o vetor pET28a::PfHop, vetor este que contém uma cauda de poli-histidinas N-terminal, gene de resistência à canamicina além do sítio múltiplo de clonagem para a ação de enzimas de restrição. A cauda de poli-His permite a posterior purificação da proteína recombinante produzida por meio de cromatografia por afinidade – histidinas vicinais possuem afinidade pelo o íon Ni^{2+} , fazendo com que a proteína fique retida numa coluna cromatográfica que contenha esse íon na fase estacionária, eluindo os contaminantes primeiro. Tal cauda, após finda a purificação, pode ser excisada por meio da incubação da proteína com trombina. A presença do gene de resistência à canamicina permite a seleção da cepa bacteriana que contém o vetor de expressão pET28a::PfHop de outras que por ventura estejam presentes no meio de cultura.

3.4. Meio de cultura

O meio escolhido para cultivar as bactérias para transformação e expressão foi o meio Lysogeny Broth (LB), rico nutricionalmente para o crescimento de culturas puras de cepas recombinantes. Contém 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e água destilada para um volume de 1 L, para meio líquido (pH 7,0). A solução deve ser submetida à autoclave por 2 horas. Para meio sólido, basta que se adicione 15 g de ágar à solução antes de adicionar a mesma à placa de Petri.

3.5. Transformação em células competentes

O vetor de expressão pET28a::PfHop e foi inserido em células da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) *pRare* por meio de transformação por choque térmico. Neste procedimento, 1 µL de DNA foi inserido em um frasco contendo 100 µL de células competentes – a mistura foi submetida à banho de gelo por 20 minutos, à 42 °C por 2 minutos e em seguida, banho de gelo novamente por 3 minutos. Uma alíquota de 600 µL de meio LB foi adicionada e a mistura submetida à temperatura de 37 °C por 45 minutos e à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Cerca de metade do sobrenadante foi descartado, a solução ressuspensa e espalhada em placa de Petri contendo meio LB sólido adicionado de canamicina (30 µg/mL), e cloranfenicol (25 µg/mL) para a seleção da bactéria de interesse, resistente à estes antibióticos. As placas foram então mantidas em estufa a 37 °C overnight.

3.6. Expressão PfHop recombinante

Para a expressão das proteínas PfHop e PfHop^{TPR2AB} recombinantes, foi preparado um pré-inóculo por meio da adição de uma colônia de bactérias transformada com o vetor pET28a::PfHop ou pET28a::PfHop^{TPR2AB}, obtidas na etapa anterior à 200 mL de meio LB líquido. O frasco foi mantido em incubadora orbital a 37 °C e 200 rpm, overnight.

O conteúdo do pré-inóculo foi dividido entre 4 frascos tipo erlenmeyer com capacidade de 2 L contendo 1 L de meio LB cada. Os frascos foram mantidos em incubadora orbital a 37°C até que a densidade óptica atingisse valores entre 0,6 e 0,8 unidades arbitrárias. Uma pequena amostra foi retirada para servir de controle e em todo o restante adicionou-se 0,4 mM de IPTG (Isopropil β D-1-tiogalactopiranosídeo), um indutor de expressão análogo à galactose. Os frascos foram mantidos a 23 °C e 200 rpm por 18h.

Após esse período, o conteúdo dos frascos foi centrifugado durante 15 minutos a 8000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, lisozima (30 mg/mL) e DNase (2 U/litro de cultura) para a PfHop e Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, lisozima (30 mg/mL) e DNase (2 U/litro de cultura) para a PfHopTPR2AB.

A lise das células foi feita por sonicação em equipamento Labsonic Ultratip, *Labline Instruments*, utilizando pulso de 6 segundos com pausa de 60 segundos entre eles, com amplitude de 30% – o lisado foi transferido para frascos apropriados e centrifugado em centrífuga de chão Hitachi – *High-Speed Refrigerated Centrifuge CR 22N*, a 18000 rpm por 20 minutos. Finalmente, foi efetuada uma filtração em membrana de 0,45 µm e o filtrado submetido à etapa de purificação.

3.7. Purificação da PfHop e PfHopTPR2AB

3.7.1. Cromatografia por afinidade

Em um primeiro passo, a coluna foi carregada com solução de sulfato de níquel, calibrada com tampão A composto por Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, para a PfHop, inserindo-se a amostra a ser purificada na sequência. A eluição da PfHop que havia ficado retida na coluna devido a ligação da cauda de poli-histidinas com o níquel da resina, aconteceu com a passagem de um passo de 15% de tampão B que contém Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM e imidazol 500 mM para eliminação de contaminantes que por ventura tinham se ligado à resina com baixa afinidade e, posteriormente, 100% do tampão B. As frações purificadas foram recolhidas e analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. A coluna utilizada foi a *Hitrap Chelating* de 5 mL (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema AKTA prime plus (*GE Healthcare Lifesciences*).

3.7.2. Cromatografia por exclusão molecular

A proteína, PfHop, previamente purificadas por afinidade foram introduzidas na coluna e impulsionada através da mesma num fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura ambiente, através de tampão específico contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM. A coluna utilizada foi a *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o

equipamento AKTA Prime plus (*GE Healthcare Lifesciences*). A eficácia da purificação foi determinada em análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

3.8. Determinação da concentração da proteína

A concentração da PfHop foi determinada por meio de espectroscopia de absorção no UV-visível em 280 nm. As leituras das absorbâncias foram feitas em equipamento UV-1800 Spectrophotometer (*Shimadzu*). O cálculo foi efetuado através da lei de Lambert-Beer (SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, 2009):

$$C = \frac{A_{280}}{\epsilon * l}$$

onde *C* é a concentração de proteína, *A* absorbância em 280 nm, *l* o caminho óptico e ϵ o coeficiente de extinção molar, obtido através do ProtParam, utilizando-se a sequência de aminoácidos, conforme apresentado na Tabela 1.

3.9. Testes de estabilidade

Foram realizados testes com o objetivo de verificar a estabilidade de PfHop frente ao congelamento e o armazenamento em geladeira por alguns dias. Para o congelamento, a proteína foi purificada, dosada e armazenada em freezer a -20 °C durante 24 h, numa concentração de 5 µM e descongeladas findo esse tempo. As amostras foram então submetidas a análises de estrutura secundária via CD para verificar possíveis alterações causadas pelo congelamento.

Para a conservação em geladeira, uma alíquota de 100 uL foi retirada de um estoque durante sete dias consecutivos e adicionada de tampão de amostra (contendo 200 mM de DTT, 4 % de SDS, 0,2 % de azul de bromofenol, 20 % de glicerol 100 mM de Tris-HCl (pH 6,8)) e mantidas em geladeira, a 4 °C. Tais amostras foram submetidas à análise por SDS-PAGE 12% com o intuito de verificar a existência de bandas de degradação causadas pelo armazenamento contínuo.

3.10. Caracterização estrutural.

3.10.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) é uma técnica de absorção baseada na diferença na absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por moléculas opticamente ativas. A técnica de CD é largamente utilizada na caracterização biofísica de proteínas, permitindo obter informações a respeito do enovelamento proteico, além de estimar a quantidade de cada elemento de estrutura secundária presente na mesma. Para isto, os dados obtidos através da subtração da absorção de luz circularmente polarizada à direita da absorção de luz circularmente polarizada à esquerda estão em miligraus e precisam ser normalizados para elipticidade molar residual através da seguinte relação (OLSEN, 1990):

$$[\theta] = \frac{\theta_{\lambda} * MM}{10 * l * n * c_g}$$

onde θ_{λ} é o sinal de dicroísmo circular obtido, em miligraus; MM é a massa molar da proteína, em g/mol; l é o caminho óptico, em centímetros; n é o número de resíduos de aminoácidos presentes na proteína e c_g é a concentração da mesma em mg/mL.

A PfHop nativa foi diluída a partir de uma solução estoque de 25 μ M para as concentrações de 2, 4 e 6 μ M. As diluições foram realizadas em tampão específico, como descrito na seção 3.7.2. Todas as soluções citadas foram submetidas à espectropolarimetria de CD, como forma de estimar a estrutura secundária da proteína, por meio da absorção de luz circularmente polarizada utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mm. As análises foram realizadas em equipamento *J-815 CD Spectrometer* (Jasco Inc.TM), e os espectros de CD foram coletados com 50 acumulativas e tempo de resposta de 1 segundo.

A predição das quantidades de estrutura secundária foi realizada através de metodologias estatísticas que fazem comparações do espectro de CD da proteína alvo com o espectro de proteínas que contenham estrutura secundária conhecida, previamente determinada em solução aquosa e por cristalografia de raios-X (YANG, 1996). Cada tipo de estrutura secundária, hélices α , folha β ou volta β , possui sinais específicos no espectro de CD, que permitem identificá-los. A deconvolução do espectro de CD foi feita através de programas como Dichroweb (disponível em <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>) e CDNN deconvolution (version 2: Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.dee/cdnn), que utilizam método primeiramente propostos por Greenfield e Fasman, em 1969. Tais softwares permitem a inserção do espectro no mesmo e então, por meio de comparações com espectros

de proteínas existentes em seus bancos de dados, fornecem as quantidades dos elementos de estrutura secundária presentes na amostra em questão (BOHM; MUHR; JAENICKE, 1992).

3.10.2. Fluorescência

Proteínas, como bem estabelecido, são polímeros de aminoácidos, unidos por meio de ligações peptídicas. Como tal, apresentam diversos resíduos de aminoácidos portadores de diferentes cadeias laterais, cada qual com uma característica físico-química diferente: polares, carregadas, aromáticas. Os aminoácidos aromáticos, tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e Fenilalanina (Phe) funcionam como fluoróforos naturais (JUNQUEIRA, 2012).

Tais fluoróforos, ao absorverem certa quantidade de energia, promovem a excitação de alguns de seus elétrons a um estado de maior energia, elétrons estes, que, ao retornarem ao seu estado fundamental, liberam essa energia extra na forma de luz, num fenômeno conhecido como fluorescência. Cada aminoácido possui um espectro de emissão de fluorescência característico na região do ultravioleta. O espectro de emissão de fluorescência é dado pela emissão de luz pelos aminoácidos citados anteriormente e de cofatores como FMN, FAD, NADH e porfirinas, fornecendo indícios da estrutura terciária local utilizando os aminoácidos aromáticos (previamente citados) presentes em cada proteína como sonda. Geralmente se utiliza para a excitação $\lambda = 280$ ou 295 nm, região na qual o Tyr e Trp, respectivamente, absorvem luz, fluorescendo na região de $300-360$ nm (LAKOWICZ, 2006). Tendo em vista que a emissão de fluorescência é sensível a mudanças no ambiente no qual os resíduos aromáticos se encontram, tal como polaridade do solvente, ou ainda maior ou menor exposição deles ao solvente, mudanças na fluorescência intrínseca podem ser usadas para monitorar mudanças estruturais da proteína (OLSEN, 1990).

Essa técnica fornece parâmetros importantes, tais como o comprimento de onda máximo de emissão, que divide o espectro em duas metades iguais, sensível ao ambiente no qual se encontram os resíduos aromáticos, indicativo portando de mudanças na estrutura terciária local da proteína, além do centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$), uma média ponderada de todo o espectro, indicativo do centro de distribuição do comprimento de onda. É dado pela fórmula:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum(I_{Fi} * \lambda_i)}{\sum(I_{Fi})}$$

onde I_{Fi} representa a intensidade de fluorescência e λ_i representa o comprimento de onda em cada ponto (nm).

A PfHop foi analisada sob duas condições distintas, mostradas na Tabela 2, como forma de analisar o efeito da desnaturação por temperatura na estrutura terciária local da proteína, por meio da emissão de luz pela solução. A diluição foi efetuada em tampão específico para a PfHop, conforme descrito na seção 3.7.2. Foram usados dois comprimentos de onda de excitação distintos, 280 e 295 nm.

Tabela 2: Amostras preparadas para análise da PfHop via Fluorescência

<i>Amostras</i>	<i>Condição</i>
1	PfHop nativa a 6 μ M
2	PfHop a 6 μ M desnaturada termicamente a 90 °C por 30 minutos

As análises foram realizadas em equipamento *F4500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer*.

3.10.3. Estudo da estabilidade térmica e química da PfHop

Técnica utilizada para averiguar a estabilidade térmica e química da proteína recombinante em estudo por meio do monitoramento das mudanças em sua estrutura secundária. Para a desnaturação térmica, o acompanhamento foi realizado em 222 nm e as amostras tiveram sua temperatura alterada entre 20 e 90 °C assim como o retorno, de 90 a 20 °C, para verificar reversibilidade da desnaturação, na taxa de 1 °C/min, utilizando a mesma solução tampão descrita na seção anterior.

Para analisar a estabilidade da PfHop frente a agentes químicos desnaturantes, tais como ureia por meio da verificação das alterações na estrutura secundária da proteína, a concentração da mesma foi mantida constante em amostras que tiveram sua concentração de ureia variando entre 0 e 7 M a cada 0,25 M, em tampão previamente descrito. A aferição da concentração da solução de ureia foi realizada por refratometria, utilizando para tal as equações a seguir:

$$\Delta N = \Delta Nd - \Delta Nt \quad (I)$$

$$[ureia] = 117,66 * \Delta N + 29,753 (\Delta N^2) + 185,56 (\Delta N^3) \quad (II)$$

onde, em (I), ΔN é a diferença entre o índice de refração da solução desnaturante e do tampão. Em (II), tem-se a equação polinomial utilizada para a obtenção da concentração de uréia (“D N is the difference in refractive index between the denaturant solution and water (or buffer) at the sodium D line. The equation for urea solutions is based on data from Warren and Gordon [86], and the equation for GdmCl solutions is from Nozaki [73].”, [s.d.]).

O monitoramento foi realizado em 222 nm, comprimento de onda no qual se verifica a maior intensidade de sinal – agentes desnaturantes em altas concentrações causam perda da qualidade do sinal de CD abaixo de 220 nm, o que também justifica a utilização deste mínimo. Os dados foram obtidos durante 60 s com leituras a cada 1 s. Foi calculada então uma média dos valores obtidos em cada uma dessas medidas, obtendo-se um único valor de miligraus para cada uma das concentrações de ureia utilizadas. Estes valores foram, então normalizados, conforme equação descrita na seção 3.10.1.

3.10.4. Caracterização hidrodinâmica

A aSEC (*analytical Size Exclusion Chromatography*) fornece parâmetros hidrodinâmicos, tais como massa molecular aparente (MM_{app}), Raio de Stokes (R_s - parâmetro que estima o volume da proteína considerando a camada de hidratação) e razão friccional (f/f_0) - comparação entre o raio de Stokes experimental e o teórico, que supõe que a proteína é uma esfera rígida com a mesma massa da proteína – esse parâmetro pode fornecer informações a respeito do quão distante a proteína está da partícula globular.

A PfHop numa concentração de 6 μ M em volume de 100 μ L foi impulsionada num fluxo constante de 0,5 mL/min pela coluna por tampão previamente descrito na seção 3.7.2. Nessa fase das análises, foi usada a coluna Superdex 200 GL 10/300 (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema AKTA Prime Plus (*GE Healthcare LifeSciences*). A mistura padrão de proteínas utilizada foi composta pelas proteínas: Apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), BSA (67 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa) e Citocromo C (12,1 kDa).

A MM_{app} e R_s foram calculadas por meio da regressão linear dos valores do coeficiente de partição versus $\log MM$. O coeficiente de partição, K_{av} , foi obtido pela seguinte relação:

$$K_{av} = \frac{V_{el} - V_0}{V_t - V_0}$$

onde V_{el} é o volume de eluição de cada uma das proteínas contidas no padrão de massa molecular, V_t é o volume total da coluna e V_0 o volume morto da mesma. O $\log K_{av}^{1/2}$ foi então plotado contra o raio de Stokes teórico de cada proteína do padrão. Pela regressão linear, obteve-se a MM_{app} e R_s experimental para a PfHop.

3.10.5. Ultracentrifugação analítica

Por sua vez, a Ultracentrifugação analítica (AUC, do inglês *Analytical Ultracentrifugation*) é uma técnica padrão ouro, na qual se observa, no experimento de velocidade de sedimentação, em tempo real, a redistribuição das partículas em solução após a aplicação de um campo centrífugo forte, estudando-se a evolução do processo de sedimentação (SCHUCK, 2012)(Borges & Ramos, 2011; Batista et al., 2015). A AUC permite uma rica caracterização hidrodinâmica e termodinâmica, fornecendo parâmetros tais como MM, tamanho, densidade, afinidade na formação de complexos proteicos, pureza, etc, além de auxiliar na modelagem da forma de proteínas e complexos de proteínas (BATISTA et al., 2015; LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002).

Exaustivamente utilizada em estudos de auto associação de proteínas e peptídeos, caracterização do estado oligomérico, interação proteína-proteína, estudos de proteínas de membrana em soluções detergentes, etc (ZHAO et al., 2013). Através dela é possível obter parâmetros como o coeficiente de sedimentação (s), velocidade linear de sedimentação da proteína por unidade gravitacional, dado em Svedbergs e dependente da viscosidade e densidade do tampão, parâmetros que devem ser fornecidos ao software no momento no tratamento dos dados. Outro parâmetro obtido é o coeficiente friccional (f/f_0), dado pela razão entre o coeficiente de sedimentação de uma espécie de mesma massa globular pelo coeficiente de sedimentação experimental obtido para a partícula, que fornece informações sobre o estado oligomérico da partícula (BATISTA et al., 2015; BORGES; RAMOS, 2011; ZHAO et al., 2013).

Os experimentos de velocidade de sedimentação para a PfHop foram realizados com a finalidade de confirmar os parâmetros hidrodinâmicos obtidos via aSEC e o estado oligomérico. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes, entre 0,2 e 1 mg/mL, preparadas no mesmo tampão utilizado para o experimento de aSEC previamente descrito, a

20 °C, 35000 rpm (rotor AN-60Ti) e aquisição dos dados em 236 nm. As análises foram realizadas em ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A, no LNBio, em Campinas-SP.

Os dados de absorvância obtidos em função do raio posicional da cela foram ajustados utilizando-se o software Sedfit, com o objetivo de se obter o coeficiente de sedimentação (s) como uma função de distribuição de s , $c(s)$, utilizando-se a f/f_0 como parâmetro de ajuste. Os valores de s foram obtidos como o ponto máximo das curvas $c(s)$, logo após a normalização para as condições padrão ($s_{20,w}$), coeficiente de sedimentação em água, a 20 °C. Para isso foram utilizados os seguintes parâmetros: viscosidade do tampão ($\eta = 0,010020$ poise), densidade do tampão ($\rho = 1,0033$) e volume parcial específico da PfHop ($V_{bar} = 0,72975$ cm³.g⁻¹), obtidos via Sednterp. Finalmente, o coeficiente de sedimentação padrão ($s^0_{20,w}$), coeficiente de sedimentação para o qual se considera diluição infinita, com a concentração de proteína tendendo a zero, foi determinado pela regressão de linear de $s_{20,w}$ versus concentração de proteína (BATISTA et al., 2015; BORGES; RAMOS, 2011).

3.10.6. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Técnica na qual uma solução da macromolécula de interesse é exposta a um feixe de raios X e a intensidade de raios X espalhada será proporcional à transferência de momento. Permite a determinação de estruturas terciária e quaternária de proteínas em solução, análise da estrutura global das mesmas, predição da estrutura quaternária em oligômeros, verificação de transições conformacionais por interação com ligantes, verificação de processos de enovelamento e desenovelamento, etc (BATISTA et al., 2016; VOLKOV; SVERGUN, 2003).

A coleta de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foi realizada na linha D02A-SAXS1, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPEM, Campinas – SP). As medidas foram efetuadas com feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1.488$ Å), distância detector-amostra de aproximadamente 1000 mm e amostras foram inseridas em célula com janela de mica com 1 mm de caminho óptico. Os padrões de espalhamento foram coletados por um detector Pilatus 300K (Dectris). As concentrações de proteínas utilizadas foram 1, 2 e 3 mg.mL⁻¹, sob temperatura controlada e em tampão previamente descrito na seção 3.7.2. O experimento foi realizado em 3 concentrações distintas como um artifício para analisar a interferência inter partícula, bem como a agregação da proteína nas condições estudadas. O perfil de espalhamento do tampão utilizado foi subtraído do perfil das amostras.

As curvas de SAXS foram corrigidas pela intensidade de luz incidente, atenuação das amostras e contribuição do tampão. Os perfis de espalhamento da PfHop foram normalizados pela concentração e a qualidade dos dados foi avaliada pelas análises de Guinier e Kratky (GLATTER, 1982; GUINIER, A.; FOURNET, 1955) para garantir a ausência de agregados e do estado enovelado (compacto), respectivamente, sendo o software PRIMUS utilizado para a inspeção da qualidade dos dados (KONAREV et al., 2003). Na ausência de efeitos de interferência, uma transformada de Fourier conecta a intensidade de espalhamento, $I(q)$, para com função de distribuição de distâncias da partícula, $P(r)$, utilizando para tal, o software GNOM (SVERGUN, 1992).

Os modelos *ab initio* de baixa resolução da proteína 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. Cinco análises independentes por DAMMIN foram efetuadas, usando simetria P2, uma vez que a PfHop foi encontrada como um dímero nas concentrações testadas. Foi realizada então uma média desses modelos e as regiões de baixa ocupância foram filtradas por meio do pacote de programas DAMAVER (VOLKOV; SVERGUN, 2003). Os mapas de densidade foram criados utilizando o Chimera (PETTERSEN, E.F.; et al., 2004). A validação do modelo *ab initio* foi conduzida pela estimativa das propriedades hidrodinâmicas, utilizando o programa HydroPro (TORRE, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da estrutura primária da PfHop

O alinhamento da PfHop, hHop, yHop e LbHop foi realizado através do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), mostrado na Figura 11. Os asteriscos, na última linha, representam os aminoácidos que são conservados em todas as sequências, nas quatro proteínas. A PfHop apresentou 38% de identidade com a LbHop, 37 % com a hHop e 33 % com a de ySTI1.

Figura 11: Alinhamento da sequência de aminoácidos da PfHop com a yHop, LbHop e hHop. Os asteriscos destacam os resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências, mostrando identidade relativamente baixa entre as sequências analisadas. Os domínios TPR da PfHop estão destacados por cores: verde para o TPR1, vermelho para o TPR2A e azul para o TPR2B da PfHop

PfHop	MVNKEE AQRLKELGNKCFQEGKYEEAVKYFSDAITND-PLDHVLYSNLSGAFASLGRFYE
yHop	--MSLTAD EYKQQGNA AFTAKDYDKAIELFTKAIEVSETPNHVLYSNRSACYTSLKKFSD
LbHop	---MDANELKNEGNKEFSAGRYVEAVNYFSKAIQLD-GQNSVLYSNRSACFAAMQKYKD
hHop	---MEQVNELKEKGNKALSVGNIDDALQCYSEAIKLD-PHNHVLYSNRSAAAYAKKG DYQK
	. . . * : ** : . * : : : ** . : ***** * . : : .
PfHop	ALESANKCISIKKDWPKGYIRKGAEHGLRQLSNAEKTYLEGLKIDPNNKSLQDALSKVR
yHop	ALNDANECVKINPSWSKGYNRLGAAHLGLGDLDEAESNYKKALELDASNKAAKEGLDQVH
LbHop	ALDDADKCISIKPNWAKGYVRRGAALHGMRRYDDAIAAYEGLSVDPSPNSGCTQGVKDVQ
hHop	AYEDGCKTVDLKPDWKGYSRKAALFLNRFEAAKRTYEEGLKHEANNPQLKEGLQNM
	* . . . : : : . * *** * . * : . : * * * . : . * : : . . .
PfHop	NENMLE ---NAQLIA----HLNNIENDPQLKSYKEENSYPHELLNTIKSINSNPMN
yHop	RTQQARQAQPDGLTQLFADPNLIENLKNPKTSEMMKDP-----QLVAKLIGYKQNPQA
LbHop	VAKSRE---ARDPIARVFTPEAFRKIQENPKLSLLMLQP-----DYVKMVDTVVRDPSQ
hHop	ARLA-----ERKFMNPFNMPNLYQKLESDPRTRTLLSDP-----TYRELIEQLRNKPSD
	. . . : : : * : : : : : : : : : *
PfHop	IRIILSTCHPKISEGVEKFFGFKFTGEGNDAEERQRRQREEEERRKKKE-----
yHop	IGQDL-FTDPRMLTIMATLMGVDLNMDINQSNMPKEPETSSTEQKKDAEPQSDSTTS
LbHop	ARLYM--EDQRFALTMYLSGMKIPNDEDEDEERPSAKAA-----
hHop	LGTKL--QDPRIMTTLVLGVLDLSMDEEEIATPPPPPP-----
	: . : : : : * . : : : .
PfHop	-----EEE-RKKKEEEMKKQNRTPQIQGDEHKLKGNFYKQKKFDEALKEYEEA
yHop	KENSSKAPQKEESKESEPME---VDEDDSKIEADKEAEGNKFYKARQFDEAIEHYNKA
LbHop	-----AE-AKAKEEKKL---LTDNEKEAMALKEEGNKLYLSKRFEALSKYQEA
hHop	-----KKE-TKPEPMEED---LPENKKQALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKA
	* : : : : . : : . * ** . * : * : * . : : *
PfHop	IQINPNDIMYHYNKAAVHIEMKNYDKAVETCLYAMENRYNFKAEFIQVAKLYNRLAISYI
yHop	WELH-KDITYLNNRAAAEYKGEYETAISTLNDAVEQGREMRADYKVISKSFARIGNAYH
LbHop	QAKDPKNTLYILNVS AVYFEQRDYECITECERGIEHGRENHCDYTIIVAKLMTRHAFCLQ
hHop	KELDPTNMTYITNQAAVYFEKGDYNKRELCEKAIEVGRENREDYRQIAKAYARIGNSYF
	. . : * * : * . * : * : . . : * : : : : * * . .
PfHop	NMKKYDLAIEAYRKS LVEDNNRATRNALKELERRKE KEEKEAYIDPDKAEHKNKGNEYF
yHop	KLGLDKKTI EYYQKSLTEHRTADILTKLRNAEKELKKAEEAYVNPEKAEARLEGKEYF
LbHop	KQKKYEA AIDLYKRALVEWRNPD TLKKLTECEKEHQKAVEEAYIDPEIARQKKDEGNQYF
hHop	KEEKYKDAIHFNKSLAEHRTPDVLKKCQQA EKILKEQERLAYINPD LALEEKKNKGNECF
	: . . : * . * : : * * . . . : * : : : * : : : * : : : *
PfHop	KNNDFPNAKKEYDEAIRRNPNDAKLYSNRAAALTKLIEYPSALEDVMKAIELDPTFVKAY
yHop	TKSDWPN AVKAYTEMIKRAPEDARGYSNRAAALAKLMSFPEAIADCNKAIEKDPNFVRAY
LbHop	KEDKFPEAVAAYTEAIKRNP AEHTSYSNRAAAYIKLGAFNDALKDAEKCIELKDPFVKGY
hHop	QKGDYPQAMKHYTEAIKRNPDAKLYSNRAACYTKLLEFQLALKDCEECIQLEPTFIKGY
	: . : * : * * * * : : * : : * : * : * : * : * : * : *
PfHop	SRKGNLHFFMKDYKALQAYNKGLELDPNNKEC -----LEGYQRC AFKIDEMSKSEKVD
yHop	IRKATAQIAVKEYASALETLDAARTKDAEVNNGSSAREIDQLYYKASQ-QRFQPGTSNET
LbHop	ARKGHAYFWTKQYNRALQAYDEGLKVDPSNADC-----KDGLRLTIMRIQEMASGQSAD
hHop	TRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSCKEA-----ADGYQRCMMAQYN----RHDS
	** . * : * * : : . * . : : : :
PfHop	-EEQFKKSMADPEIQQIIISDPQFQIILQKLNENPNSISEYIKDPKIFNGLQKLIAGILK
yHop	PEETYQRAMKDPEVAAIMQDPVMSILQQAQONPAALQEHMKNPEVFKKIQTLIAAGIIR
LbHop	GDEAARRAMDDPEIAAIMQDSYMLVLKEMQNDPTRIQEYMKDPGISVKINKLISAGIIR
hHop	PEDVKRRAMADPEVQQIMSDPAMRLILEQMOKDPQALSEHLKNPVI AQKIQKLMVDGLIA
	: : : : * *** : * : * : : : : : * : * : * : * : : : * : :

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, procedeu-se o alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios TPR, um a um (Figura 12), já que todas as Hops conhecidas são proteínas modulares, portadoras de domínios TPR, num padrão muito parecido. Obteve-se então os valores de identidade cruzada, os quais estão apresentados na Tabela 3.

Como anteriormente mencionado, a hHop e a LbHop interagem com as respectivas Hsp90 por meio de grampos de dicarboxilato, ligação de natureza eletrostática entre resíduos de aspartato do motivo EEVD e duas lisinas básicas, presentes nos domínios TPR (BATISTA et al., 2016; GAVA et al., 2011). A conservação desses resíduos de lisina em todas as sequências estudadas foi analisada (Figura 12), de modo a verificar se o mecanismo de interação dos PfHop com a PfHsp90 via domínios TPR pode acontecer de maneira semelhante.

Figura 12: Alinhamento das sequências referentes aos domínios TPR da hHop, Sti1, LbHop e PfHop. Em verde, alinhamento do domínio TPR1, em vermelho alinhamento dos TPR2A e em azul, alinhamento dos TPR2B. Os asteriscos mostram os resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências. As caixas explicitam os resíduos de aminoácidos envolvidos no grampo de dicarboxilato com o domínio MEEVD da Hsp90.

```

PfHop      AQRLKELGNKCFQEGKYEEAVKYFSDAITND-PLDHVLYSNLSGAFASLGRFYEALESAN
yHop      -DEYKQQGNAAFTAKDYDKAIELFTKAIEVSETPNHVLYSNRSACYTSLKKFSDALNDAN
hHop      -NELKEKGNKALSVGNIDDALQCYSEAIKLD-PHNHVLVSNRSAAAYAKKGDYQKAYEDGC
LbHop      -NELKNEGNKEFSAGRYVEAVNYFSKAIQLD-GQNSVLVSNRSACFAAMQKYKDALDDAD
          .. *: ** : .*: :*: . : ***** *: : : * :..

PfHop      KCISIKKDWPGYIRKGC AEHGLRQLSNAEKTYLEGLKIDPNNKSLQDALSKVRNE
yHop      ECVKINPSWSKGYNRLGAAHLGLDLD EAEKNYKKALELDASN-----
hHop      KTVDLKPDWKGYSRKAALFLNRFEAKRTYEEGLKHEANN-----
LbHop      KCISIKPNWAKGYVRRGAALHGMRRYDDAIAAYEKGLSVDPSN-----
          : : : : * * * * * : * : : * * : * : : *

PfHop      GDEHKLKGNFYKQKKFDEALKEYEEAIQINPNDIMYHYNKAAVHIEMKNYDKAVETCLY
yHop      ADKEKAEGNKFYKARQFDEAIEHYNKAWELH-KDITYLNNRAAAEYKGEYETAISTLND
hHop      ALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPNTMYITNQAAVYFEKGDYNKCRELCEK
LbHop      AMAKKEGNKLYLSKRFEALSKYQEAQAKDPKNTLYIINVS AVYFEQRDYKECITECER
          . * * * * : * : : * : : : * : * : * : * : * : *

PfHop      AMENRYNFKAEFIQVAKLYNRLAISYINMKKYDLAIEAYRKS LVEDNNRATRNALKELER
yHop      AVEQGEMRADYKVISKSFARIGNAYHKLGLKKTIEYYQKSLTEHRTA-----
hHop      AIEVGRENREDYRQIAKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRT-----
LbHop      GIEHGRENHCDYTIIVAKLMTIRHAFCLQKQKKYEAADLYKRALVEWRNP-----
          : * : : : : * : : : : : : * : * : * : * :

PfHop      RKE
yHop      ---
hHop      ---
LbHop      ---

PfHop      KAEHKNKGNEYFKNNDFPNAKEYDEAIRRNPNDAKLYSNRAAALTKLIEYPSALEDDVM
yHop      -AEEARLEGKEYFTKSDWPNVAKAYTEMIKRAPEDARGYSNRAAALAKLMSFPEAIADCN
hHop      -ALEEKNKGNECFQKGDYPQAMKHYTEAIKRNPKDAKLYSNRAACYTKLLEFQLALKDCE
LbHop      -ARQKKDEGNQYFKEDKFPEAVAAYTEAIKRNPAEHTSYSNRAAAYIKLGAFNDAKDAE
          * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : *

PfHop      KAIELDPTFVKAYS RKGNLHFFMKDYKALQAYNKGLELDPNNKECLEGYQRCAPKI
yHop      KAIKDPNFVFRAYIRKATAQIAVKYASALETLDAARTKDAEVNNGSSA-----
hHop      ECIQLEPTFIKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC-----
LbHop      KCIELKPDVFKGYARKGHAYFWTKQYNRALQAYDEGLKVDPSN-----
          : *: * * : * * : * : * : * : * :

```

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3: Resultado do alinhamento entre as sequências da hHop, Sti1, LbHop e PfHop, comparando as sequências completas (total) e apenas os domínios TPR, um a um. As proteínas apresentam baixa afinidade entre si, cerca de 30%. Quando se compara os domínios TPR, a identidade é de cerca de 40% para o TPR1, 30% para o TPR2A e 50% para o TPR2B.

Proteína	Identidade com a PfHop(%)			
	Total	TPR1	TPR2A	TPR2B
LbHop	38	51	35	53
hHop	37	44	33	56
Sti1	33	41	39	45

De acordo com Batista et al, 2016, LbHop mostrou identidades de 35% e 39% com Sti1 e 39% com hHop respectivamente; em adição, Sti1 e hHop compartilham 39% de identidade. Apesar da baixa identidade entre as sequências, LbHop mostrou uma organização de domínios similar aquela encontrada em Sti1 e hHop, que contém três domínios TPR e dois domínios DP. O domínio TPR1 apresentou identidade de aproximadamente 45% com aqueles das proteínas de levedura e humana. TPR2A e TPR2B, exibiram uma conservação de 31% e 43%, respectivamente, com respeito à homóloga de levedura e 46% e 48% respectivamente com relação à homóloga humana.

Os valores de identidade obtidos para a sequência completa da PfHop com relação às suas ortólogas, hHop e ySti1 são muito próximos dos obtidos para a identidade da LbHop, assim como os valores obtidos quando da análise dos domínios TPR separadamente. Apesar da baixa identidade apresentada entre as sequências analisadas, que aumenta levemente comparando os domínios TPR um a um, os valores estão dentro do esperado para esse tipo de proteínas.

4.2. Expressão e Purificação da PfHop recombinante

A Figura 13 ilustra o processo de purificação da PfHop recombinante, mostrando que a expressão heteróloga da mesma foi feita com sucesso e adequadamente purificada através dos dois passos cromatográficos utilizados, afinidade, na qual íons Ni^{2+} estão imobilizados sobre a fase estacionária e retém a proteína através da cauda de poli histidinas e exclusão por tamanho, na qual as moléculas são separadas com base em seu tamanho, já que as menores

entram nas cavidades da fase estacionária enquanto que as maiores apenas passam entre os grânulos da mesma.

A pureza obtida foi necessária e suficiente para a realização dos testes estruturais acima descritos.

Figura 13: Purificação via SDS-Page 12% da PfHop. Sendo, MM = marcador de massa molecular. 1: Não induzido, 2: Induzido, 3: Sobrenadante do lisado, 4: Fração pós afinidade, 5: Fração pós cromatografia de exclusão molecular preparativa.

Fonte: Autoria própria.

A PfHop foi obtida na fração induzida (Figura 13A, canaleta 2) e no sobrenadante do lisado (Figura 13A, canaleta 3), o que nos mostra que a proteína foi majoritariamente expressa na forma solúvel. As bandas únicas das purificações por afinidade (Figura 13A, canaleta 4) e cromatografia por exclusão molecular preparativa (Figura 13A, canaleta 5), confirmam uma purificação bem sucedida, com grau de pureza acima de 95%, necessário e suficiente para as análises que se desejava realizar.

4.3. Espectropolarimetria de dicroísmo circular

O espectro obtido a partir da análise da PfHop (Figura 14) apresenta mínimos aproximadamente em 210 e 222 nm, máximo em 192 nm, além do formato da curva, típico de uma proteína rica em hélices α . Para a determinação da quantidade dos elementos de estrutura secundária, foram usados dois métodos distintos, CDNN Deconvolution® e Dichroweb (Tabela 4). Conforme visto na Tabela 4, os dados obtidos foram bastante próximos pelos dois métodos e que corroboram a hipótese dada pela espectropolarimetria de dicroísmo circular, de uma PfHop rica em hélices α .

Figura 14: Espectro de CD obtido para a PfHop a 6 μ M. Os mínimos verificados, em 210 e 222 nm somadas ao formato da curva, sugerem uma proteína rica em hélices α .

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4: Quantidade de elementos de estrutura secundária obtidos através do CDNN Deconvolution® e Dichroweb.

<i>Elemento de estrutura secundária</i>	Método utilizado	
	Dichroweb (%)	CDNN Deconvolution (%)
Hélices α	57	52
Folha β	12	9
Volta β	13	14

A Hop uma proteína modular, constituída por 3 domínios TPR e 1 domínio DP, previamente definidos, que por sua vez são constituídos por hélices alfa, três motivos num padrão hélice volta hélice para o domínio TPR e um conglomerado de hélices alfa numa estrutura mais globular para o DP1 (estrutura cristalográfica PDB de código 2LLV) e num formato de V para o DP2 (estrutura cristalográfica PDB de código 2LLW). Sendo assim, é coerente e esperado que as hélices α se apresentem como tipo de estrutura secundária majoritário para uma proteína como a PfHop, fato corroborado por outros estudos, com proteínas homólogas, como a LbHop, que também apresentou estrutura secundária majoritariamente formada por hélices α , possuindo 75% de hélices α e 5% de folhas β . (BATISTA et al., 2016).

Variando-se a concentração de PfHop na amostra analisada, não foram verificadas alterações detectáveis na estrutura secundária da proteína – as bandas continuam aparecendo em 210 e 222 nm conforme se aumenta a concentração, como verificado na Figura 15, indicativo de que o aumento na concentração de proteína não causou alterações na organização da estrutura secundária da mesma, como pode ser avaliado pelo ponto isodicroico, ponto no qual as curvas obtidas por CD (em miligraus) se cruzam. Se isso ocorre próximo ao zero, é indicativo de que não há mudanças estruturais ocorrendo de uma curva para a outra, ou seja: a estrutura secundária da PfHop não está sofrendo alterações quando se causa um incremento em sua concentração.

Figura 15: (A) Comparação entre espectros de CD de diferentes concentrações de PfHop, 2, 4 e 6 μM . O aumento na concentração de proteína não causa efeitos detectáveis na estrutura secundária da mesma, os mínimos se mantêm em 210 e 222 nm e o ponto isodicroico em zero. (B) Quando os dados são transformados para elipicidade molar residual, os espectros se sobrepõem, mostrando que não há efeitos na estrutura secundária da PfHop quando se altera a concentração. O ponto isodicroico está apontado por uma seta na figura 15A.

Fonte:

Autoria própria.

4.3.1. Estabilidade

Proteínas, de uma forma geral, possuem estabilidade intrínseca dependente da forma como seus aminoácidos se organizam, sua sequência de aminoácidos, ligações intermoleculares, organização das moléculas de solvente ao seu redor, e, consequentemente, resistem a diferentes condições ambientais e químicas de maneiras distintas. Para a PfHop foi constatado que sua estrutura secundária se mantém intacta após congelamento e resfriamento contínuo durante 7 dias, não apresentando bandas de degradação no gel de SDS-Page 12% e nem alterações no espectro de CD, quando comparado ao espectro da proteína nativa, indicando que pode ser mantida congelada e/ou refrigerada para utilização posterior, ao menos para estudos estruturais.

4.3.2. Fluorescência

A PfHop possui 567 aminoácidos, conforme alinhamento mostrado na Figura 11 sendo 31 resíduos aromáticos que absorvem luz na região de 280 nm, a saber: 1 triptofano (W74, localizado no domínio TPR1) e 30 tirosinas. Logo, espera-se uma intensidade de

fluorescência maior à 280 nm (31 resíduos fluorescendo) do que à 295 nm (apenas um resíduo fluorescendo) para ambos os casos, proteína nativa e termicamente desnaturada.

Neste trabalho, dois comprimentos de onda foram utilizados para a excitação: 280 e 295 nm, utilizando como sonda, o W74, mostrado anteriormente como sendo conservado em todas as sequências analisadas, além das tirosinas. No primeiro, excitam-se todos os resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína. No segundo, somente os resíduos de triptofano. Após a excitação dos resíduos aromáticos mencionados, os elétrons π voltarão ao seu estado fundamental, dispensando a energia adquirida majoritariamente na forma de luz (LAKOWICZ, 2006). O comprimento de onda de emissão é mais sensível à camada de solvatação e, portanto, ao ambiente químico. Sendo assim, os fluoróforos emitirão maior quantidade de energia na forma de luz se estiverem rígidos, protegidos do solvente, e uma menor quantidade de energia se expostos ao solvente, já que perdem energia durante os choques com a camada de solvatação e por vibração, já que os resíduos estão mais livres na proteína desenovelada. Na prática, se verifica uma diminuição na intensidade de fluorescência com a perda da estrutura terciária da proteína (LAKOWICZ, 2006).

Figura 16: Espectro de fluorescência para a PfHop excitada à 280 nm (A) e a 295 nm (B), nativa e termicamente desnaturada.

Fonte: Autoria própria.

Para as duas condições testadas, proteína nativa e desnaturada a 90 °C por 30 minutos, obteve-se através das curvas o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão, ponto máximo da curva e calculou-se o centro de massa espectral, $\langle\lambda\rangle$, calculado entre 300 e 420 nm, através da equação citada na seção 3.10.3. Os valores são mostrados na Tabela 5. Os dados sugerem uma perda na estrutura

proteica e consequente exposição dos resíduos aromáticos ao solvente, já que quando expostos ao solvente, menos energia será dissipada na forma de fluorescência e, portanto, a mesma ocorrerá em comprimentos de onda maiores ($E = hc/\lambda$).

Tabela 5: Dados de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$ obtidos para a PfHop. Os valores obtidos sugerem que o único triptofano presente na amostra encontra-se protegido do solvente na proteína nativa, tornando-se parcialmente exposto a este com a desnaturação térmica.

Amostra	Parâmetros			
	Excitação a 280 nm		Excitação a 295 nm	
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\langle\lambda\rangle$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\langle\lambda\rangle$ (nm)
Pf Hop nativa 6 μM	307	334 ± 1	338	344 ± 1
PfHop 90 °C	335	343 ± 1	353	338 ± 1

De acordo com os valores obtidos para o $\lambda_{\text{máx}}$, pode-se inferir que, na proteína enovelada, o único triptofano presente na PfHop, no domínio TPR1, está enterrado, protegido do solvente ($\lambda_{\text{máx}} = 338$), sendo completamente exposto ao mesmo, quando a proteína sofre desnaturação térmica ($\lambda_{\text{máx}} > 350$ nm).

4.3.3. Desenovelamento térmico acompanhado por CD.

As proteínas de forma geral quando submetidas a altas temperaturas ou alguns agentes químicos, tendem a perder sua estrutura terciária e secundária, desnaturando-se. Isso pode acontecer de diversas formas, dependendo da proteína em questão: se é mono ou multi-domínios, do tipo de ligações intermoleculares existentes entre os aminoácidos, e também o solvente na qual ela se encontra.

O ensaio de desnaturação térmica da PfHop (Figura 16) foi realizado submetendo-se a proteína a stress térmico, com temperatura variando de 20 a 90 °C e o inverso, de 90 a 20 °C, 1 °C/min, em dois comprimentos de onda, os dois mínimos observados no espectro de CD da PfHop nativa, 220 e 222 nm, objetivando-se verificar a perda de estrutura secundária com o aumento da temperatura. No primeiro passo, com a temperatura aumentando, verificou-se o que parecem ser duas transições, que possibilitaram o cálculo de duas T_m distintas, sugerindo

que a PfHop deve desnaturar-se em duas etapas distintas. No segundo, passo, resfriando-se a amostra, verificou-se ligeira recuperação de sinal, o que sugere que o processo de desnaturação da PfHop é parcialmente reversível.

Figura 17: Desnaturação térmica acompanhada por CD para a PfHop. O acompanhamento foi realizado de 20 a 90 °C e o inverso, de 90 a 20 °C. Com esse dado, não fica muito claro se o desenovelamento acontece em uma ou duas etapas, porém sugere que o mesmo é parcialmente reversível.

Fonte: Autoria própria.

Durante um processo de desnaturação acompanhado por CD, se verifica gradativa perda de sinal, indicativo de que a proteína está perdendo sua estrutura secundária, fornecendo uma curva em formato sigmoidal. A meia altura da curva fornece a T_m , temperatura média da transição, na qual 50% da proteína está enovelada e 50% desenovelada.

A análise e tratamento dos dados foram realizados de duas formas distintas, de modo a tentar confirmar a existência da segunda transição, muito sutil no gráfico anterior. A primeira foi realizada usando a análise de Boltzman (Figura 17), que forneceu uma única $T_m = 48 \pm 1$ °C e a segunda usando BiDose Fit (Figura 17), que forneceu duas T_m de desnaturação, $T_{m1} = 46 \pm 0,4$ °C e $T_{m2} = 50 \pm 1$ °C. Foi verificado, através da análise dos residuais (painel inferior

da Figura 17), que o ajuste propondo duas transições se adequa melhor ao conjunto de dados, sugerindo que a PfHop se desnatura seguindo duas etapas.

Quando se fez o tratamento dos dados da etapa reversa do processo, de 90 a 20 °C, obteve-se uma única transição, com $T_m = 53$ °C, indicativo de que a etapa reversível do processo é a correspondente a segunda transição, com temperatura média de desenovelamento próxima, de 50 °C. O objetivo de se elevar a temperatura até 90°C e depois reverter a mesma até o ponto inicial, é verificar como ocorre a desnaturação causada pela temperatura e também analisar se a perda de estrutura causada pela temperatura é espontaneamente reversível ou não. No caso da PfHop, a etapa reversa do processo, teve leve ganho de sinal ao longo do processo, indicando certa reversibilidade.

Figura 18: Curva de desnaturação térmica para a PfHop ajustada por Boltzman Fit (azul), que considera uma única transição para o ajuste e BiDose Fit (vermelho), que por sua vez, considera duas transições para efetuar o ajuste. O ajuste para uma transição, com $T_m = 48\text{ °C}$ não se adequa ao conjunto de dados, enquanto o ajuste para duas transições se ajusta melhor ao mesmo, fornecendo duas temperaturas médias de desnaturação, $T_{m1} = 46$ e $T_{m2} = 50\text{ °C}$, indicativo de que a PfHop se desnatura em duas etapas distintas, coerente com o fato de ser uma proteína multidomínios.

Fonte: Autoria própria.

Isso nos permite estimar que, dos três domínios TPR da PfHop, dois devem desnaturar conjuntamente, talvez TPR2A e TPR2B, resultando na transição de maior variação de sinal e $T_m = 46,0 \pm 0,5\text{ °C}$ e posteriormente o outro domínio se desnatura reversivelmente, resultando na segunda transição, mais gradual e $T_m = 50 \pm 1\text{ °C}$. Porém, ainda não existem dados suficientes para a confirmação dessas hipóteses, faltando analisar a desnaturação de cada domínio individualmente, de modo a verificar suas T_m , ou uma análise da desnaturação térmica da PfHop acompanhada por fluorescência, usando como sonda o único triptofano

presente na proteína e localizado no domínio TPR1, de modo a verificar o comportamento deste frente ao aquecimento.

4.3.4. Desenovelamento químico acompanhado por CD.

O ensaio de desnaturação química da PfHop foi realizado mantendo-se a concentração de proteína constante a 5,6 μM e variando-se a concentração de ureia a cada 0,25 M, de 0 a 7,0 M, objetivando-se verificar a perda de estrutura secundária conforme o aumento da concentração de agente desnaturante.

A análise e tratamento de dados, como para a desnaturação química, foi realizada considerando-se um desenovelamento em uma e duas etapas, verificando-se que o ajuste por BiDose Fit, se adequa melhor ao conjunto de dados (Figura 18), sugerindo que o desenovelamento acontece em duas etapas, a primeira desnaturação ocorrendo a 2 M de ureia enquanto que a segunda ocorre a 4 M, corroborando os dados obtidos através da análise por desnaturação térmica, mostrando que a desnaturação da PfHop realmente se dá em duas etapas.

Figura 19: Desnaturação química acompanhada por CD ajustada por BiDose Fit. O ajuste para duas transições se ajusta melhor ao conjunto de dados, fornecendo duas concentrações médias de desnaturação, $2,0 \pm 0,1$ e $4,0 \pm 0,1$ M de ureia.

Fonte: Autoria própria.

4.4. Caracterização hidrodinâmica por aSEC

A partir da análise dos dados de aSEC, pode-se observar que a PfHop apresentou volume de eluição 12,2 mL, eluindo entre as proteínas gama globulina (160 kDa) e BSA (67 kDa). Os parâmetros hidrodinâmicos obtidos foram os seguintes: $R_s = 43 \pm 4 \text{ \AA}$, $MM_{app} = 126 \pm 2 \text{ kDa}$, $f/f_0 = 1,6 \pm 0,1$ calculado pela razão entre o R_s experimental e o teórico previsto para o monômero. Estes dados sugerem que a PfHop se comporta como um monômero alongado ou mesmo um dímero em solução, sendo este o estado oligomérico confirmado por outras técnicas de maior confiança e descrito nas seções seguintes. A Figura 12 mostra o perfil de eluição da PfHop com relação ao padrão de proteínas.

Figura 20: Análise hidrodinâmica da PfHop por aSEC. (A) Padrão de eluição da PfHop na concentração de 6 μM com relação as proteínas do padrão, Apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), BSA (67 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa) e Citocromo C (12,1 kDa). A PfHop eluiu entre a γ -globulina e a BSA, num volume de 12,2 mL. (B) Regressão linear do log da MM e do coeficiente de partição, K_{av} , calculado através da relação mostrada na seção 3.10.4, que permitiu o cálculo da massa molecular da PfHop, através dos coeficientes angular e linear da reta.

Fonte: Autoria própria.

4.5. Caracterização hidrodinâmica por Ultracentrifugação analítica

Após a análise e tratamento de dados de velocidade de sedimentação através do software SedFit, obteve-se a curva da distribuição de c (S) para a PfHop (Figura 19A), na qual verificou-se que a mesma sedimentou na forma de duas espécies distintas, monomérica e

dimérica, com massas moleculares de $MM = 62 \pm 10$ kDa e $MM = 137 \pm 12$ kDa respectivamente. Na sequência, por regressão linear dos valores de $s_{20,w}$ em função da concentração de proteína, determinou-se o coeficiente de sedimentação (Figura 19B) para cada uma das partículas, utilizando para tanto o volume parcial específico, densidade e viscosidade do tampão, sendo $s_{20,w}^0 = 3,4 \pm 0,3$ S para o monômero e $s_{20,w}^0 = 6,7 \pm 0,1$ S para o dímero, sugerindo que a PfHop se apresenta em um equilíbrio monômero-dímero quando em solução. Utilizando-se a razão entre o s teórico pelo valor do $s_{20,w}^0$ obtido experimentalmente, obteve-se a f/f_0 para ambas as espécies, sendo 1,8 para o monômero e 1,4 para o dímero. E?????

Figura 21: Ensaio de velocidade de sedimentação com a PfHop. A) Distribuição dos coeficientes de sedimentação. A proteína sedimentou-se como duas espécies, monômero ($MM = 62 \pm 10$ kDa e $f/f_0 = 1,8$) e dímero ($MM = 137 \pm 12$, $f/f_0 = 1,4$). B) Determinação do $s_{20,w}^0$ por regressão linear dos valores de $s_{20,w}$ e [PfHop] em mg.mL^{-1} , sendo os valores obtidos de $3,4 \pm 0,2$ S para o monômero e $6,7 \pm 0,1$ S para o dímero. Estes dados sugerem que a PfHop se apresenta num equilíbrio monômero-dímero quando em solução.

Fonte: Autoria própria.

Durante as análises por aSEC, detectou-se a presença de uma única espécie, nas concentrações analisadas, entre 0,2 e 1 mg.mL^{-1} provavelmente a espécie monomérica, já que a referida técnica é bastante sensível a efeitos de forma. De acordo com a f/f_0 calculada considerando o R_s para a espécie monomérica sugere uma partícula alongada, o que pode explicar o alto valor de MM_{app} obtido, próxima a massa do dímero.

Na literatura, existem descrições de Hop monoméricas (BATISTA et al., 2016), diméricas (FLOM et al., 2007; ONUOHA et al., 2008; ZININGA et al., 2015), ou ambas

(SPUY et al., 2001). De acordo com Batista et al, 2016, a LbHop se comporta como um monômero alongado quando em solução ($MM = 63 \pm 2$ kDa, $f/f_0 = 1.65 \pm 0.04$ e $s_{20,w}^0 = 3,5 \pm 0,02$ S).

Um trabalho publicado por (ZININGA et al., 2015), descreve a PfHop como um dímero, capaz de se auto-associar na presença de ADP e ATP, sem diferenças significativas, embora apresente afinidade maior de auto-associação na ausência de nucleotídeos, concordando com trabalhos que relatam que a PfHop exibe atividade ATPásica. A associação de protômeros da PfHop, segundo os pesquisadores, ocorre mesmo em escala nanomolar.

Aparentemente, o fato de a PfHop se apresentar também como um dímero em solução, parece um efeito do aumento da concentração da mesma, já que, ao calcular a razão dímero-monômero, verifica-se que a mesma aumenta com o aumento da concentração de proteína, conforme ilustrado na Figura 22, sugerindo que esse comportamento seja, portanto, um efeito das altas concentrações utilizadas durante os ensaios, muito mais alta do que a concentração fisiológica da PfHop no protozoário, embora o trabalho supracitado tenha encontrado PfHop em estado dimérico mesmo em escala nanomolar.

Figura 22: Descrição da variação da área dos picos com relação ao aumento da concentração de PfHop. O cálculo foi realizado dividindo-se a área de cada pico da espécie oligomérica pela área total (monômero + dímero). Verifica-se, conforme se procede um aumento na concentração de proteína, uma diminuição na concentração do monômero e um aumento na concentração de dímero, sugerindo que o processo de dimerização pode ser um artefato experimental, resultado das condições utilizadas durante as análises.

4.6. Espalhamento de raios X a baixo ângulo

Ambas, Hop e Sti1 têm sido descritas na literatura como dímeros em solução, com base em cromatografia de exclusão molecular por tamanho, técnica que leva em conta apenas a forma da proteína, fornecendo uma massa molecular aparente. Quando se usa equilíbrio de sedimentação por ultracentrifugação analítica, método insensível aos efeitos de forma (LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002)(Borges & Ramos, 2011), os resultados indicam que há monômeros e dímeros em equilíbrio em solução. Entretanto, em leveduras e mamíferos, o estado oligomérico descrito para a Hop na literatura é monomérica (BATISTA et al., 2016a; GONÇALVES; GAVA; RAMOS, 2010; YI; DOUDEVSKI; REGAN, 2010).

Os experimentos de SAXS foram realizados com o objetivo de investigar a estrutura da PfHop em baixa resolução, produzir modelos *ab initio* e confirmar o estado oligomérico obtido por AUC e aSEC, já que a maioria das Hops descritas na literatura, são monoméricas.

A Figura 23 mostra os resultados obtidos, cujos dados sugerem que a amostra de PfHop testada se apresentou homogênea, sem agregação aparente como resultado de alta concentração ou de muito tempo de exposição aos raios-X. A curva de espalhamento (Figura 23A) apresenta formato característico de uma proteína alongada, e a linearidade observada na região de Guinier (inserto), permite classificar o sistema como monodisperso. A PfHop se encontrava enovelada, porém deve ser considerado que a mesma possui certa flexibilidade, que pode ser atribuída ao linker entre os domínios TPR1 e TPR2AB.

É bem estabelecido que, a partir da curva de espalhamento, podem ser obtidos importantes parâmetros, tais como raio de giro (R_g) e MM, aplicando a lei de Guinier e estimando o $I(0)$ para a proteína em estudo. Para a PfHop foram obtidos os valores de $MM = 156 \pm 3$ kDa e $R_g = 64 \pm 1$ Å, sugerindo que a mesma se comporta como um dímero em solução, nas condições analisadas, em concordância com os dados obtidos por AUC.

Utilizando o programa GNOM foi possível obter a $p(r)$ para a PfHop, fornecendo excelente aproximação para os dados experimentais, como se verifica na figura 23B e valor de $D_{m\acute{a}x} = 230 \pm 5$ Å, sugerindo, para a PfHop um formato alongado, com características de uma proteína multidomínios, já que a curva exhibe imperfeições quando os valores de $D_{m\acute{a}x}$ começam a decair, fazendo com que a curva $p(r)$ não seja uma gaussiana perfeita. Os dados obtidos por SAXS corroboram que a PfHop se comporta como um dímero em solução, nas condições de concentração proteica analisadas.

Figura 23: (A) Curvas de SAXS experimental para a PfHop (círculos abertos) - a curva vermelha representa o ajuste GNOM. A proteína se apresenta como um sistema monodisperso, o que pode também ser observado na curva de Guinier (inserto), através do qual se obteve que a PfHop possui um $R_g = 64 \pm 1 \text{ \AA}$. A curva de SAXS foi então utilizada para gerar a (B) curva de distribuição de distâncias, $p(r)$, através da qual inferiu-se que a proteína em estudo possui um $D_{\text{máx}} = 240 \pm 10 \text{ \AA}$, indicativo de uma partícula alongada.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6: Compilação dos dados obtidos por aSEC, AUC e SAXS. Todas as três técnicas utilizadas para verificar o estado oligomérico da PfHop sugerem que a mesma se comporta como um dímero quando em solução, nas concentrações analisadas.

Propriedades	Predito para uma esfera		Determinação experimental			
			<i>aSEC</i>	<i>SV-AUC</i>	<i>SAXS</i>	
	<i>Monômero</i>	<i>Dímero</i>		<i>Monômero</i>	<i>Dímero</i>	
MM (kDa)	68,2	136,5	126 ± 2	60 ± 10	140 ± 10	156 ± 3
$s_{20,w}^0$ (S)	3,4	6,7	-	$3,4 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,1$	-
R_s (Å)	27		43 ± 4	-	-	-
f/f_0	1	1	$1,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	-
R_g (Å)	-	-	-		-	64 ± 1
D_{max} (Å)	-	-	-		-	230 ± 5

A tabela 6 mostra os dados todos os dados hidrodinâmicos obtidos para a PfHop, por AUC, aSEC e SAXS. Os dados mostram certa concordância para todas as técnicas utilizadas para este fim durante este trabalho.

Por fim, partindo-se então da $p(r)$ e da consideração de que o sistema é monodisperso, foi possível gerar o modelo *ab initio* mostrado na Figura 24, um modelo em baixa resolução para a estrutura terciária nativa da PfHop. Para tal feito, foram utilizados como base os modelos sugeridos pelo software DAMMIN e tais modelos foram validados correlacionando as propriedades hidrodinâmicas e estruturais preditas para este sistema, obtidas através do software HydroPro, com as obtidas experimentalmente pelas técnicas de aSEC, AUC e SAXS (dados sumarizados na Tabela 7). A boa relação entre os dados experimentais (R_g e D_{max}) e os preditos para o modelo *ab initio* indicam que este é um bom representante para a estrutura em baixa resolução da PfHop. A diferença nos valor experimental para $s_{20,w}^0$ do dímero da PfHop e para o modelo *ab initio* pode ser devido ao último se comportar como um corpo rígido representando um “ensemble” das várias conformações da PfHop em solução. Se for considerado que se trata de uma proteína multidomínios e que possui flexibilidade entre as regiões conectoras, exceto entre os domínios TPR2A e TPR2B que se sabem serem conectados por um linker rígido, a discrepância pode ser relacionada a questão de rigidez do corpo rígido do modelo *ab initio*. Portanto, o modelo representa um dímero alongado e é consistente com as propriedades hidrodinâmicas e estruturais determinadas experimentalmente para a PfHop.

Figura 24: Modelo *ab initio* obtido a partir dos dados de SAXS obtidos para a PfHop como um dímero alongado.

Fonte: Autoria própria.

5 CONCLUSÕES

- O alinhamento entre as sequências de PfHop e suas homólogas mostrou baixa identidade (cerca de 30%), identidade essa aumentada quando se compara os domínios TPR um a um, cerca de 40% para o TPR1, 30% para o TPR2A e 50% para o TPR2B. A identidade entre os domínios TPR de Hops de diferentes organismos, confirma a importância destes para a interação proteína-proteína, responsáveis pela interação com Hsp70 e Hsp90;
- A proteína em estudo, PfHop, foi expressa em sua forma solúvel, apresentando grau de pureza superior a 95% após o processo de purificação por dois passos cromatográficos;
- A PfHop foi obtida enovelada, com espectro de CD característico de uma proteína majoritariamente formada por hélices α – mínimos em 210 e 222 nm e máximo aproximadamente em 192 nm. Após a deconvolução do espectro de CD, obteve-se uma composição de cerca de 60% de hélices α , compatível com a sua construção por domínios DP e TPR, que são, basicamente, construções de hélices alfa e com os dados descritos para homólogas na literatura, como os 75% de hélices alfa para a LbHop descritos por Batista et al, 2016;

- Mantém-se estável, ao menos estruturalmente, se submetida a congelamento (- 20 °C) por 24 h ou resfriamento a 4 °C durante 7 dias;
- Quando se procede o aumento na concentração de PfHop, não se verificou alterações na estrutura secundária da mesma – os mínimos se mantêm constantes, ponto isodicroico em zero e os espectros em elipticidade molar se sobrepõem;
- Os dados sugerem que o desenovelamento acontece em duas etapas, indicativo e coerente com uma proteína multidomínios, com domínios com diferentes estabilidades frente a temperatura e à agentes desnaturantes. Uma hipótese é que a primeira transição, mais intensa, com redução de sinal sejam os domínios TPR2A e TPR2B, que estão conectados por um linker rígido perdendo estrutura secundária neste momento, e uma com menor variação de sinal PfHop, que pode ser relativa a desnaturação do domínio TPR1;
- O único triptofano presente, se encontra no domínio TPR1 e está protegido do solvente na proteína nativa, já que $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre em comprimentos de onda próximos a 330 nm;
- Os parâmetros hidrodinâmicos obtidos por aSEC sugerem que a PfHop se apresenta como um monômero alongado ou como dímero em solução;
- Os parâmetros hidrodinâmicos, obtidos por AUC, sugerem que a PfHop se apresenta em um equilíbrio monômero dímero em solução;
- Os dados de SAXS sugerem que a PfHop é um sistema monodisperso, com certa flexibilidade, alongado com $MM = 156 \pm 3$ kDa, $R_g = 64 \pm 1$ Å e $D_{\text{máx}} = 230 \pm 10$ Å.
- O modelo *ab initio* gerado sugere que a PfHop é um dímero alongado;
- Os resultados aqui apresentados permitiram aprofundar no conhecimento da estrutura em baixa resolução da PfHop.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIRA, S. et al. Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. **Nature communications**, v. 5, p. 5484, 2014.
- BATISTA, F. A. H. et al. From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/Hsp90 Network. **Current protein & peptide science**, v. 16, n. 8, p. 735–753, 2015.
- BATISTA, F. A. H. et al. From conformation to interaction: techniques to explore the Hsp70/Hsp90 network. n. 222, p. 1–37, 2016a.
- BATISTA, F. A. H. et al. **Low sequence identity but high structural and functional conservation: The case of Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop/Sti1) of Leishmania braziliensis**, 2016b.
- BLAIR, S. et al. Resistencia de Plasmodium falciparum a tres fármacos antimaláricos en Turbo. v. 9, n. 1, p. 23–29, 2001.
- BLATCH, GREGORY L.; LÄSSLE, MICHAEL; ZETTER, BRUCE R; KUNDRA, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, v. 194, n. 2, p. 277–282, 1997.
- BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M. The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. **BioEssays**, v. 21, n. 11, p. 932–939, 1999.
- BOHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. v. 5, n. 3, p. 191–195, 1992.
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Analysis of Molecular Targets of Mycobacterium tuberculosis by Analytical Ultracentrifugation. p. 1276–1285, 2011.
- CARLTON, J. M. et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite Plasmodium yoelii yoelii. v. 419, n. October, 2002.
- CARRIGAN, P. E. et al. Domain : domain interactions within Hop , the Hsp70 / Hsp90 organizing protein , are required for protein stability and structure. **Protein Sci**, v. 15, n. 3, p. 522–532, 2006.
- CHEN, S.; SMITH, D. F. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 52, p. 35194–35200, 1998.
- CHENG, C. et al. Analysis of the Complete Genome Sequence of the Hz-1 Virus Suggests that It Is Related to Members of the Baculoviridae. v. 76, n. 18, p. 9024–9034, 2002.
- D N is the difference in refractive index between the denaturant solution and water (or buffer) at the sodium D line. The equation for urea solutions is based on data from Warren and Gordon [86], and the equation for GdmCl solutions is from Nozaki [73]. p. 9988, [s.d.].
- FLOM, G. et al. Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization , interaction with Hsp70 and Hsp90 and in vivo functions. v. 167, p. 159–167, 2007.
- FREITAS, F. et al. Uncomplicated Plasmodium vivax and P. falciparum malaria in Brazil: evidence on single and combined drug treatments recommended by official guidelines. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, n. 10, p. 2285–2294, 2007.
- GAVA, L. M. et al. Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the C-terminus of human 90 kDa heat shock protein Hsp90 and the mitochondrial translocase of outer membrane Tom70. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 513, n. 2, p. 119–125, 2011.
- GITAU, G. W. et al. Characterisation of the Plasmodium falciparum Hsp70-Hsp90 organising protein (PfHop). **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 2, p. 191–202, 2012.
- GLATTER, O. **Small angle X-ray scattering**. London: [s.n.].
- GOMES, A. P. et al. Malária grave por Plasmodium falciparum. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GONÇALVES, D. C.; GAVA, L. M.; RAMOS, C. H. I. Human Hsp70 / Hsp90 Organizing Protein (Hop) D456G Is a Mixture of Monomeric and Dimeric Species. p. 492–498, 2010.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of X-rays**. New York: John Wiley and Sons, 1955.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324–332, 2011.

HATHERLEY, R. et al. Plasmodium falciparum Hop: Detailed analysis on complex formation with Hsp70 and Hsp90. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, n. 1, p. 440–445, 2015.

HONORE, B. et al. Human Protein Containing the TPR Motif and Sharing Identity to the. v. 267, n. 12, p. 8485–8491, 1992.

JÄÄTELÄ, M.; WISSING, D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **Annals of Medicine**, v. 24, n. 4, p. 249–258, 1992.

JUNQUEIRA. **Biologia Molecular e celular**. 9º ed. [s.l.] Saraiva, 2012.

KONAREV, P. V et al. PRIMUS : A Windows PC-based system for small- angle scattering data analysis. n. October, 2003.

LAKOWICZ, J. R. Protein Fluorescence. In: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. p. 529–575.

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

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.

LODISH, BERK, KAISER, C. Estrutura e função das proteínas. In: ARTMED (Ed.). . **Biologia celular e molecular**. 7. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 59–114.

MARK D. ADAMS; SUSAN E. CELNIKER; ROBERT A. HOLT; CHERYL A. EVANS; JEANNINE D. GOCAYNE; PETER G. AMANATIDES, ET AL. The genome sequence of Drosophila melanogaster. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 2000.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. DA. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181–188, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, D. DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. [s.l.: s.n.].

NICOLET, C.M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from Saccharomyces cerevisiae. **Mol Cell Biol**, v. 9, p. 3638–3646, 1989.

ODUNUGA, O. O.; LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Hop: More than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **BioEssays**, v. 26, n. 10, p. 1058–1068, 2004.

OLSEN, E. D. **Métodos ópticos de analisis**. 1º ed. Barcelona: Editora Reverté, 1990.

ONUOHA, S. C. et al. Structural Studies on the Co-chaperone Hop and Its Complexes with Hsp90. v. 90, p. 732–744, 2008.

PAVITHRA, S. R.; KUMAR, R.; TATU, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 9, p. 1701–1715, 2007.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

RITOSSA, F.; MITTEILUNGEN, K. Shock and DNP in D r o s o p h i l a. v. 55, n. 1957, p. 571–573, 1962.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 10, p. 630–642, 2013.

SCHEUFLER, C. et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 199–210, 2000.

SCHMID, A. B. et al. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. **The EMBO journal**, v. 31, n. 6, p. 1506–17, 2012.

SCHUCK, H. Z. P. Global Multi-Method Analysis of Affinities and Cooperativity in Complex Systems of Macromolecular Interactions Huaying. **Anal Chem**, v. 84, n. 21, p. 9513–9519, 2012.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The interactions network of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania Parasites. In: **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**. [s.l: s.n.]. p. 53–82.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Malária por Plasmodium falciparum : estudos proteômicos. v. 24, n. 4, p. 394–400, 2012.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. Espectroscopia de absorção. In: **Princípios de análise instrumental**. 5° ed. São Paulo: Mc Grall Hill, 2009.

SMITH, D. F. et al. Identification of a 60-Kilodalton Stress-Related Protein , p60 , Which Interacts with hsp90 and hsp70. v. 13, n. 2, p. 869–876, 1993.

SPUY, J. VAN DER et al. The Cochaperone Murine Stress-Inducible Protein 1 : Overexpression , Purification , and Characterization. v. 469, p. 462–469, 2001.

SVERGUN, D. I. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. **J. Apply Cryst.**, v. 25, p. 495–503, 1992.

SVERGUN, D. I. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. v. 76, n. June, p. 2879–2886, 1999.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. I. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. **Protein and peptide letters**, v. 18, p. 101–109, 2011.

TORRE, D. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. v. 78, n. February, p. 719–730, 2000.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, 2007.

VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **J. Apply Cryst.**, v. 36, p. 860–864, 2003.

www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf.

www.infectologia.org.br/malaria.

YANG, S. Y. V. J. T. Determination of protein secondary structure. In: **Circular Dichroism and the conformation analysis of biomolecules**. 1. ed. New York: Plenum Press, 1996. p. 69–108.

YI, F.; DOUDEVSKI, I.; REGAN, L. HOP is a monomer: Investigation of the oligomeric state of the co-chaperone HOP. **Protein Science**, v. 19, n. 1, p. 19–25, 2010.

ZHANG, Z. et al. Characterization of a Plant Homolog of Hop , a Cochaperone of Hsp90 1. v. 131, n. February, p. 525–535, 2003.

ZHAO, H. et al. **Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation**. [s.l: s.n.].

ZININGA, T. et al. Plasmodium falciparum hop (PfHop) interacts with the Hsp70 chaperone in a nucleotide-dependent fashion and exhibits ligand selectivity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.