

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química de São Carlos

**Interação das Hsp70 e co-chaperonas  
humanas com lipossomas: uma abordagem  
biofísica**

Candidata: MSc. Amanda Lais de Souza Coto

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2023

Amanda Lais de Souza Coto

**Interação das Hsp70 e co-chaperonas humanas com lipossomas: uma abordagem biofísica**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2023

2

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

Assinatura: Amanda L. de Souza Coto  
Data: 19/07/2023

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Coto, Amanda Lais de Souza

Interação das Hsp70 e co-chaperonas humanas com lipossomas: uma abordagem biofísica / Amanda Lais de Souza Coto. — São Carlos, 2023.  
87 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Júlio César Borges

1. Chaperonas moleculares. 2. Hsp70. 3. Hep1. 4. DjC20. I. Título.

Sônia Alves - CRB: 4280/8



A Marcos Proença de Almeida (*in memoriam*) pela parceria e por toda a torcida e incentivo durante a minha trajetória acadêmica. Ainda que meus olhos não te vejam, muito de você segue vivo dentro de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, força criadora, e à espiritualidade pela oportunidade de ter vivido essa experiência e todo o grande amadurecimento que ela me proporcionou. Em uma fase tão difícil de pandemia e luto, ter saúde e condições para concluir esse trabalho foi um presente.

Ao Prof. Dr. Júlio Borges pelos ensinamentos, puxões de orelha, amizade, paciência e por confiar no meu trabalho. Obrigada pelos anos de orientação. Foi um prazer ser sua aluna e orientanda.

Aos meus pais, Luiz e Luzia, meu irmão Henri e minha cunhada Ana pela força e incentivo. Obrigada por todos os esforços desde o começo dessa jornada.

À Capes pela concessão da minha bolsa de doutorado, FAPESP e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

À Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI/IQSC) pela infraestrutura disponibilizada para os experimentos. Ao grupo da Dr. Ana Rita Nogueira na Embrapa Pecuária Sudeste por também disponibilizarem a infraestrutura necessária para a execução desse trabalho.

Ao Dr. Paulo Roberto, pelos ensinamentos e pela preciosa contribuição científica. Estendo esse agradecimento ao Prof. Dr. Antonio De Maio, pela colaboração e disponibilidade.

Aos amigos do LBBP: Samile, Silvinha, Sabrina, Thiago, Milene, Maju, Amanda e Arthur pelo convívio e pelas conversas. Agradeço especialmente a Noeli e ao Carlos, que foram meu sustento em muitos dias difíceis. Obrigada pela amizade e pela troca tão boa e verdadeira.

Aos amigos Alyne, Edu, Jessika, Natália, Wallace e Mari pela torcida, carinho e por sempre se preocuparem comigo.

A todos aqueles que não citei aqui, mas que contribuíram positivamente direta ou indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos.

*“A sós ninguém está sozinho  
É caminhando que se faz o caminho”.*

Enquanto houver sol, Titãs.

## RESUMO

As chaperonas moleculares são uma classe de proteínas que participam de diversos processos celulares. Nesse contexto, a família das Hsp70 destaca-se devido ao seu importante papel no funcionamento celular, visto que essas proteínas atuam como pivô, recebendo/distribuindo proteínas-clientes de/para outras chaperonas moleculares. As Hsp70 são encontradas em vários compartimentos subcelulares. Algumas de suas funções são auxiliar o enovelamento de proteínas nascentes, prevenir a agregação de proteínas e encaminhar proteínas para organelas ou para degradação. O mau funcionamento das Hsp70 está diretamente relacionado ao surgimento de doenças degenerativas, autoimunes e alguns tipos de câncer. As Hsp70 são encontradas associadas a membranas celulares; entretanto, o papel dessas proteínas nesse compartimento e o mecanismo envolvido no processo de inserção delas nas membranas lipídicas ainda precisam ser elucidados. Além das Hsp70, co-chaperonas também podem interagir com membranas lipídicas. Uma delas é a Hep1 humana, proteína encontrada majoritariamente na matriz mitocondrial e uma das co-chaperonas da HSPA9. A principal função da hHep1 é manter a HSPA9 em sua conformação nativa e garantir o correto funcionamento dessa proteína na mitocôndria. Entretanto, os aspectos que podem levar a hHep1 a se associar às membranas ainda não são conhecidos. Outra co-chaperona da HSPA9 é a DjC20, proteína que tem papel fundamental na biogênese de proteínas [FeS] na mitocôndria. Ela é responsável por estimular a atividade ATPásica da HSPA9. hHep1 e DjC20, além de parceiras da HSPA9, possuem em comum o motivo dedo de zinco, região fundamental para a estabilidade estrutural dessas proteínas e para a interação com a Hsp70. O potencial da DjC20 interagir com membranas lipídicas ainda não foi explorado. Sendo assim, este trabalho visou a caracterização estrutural e termodinâmica da interação das Hsp70 e co-chaperonas hHep1 e DjC20 com lipossomas negativamente carregados.

## ABSTRACT

Molecular chaperones are a class of proteins that participate in various cellular processes. In this context, the Hsp70 family stands out due to its important role in cellular function, as these proteins act as pivot points, receiving/delivering client proteins to/from other molecular chaperones. Hsp70 proteins are found in various subcellular compartments. Some of their functions include assisting in the folding of nascent proteins, preventing protein aggregation, and directing proteins to organelles or degradation pathways. Dysfunctions in Hsp70 are directly related to the development of degenerative diseases, autoimmune disorders, and certain types of cancer. Hsp70 proteins are found associated with cell membranes; however, their role in this compartment and the mechanism involved in their insertion into lipid membranes still need to be elucidated. Besides Hsp70, co-chaperones can also interact with lipid membranes. One of them is human Hep1, a protein found mainly in the mitochondrial matrix and one of the co-chaperones of HSPA9. The main function of hHep1 is to maintain HSPA9 in its native conformation and ensure proper functioning of this protein in the mitochondria. However, the aspects that lead hHep1 to associate with membranes are not yet known. Another co-chaperone of HSPA9 is DjC20, a protein that plays a key role in the biogenesis of [FeS] proteins in the mitochondria. It is responsible for stimulating the ATPase activity of HSPA9. hHep1 and DjC20, besides being partners of HSPA9, share a common zinc finger motif, a crucial region for the structural stability of these proteins and for interaction with Hsp70. The potential of DjC20 to interact with lipid membranes has not been explored. Therefore, this study aimed to characterize the structural and thermodynamic aspects of the interaction between Hsp70 and co-chaperones hHep1 and DjC20 with negatively charged liposomes.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As funções das Hsp70.....	19
Figura 2: Arranjo dos domínios DLN e DLP e conformações da Hsp70.....	21
Figura 3: Esquematização dos domínios das principais isoformas da Hsp70 em humanos.....	23
Figura 4: Representação esquemática das funções da Hep1 humana (hHep1)....	27
Figura 5: Esquema da estrutura da DjC20 humana.....	29
Figura 6: Espectros de CD para a interação da HSPA5 com lipossomas negativamente carregados.....	46
Figura 7: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre HSPA5 e lipossomas negativamente carregados.....	47
Figura 8: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da HSPA8 e HSPA1A com POPS.....	49
Figura 9: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre HSPA8 e lipossomas negativamente carregados.....	50
Figura 10: Resumo das características termodinâmicas das interações entre as Hsp70 e lipossomas carregados negativamente.....	51
Figura 11: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da hHep1 com lipossomas negativamente carregados.....	55
Figura 12: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre hHep1 e lipossomas negativamente carregados.....	56
Figura 13: A interação de hHep1 com a bicamada lipídica é superficial.....	58
Figura 14: Formação do complexo hHep1-HSPA9 e interação com lipossomas..	59
Figura 15: Aspectos estruturais da retirada do íon zinco da hHep1.....	60
Figura 16: Concentração de íons zinco na proteína recombinante hHep1 detectada por espectrometria de absorção atômica.....	61
Figura 17: Concentração de íons zinco na proteína recombinante DjC20.....	63
Figura 18: Efeito do íon zinco na estabilidade estrutural da hDjC20.....	64

Figura 19: O EDTA e a ureia causaram efeitos sinérgicos na exposição dos triptofanos da hDjC20 ao solvente.....	65
Figura 20: A interação de hDjC20 com lipossomas.....	66
Figura 21: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da hDjC20 com lipossomas de CL.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As chaperonas moleculares.....	18
Tabela 2: Os produtos gênicos da família Hsp70.....	20
Tabela 3: Alinhamento sequencial das quatro principais isoformas da família Hsp70.....	23
Tabela 4: Soluções-tampão.....	35
Tabela 5: Parâmetros de indução e expressão das proteínas recombinantes.....	36
Tabela 6: Características físico-químicas das proteínas recombinantes.....	37
Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSPA5 e lipossomas negativamente carregados.....	47
Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSPA8 e lipossomas negativamente carregados.....	50
Tabela 9: Parâmetros termodinâmicos da interação entre hHep1 e lipossomas negativamente carregados.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta G_{app}$ : energia livre de Gibbs aparente;

$\Delta H_{app}$ : entalpia aparente;

$\Delta S_{app}$ : entropia aparente;

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar;

$\lambda$ : comprimento de onda;

$\lambda_{m\acute{a}x}$ : comprimento de onda máximo;

$\langle \lambda \rangle$ : centro de massa espectral;

$\Theta$ : elipticidade em graus;

$[\Theta]$ : elipticidade molar residual;

Abs: absorvância;

AA: aminoácido;

ADP: adenosina difosfato;

ATP: adenosina trifosfato;

Bag1: do inglês *Bcl-2-associated athanogene 1*;

BiP: do inglês *Binding Immunoglobulin Protein*;

C: concentração molar;

CD: do inglês *Circular Dichroism*;

CHIP: do inglês *carboxy terminus of Hsc70 Interacting protein*;

CL: cardiolipina

$C_m$ : concentração de transição do ponto médio;

Da: dalton;

DjC20: do inglês *DnaJ homolog subfamily C member 20*;

DLN: domínio de ligação a nucleotídeos;

DLP: domínio de ligação a peptídeos;

DNA: do inglês *Deoxyribonucleic acid*;

EDTA: do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*;

E. coli: *Escherichia coli*;

Fi: intensidade de fluorescência;

Grp78: do inglês *Glucose-regulated protein 78 kDa*;

GrpE: do inglês *groP-like gene E*;

Hep1: do inglês *Hsp70-escort protein 1*;

Hip: do inglês *Hsp Interacting protein*;

His-tag: cauda de polihistidina;

HOP: do inglês *Hsp70-Hsp90 organizing protein*;

Hsc70: do inglês *heat shock cognate 71-kDa protein*;

HSP: do inglês *heat shock protein*;

HSPA: do inglês *heat shock protein family A*;

Hsp10: do inglês *heat shock protein 10-kDa*;

Hsp60: do inglês *heat shock protein 60-kDa*;

Hsp40: do inglês *heat shock protein 40-kDa*;

Hsp70: do inglês *heat shock protein 70-kDa*;

Hsp90: do inglês *heat shock protein 90-kDa*;

Hsp100: do inglês *heat shock protein 100-kDa*;

Hsp110: do inglês *heat shock protein 110-kDa*;

HspBP1: do inglês *Hsp70 Binding protein 1*;

IPTG: do inglês *isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*;

ITC: do inglês *Isothermal Titration calorimetry*;

K<sub>A</sub>: constante de associação;

K<sub>D</sub>: constante de dissociação;

kDa: quilodalton;

l: caminho óptico;

LB: do inglês *lysogeny broth*;

LDS-PAGE: do inglês *dodecyl sulfate lithium polyAcrylamide gel electrophoresis*;

MM: massa molecular;

M: molar;

n: número de resíduos de aminoácidos;

PDB: do inglês *protein data bank*;

pI: ponto isoelétrico;

POPS: do inglês *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho L-serine*;

RE: retículo endoplasmático;

rpm: rotação por minuto;

SDS-PAGE: do inglês *dodecyl sulfate sodium polyAcrylamide gel electrophoresis*;

sHsp: do inglês *small heat shock protein*;

SUP: sistema ubiquitina-proteassoma;

TPR: do inglês *tetratricopeptide repeat*;

Tris-HCl: tris-hidrocloreto;

Trp: triptofano

U: unidade;

UV: ultravioleta.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. As chaperonas moleculares .....	17
1.2. A família das Hsp70 .....	18
1.2.1. HSPA1A.....	24
1.2.2. HSPA8 .....	24
1.2.3. HSPA5 .....	25
1.2.4. HSPA9 .....	26
1.3. As co-chaperonas da HSPA9.....	27
1.3.1. Hep1 .....	27
1.3.2. DjC20 .....	28
1.4. A interação das Hsp70 com membranas lipídicas .....	30
1.5. Objetivos .....	33
2. DESENVOLVIMENTO .....	34
2.1. Materiais e métodos.....	34
2.1.1. Soluções-tampão .....	34
2.1.2. Expressão e purificação proteica .....	35
2.1.3. Características das proteínas recombinantes .....	37
2.1.4. Quantificação proteica .....	37
2.1.5. Produção dos lipossomas .....	37
2.1.6. Incorporação das proteínas nos lipossomas .....	38
2.1.7. Tratamento para remoção do íon zinco .....	38
2.1.8. Digestão com proteinase K .....	39

2.1.9. Caracterização biofísica: espectropolarimetria de dicroísmo circular.....	39
2.1.10. Espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano .....	40
2.1.11. Calorimetria de titulação isotérmica .....	41
2.2. Resultados e discussão .....	41
2.2.1. A interação da HSPA8 e HSPA5 com lipossomas .....	44
2.2.2. A interação da Hep1 humana com lipossomas .....	53
2.2.3. O motivo zinc finger da Hep1 humana .....	59
2.2.4. DjC20: outra co-chaperona da HSPA9 que possui o motivo zinc finger 62	
2.2.5. Interação da hDjC20 com lipossomas.....	65
3. CONCLUSÕES.....	67
4. LISTA DE PUBLICAÇÕES .....	68
5. REFERÊNCIAS .....	69



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. As chaperonas moleculares

As proteínas são consideradas macromoléculas biológicas complexas, versáteis, abundantes e essenciais para todos os organismos vivos. As funções biológicas desempenhadas pelas proteínas são variadas. Para a maioria dessas macromoléculas, a funcionalidade depende diretamente da estrutura tridimensional característica (estrutura nativa) adotada após o processo de enovelamento (BOZAYKUT; OZER; KARADEMIR, 2014; SMITH; LI; CHEETHAM, 2015; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). O enovelamento proteico ocorre em um ambiente rico em macromoléculas. Entretanto, quando esse ambiente encontra-se em condições desfavoráveis, tais como altas temperaturas, privação de nutrientes, hipóxia, variações de concentração iônica e presença de metais pesados o enovelamento pode não ocorrer corretamente, originando proteínas mal dobradas que podem formar agregados proteicos (BOZAYKUT; OZER; KARADEMIR, 2014; SMITH; LI; CHEETHAM, 2015; STRAVOPODIS; MARGARITIS; VOUTSINAS, 2007). Diversas doenças parecem estar relacionadas à formação de agregados proteicos, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, fibrose cística, diabetes e alguns tipos de câncer (ASHRAF; GREIG; KHAN; HASSAN *et al.*, 2014; CHAI; KOPPENHAFER; BONINI; PAULSON, 1999; FORGET; TREMBLAY; ROUCOU, 2013; GONG; YANG; ZHAO; PETERSEN *et al.*, 2015; SMITH; LI; CHEETHAM, 2015). Sendo assim, o controle de qualidade de proteínas (ou proteostase) desempenhado pela célula é essencial para regular os processos de síntese, enovelamento e degradação de proteínas (BOZAYKUT; OZER; KARADEMIR, 2014; SAIBIL, 2013; SMITH; LI; CHEETHAM, 2015; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

A proteostase é mediada por chaperonas moleculares, uma classe de proteínas que são ativas em muitos processos celulares envolvendo o enovelamento e a homeostase de proteínas (BATISTA; GAVA; PINHEIROS; RAMOS *et al.*, 2015; SAIBIL, 2013). As chaperonas são também conhecidas como proteínas de choque-térmico (Hsp, do inglês *heat shock proteins*) (WANG; VENABLE; LAPOINTE; HUTT *et al.*, 2006) por terem sua expressão aumentada em resposta ao estresse, especialmente em condições de estresse térmico. As

chaperonas moleculares são divididas em seis grandes famílias, de acordo com suas massas moleculares: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60/10, Hsp40 (ou *J proteins* - *JDP*) e smHsp (BORGES; RAMOS, 2005; BOZAYKUT; OZER; KARADEMIR, 2014; BRANDVOLD; MORIMOTO, 2015; SMITH; LI; CHEETHAM, 2015; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). Essas famílias não compartilham, entre elas, similaridade na sequência de aminoácidos ou no mecanismo de ação, contudo, todas ligam-se a uma ampla gama de proteínas não nativas com baixa especificidade, auxiliando-as em processos complexos e específicos, como o enovelamento proteico (SAIBIL, 2013). A Tabela 1 apresenta as principais famílias de chaperonas moleculares e descreve algumas de suas características.

**Tabela 1: As chaperonas moleculares.** Características como nome da família, massa molecular (MM), peculiaridades estruturais e funções biológicas foram resumidas a seguir.

Família	MM (kDa)	Características estruturais	Características funcionais
Hsp100	~ 100	Módulo AAA+ envolvido na ligação e hidrólise do ATP.	Solubiliza e reativa agregados proteicos, degrada proteínas mal enoveladas.
Hsp90	~ 90	Homodímeros com domínio N-terminal de ligação ao ATP e domínio C-terminal envolvido na dimerização e ligação às co-chaperonas.	Tem papel central na sinalização celular, regula a proteostase celular durante as condições fisiológicas normais e sob estresse.
Hsp70	~ 70	Domínio N-terminal de ligação a nucleotídeos e domínio C-terminal de ligação ao peptídeo/proteína-cliente.	Participa no enovelamento de proteínas nascentes, transporte através de membranas, regulação de respostas ao estresse e prevenção de agregação proteica.
Hsp60/10	~ 60 / ~10	Estrutura de anel heptamérico duplo.	Atua no enovelamento de proteínas e na montagem de complexos e importação de proteínas para mitocôndria em associação com outras chaperonas (como as Hsp70).
Hsp40 ( <i>J proteins</i> - <i>JDP</i> )	10-90	Presença do domínio J e domínio C-terminal capaz de interagir com proteínas-clientes.	Previne a agregação de proteínas; é co-chaperona da Hsp70.
smHsp	10-30	Domínio $\alpha$ -cristalino.	Previne a agregação de proteínas desenoveladas, participa da manutenção da fluidez membranar transdução de sinal celular.

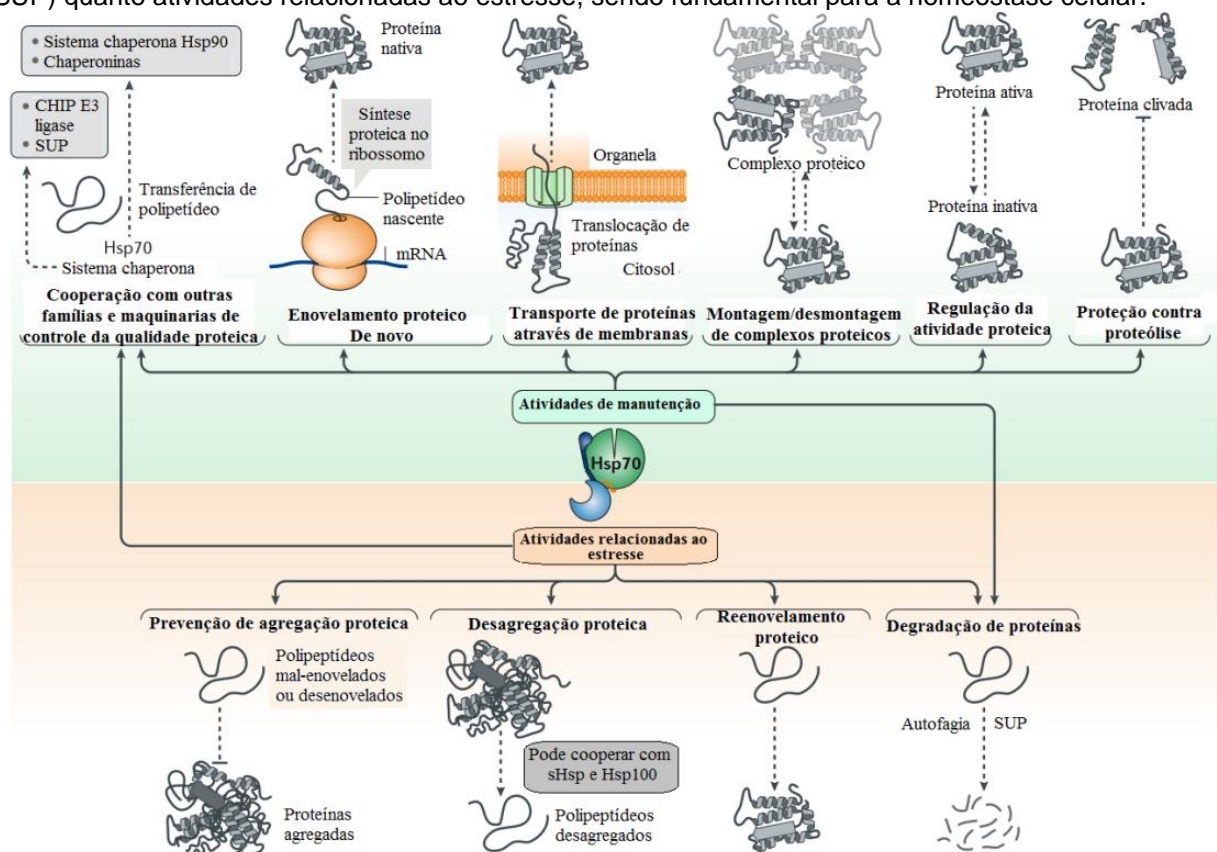
Fonte: adaptado de (BORGES; RAMOS, 2005; BRANDVOLD; MORIMOTO, 2015; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

## 1.2. A família das Hsp70

As Hsp70 são proteínas ubíquas altamente conservadas biologicamente (DA SILVA; BORGES, 2011). Dentre os diversos processos celulares nos quais as

Hsp70 estão envolvidas, pode-se citar o enovelamento de proteínas nascentes, a prevenção da agregação proteica, a recuperação de proteínas de agregados, o transporte de proteínas através de membranas, o encaminhamento de proteínas para a degradação, a exocitose e a estabilização de fatores de transcrição celular (DAHIYA; BUCHNER, 2019; HARTL; HAYER-HARTL, 2002; MAYER; BREHMER; GÄSSLER; BUKAU, 2001; SAIBIL, 2013; WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004). As múltiplas funções das Hsp70 devem-se, principalmente, à capacidade que essas chaperonas possuem de atuarem como pivô, recebendo/distribuindo proteínas-cliente desenoveladas ou parcialmente enoveladas de/para outras famílias de chaperonas ou outros destinos celulares (BATISTA; GAVA; PINHEIROS; RAMOS *et al.*, 2015; BORGES; RAMOS, 2005; DA SILVA; BORGES, 2011). Na Figura 1 foram esquematizadas as principais funções das Hsp70.

**Figura 1: As funções das Hsp70.** As Hsp70 desempenham tanto atividades de manutenção (que envolvem a proteção contra proteólise, regulação, transporte através de membranas, enovelamento, cooperação com outras famílias de chaperonas e degradação via sistema ubiquitina-proteassoma - SUP) quanto atividades relacionadas ao estresse, sendo fundamental para a homeostase celular.



Fonte: adaptada de (ROSENZWEIG; NILLEGODA; MAYER; BUKAU, 2019).

Uma característica comum das Hsp70 é a multiplicidade de isoformas observadas em eucariotos, tanto constitutivas como induzíveis. Isso indica que,

apesar do alto grau de conservação estrutural entre os membros dessa família, as Hsp70 diferem entre si pelo nível de expressão e localização subcelular (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; KAMPINGA; CRAIG, 2010; MEIMARIDOU; GOOLJAR; CHAPPLE, 2009), entre outras características. Em humanos, por exemplo, são observados 13 produtos gênicos da família Hsp70. Dentre eles, 7 produtos são encontrados majoritariamente no citoplasma/nucleoplasma, 2 na mitocôndria, 1 no retículo endoplasmático e outros 3 são endereçados extracelularmente (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). A Tabela 2 resume algumas características dos membros da família Hsp70.

**Tabela 2: Os produtos gênicos da família Hsp70.** Algumas características das isoformas da Hsp70 foram resumidas.

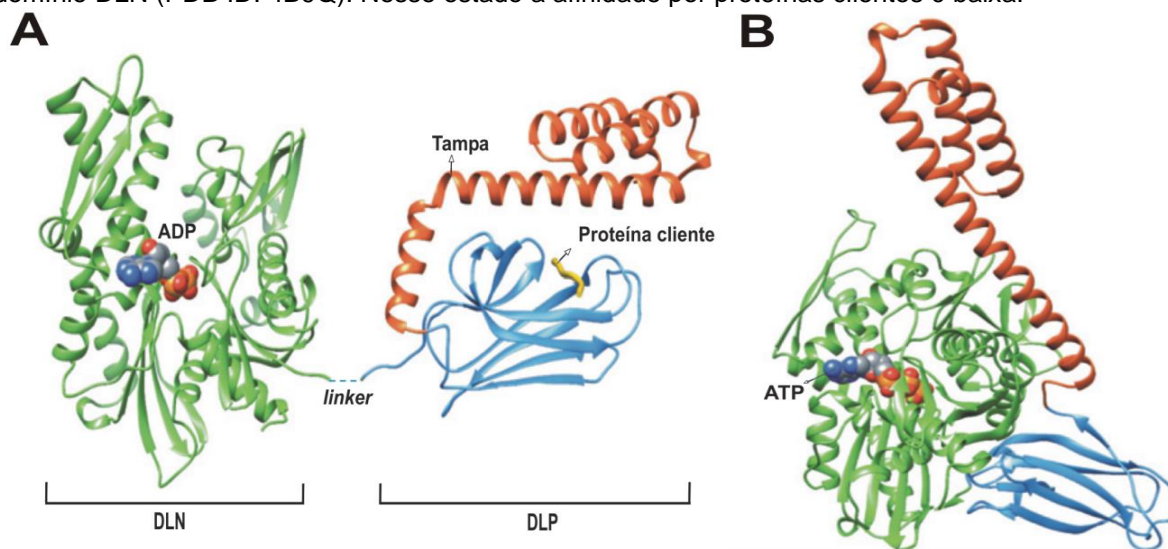
Proteína	Nomes alternativos	UniProtKB	Indução por estresse	Localização Subcelular
<b>HSPA1A</b>	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	P0DMV8	Sim	Citoplasma, nucleoplasma, membrana e exossomos extracelulares
<b>HSPA1B</b>	Hsp70-2, Hsp70-1B	P0DMV8	Sim	Citoplasma, nucleoplasma e exossomos extracelulares
<b>HSPA1L</b>	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	P34931	Não	Citoplasma e nucleoplasma
<b>HSPA2</b>	Heat shock 70kD protein 2, Hsp70.2	P54652	Não	Citoplasma, nucleoplasma, membrana e exossomos extracelulares
<b>HSPA5</b>	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	P11021	Não	Retículo endoplasmático, citoplasma, membrana, nucleoplasma, mitocôndria e exossomos extracelulares
<b>HSPA6</b>	Hsp70-6, Hsp70B'	P17066	Sim	Citoplasma e exossomos extracelulares
<b>HSPA7</b>	Hsp70-7, Hsp70B	P48741	Sim	Micropartículas do sangue e exossomos extracelulares
<b>HSPA8</b>	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	P11142	Não	Citoplasma, nucleoplasma membrana e exossomos extracelulares
<b>HSPA9</b>	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, mot-2, mtHsp70, mortalina	P38646	Não	Mitocôndria, retículo endoplasmático, citoplasma
<b>HSPA12A</b>	Hsp70-12A	O43301	Não	Intracelular e exossomos extracelulares
<b>HSPA12B</b>	Hsp70-12B	B7ZLP2	Não	Células endoteliais, intracelular e plasma sanguíneo
<b>HSPA13</b>	Hsp70-13	P48723	Não	Retículo endoplasmático, exossomos extracelulares e microsomos
<b>HSPA14</b>	Hsp70-14, Hsp70L1	Q0VDF9	Sim	Citoplasma e membrana

Fonte: adaptado de (RADONS, 2016; VOSTAKOLAEI; HATAMI-BAROOGH; BABAEI; MOLAVI *et al.*, 2021).

Estruturalmente, a maioria das Hsp70 apresenta-se na forma de monômeros em solução e podem ser divididas em dois domínios bem conservados conectados

por um *linker* hidrofóbico. O domínio de ligação de nucleotídeos adenosina (DLN) é responsável pela atividade ATPásica e o domínio de ligação de proteínas/peptídeos (DLP) é responsável pela interação com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de um peptídeo ou de uma proteína-cliente (Figura 2) (RÜDIGER; GERMEROOTH; SCHNEIDER-MERGENER; BUKAU, 1997; RÜDIGER; SCHNEIDER-MERGENER; BUKAU, 2001; ZHU; ZHAO; BURKHOLDER; GRAGEROV *et al.*, 1996).

**Figura 2: Arranjo dos domínios DLN e DLP e conformações da Hsp70.** **A)** Na conformação fechada a Hsp70 está ligada ao ADP. Seu domínio DLN (em verde, PDB ID: 3HSC) conecta-se ao domínio DLP (DLP $\beta$  em azul e DLP $\alpha$  em vermelho, PDB ID: 1DKZ) por meio de uma região flexível chamada *linker*. No DLP, uma longa estrutura em hélice- $\alpha$  (em vermelho) atua como uma tampa que se fecha sobre a proteína cliente. Nesse estado a afinidade por proteínas clientes é alta. **B)** Na conformação aberta a Hsp70 está ligada ao ATP. A tampa se abre e, junto com o DLP, apoia-se ao domínio DLN (PDB ID: 4B9Q). Nesse estado a afinidade por proteínas clientes é baixa.



Fonte: adaptado de (SAIBIL, 2013).

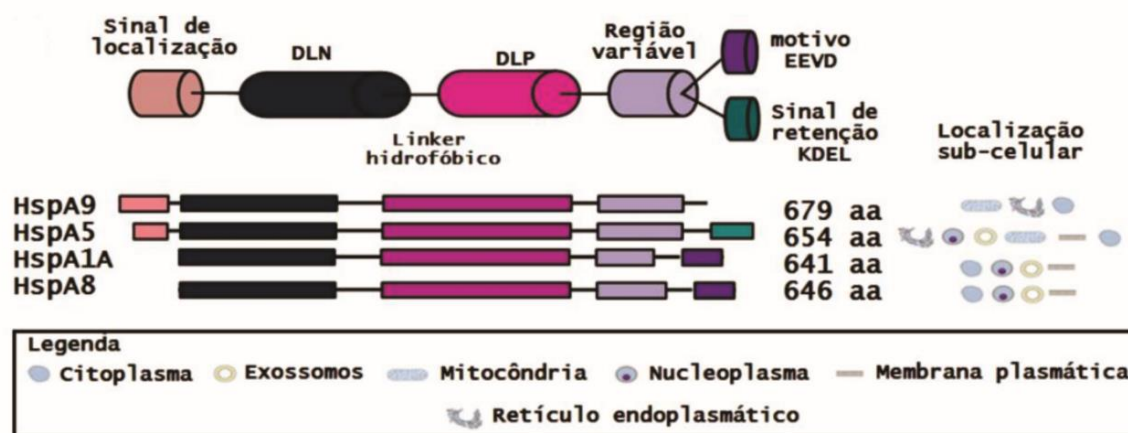
O DLN, domínio de maior identidade entre os membros da Hsp70, apresenta aproximadamente 45 kDa e possui uma fenda onde se encontra o sítio catalítico dos nucleotídeos de adenosina (ROSENZWEIG; NILLEGODA; MAYER; BUKAU, 2019). A região do *linker* é composta por uma sequência de aminoácidos altamente conservada (DLXLLDV, onde X pode ser valina ou leucina) que conecta os dois domínios e apresenta um aspecto mais flexível quando o DLN está ligado ao ADP (Figura 2A) e mais estruturado quando o DLN está ligado ao ATP (Figura 2B) (ENGLISH; SHERMAN; MENG; GIERASCH, 2017; RADONS, 2016). O DLP, domínio de menor identidade entre as proteínas Hsp70, apresenta aproximadamente 25 kDa e pode ser dividido em dois subdomínios: o DLP $\beta$  e o

DLP $\alpha$ . O DLP $\beta$  é formado por um sanduíche de folhas- $\beta$  antiparalelas opostas que constituem o sítio de ligação às proteínas-clientes. Já o DLP $\alpha$  é composto por cinco hélices- $\alpha$  que se fecham sobre as proteínas desenoveladas como uma tampa quando estas estão ligadas ao DLP $\beta$  (ENGLISH; SHERMAN; MENG; GIERASCH, 2017; RADONS, 2016; SAIBIL, 2013). A afinidade das Hsp70 pelas proteínas-clientes é regulada pela presença do nucleotídeo adenosina no DLN: quando o ADP está ligado ao DLN, a afinidade pela proteína-cliente é alta e quando o ATP está ligado ao DLN essa afinidade é baixa (BATISTA; GAVA; PINHEIROS; RAMOS *et al.*, 2015; DA SILVA; BORGES, 2011; SAIBIL, 2013).

Além dos nucleotídeos de adenosina, um número considerável de proteínas assessoras estão envolvidas na regulação das Hsp70. Essas proteínas são genericamente chamadas de co-chaperonas e elas são responsáveis por mediar a especificidade das Hsp70 por uma proteína-cliente, facilitar o enovelamento e a desagregação proteica e regular os ciclos funcionais individuais das chaperonas. A troca de ADP por ATP nas Hsp70, por exemplo, é estimulada por co-chaperonas também conhecidas como NEFs (fatores de troca de nucleotídeos, do inglês *nucleotide exchange factors*), tais como GrpE, Hsp110 e BAG (BORGES; RAMOS, 2005; DA SILVA; BORGES, 2011; KAMPINGA; CRAIG, 2010; MAYER; BUKAU, 2005). Já a HIP é uma co-chaperona que contribui para a estabilização do estado ADP-ligado da Hsp70, a CHIP auxilia na atuação da Hsp70 no sistema ubiquitina ligase, a HOP na interação da Hsp70 com a Hsp90 e a Tom70 na importação de pré-proteínas mitocondriais pelas Hsp70 (BATISTA; GAVA; PINHEIROS; RAMOS *et al.*, 2015; CAPLAN, 2003; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; PRATT; TOFT, 2003).

Dentre as isoformas da Hsp70 encontradas em humanos pode-se destacar quatro delas: HSPA5, HSPA8, HSPA9 e HSPA1A. Essas proteínas destacam-se não somente pela relevância que possuem em diferentes funções celulares, mas também pela quantidade de estudos realizados nas últimas décadas para elucidar seus mecanismos e funcionalidades. Como esperado, as isoformas da Hsp70 compartilham alta identidade sequencial entre si (Tabela 3) (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; GUPTA; SINGH, 1994; LINDQUIST; CRAIG, 1988). A Figura a seguir permite explorar melhor essa característica.

**Figura 3: Esquematisação dos domínios das principais isoformas da Hsp70 em humanos.** As estruturas primárias das proteínas HSPA5, HSPA8, HSPA9 e HSPA1A foram divididas em regiões coloridas de acordo com o esquema abaixo. O alinhamento das sequências de aminoácidos foi feito utilizando o *software* Clustal Ômega. A localização subcelular das proteínas pode ser interpretada pela legenda.



Fonte: adaptada de SILVA, Noeli Soares Melo da. Caracterização estrutural, funcional e estabilidade térmica das proteínas humanas HspA5 e HspA8: uma abordagem comparativa. 2021, 34 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

**Tabela 3: Alinhamento sequencial das quatro principais isoformas da família Hsp70.** Os valores de identidade em porcentagem foram obtidos pelo *software* Clustal Omega.

Comparação	Identidade (%)
HSPA9-HSPA5	50
HSPA9-HSPA1A	50
HSPA9-HSPA8	50
HSPA5-HSPA1A	64
HSPA5-HSPA8	65
HSPA1A-HSPA8	86

Fonte: autoria própria.

As regiões com maior grau de conservação entre as isoformas são o DLN e o *linker* hidrofóbico (BUKAU; WEISSMAN; HORWICH, 2006; DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). O DLP, por sua vez, não possui conservação tão elevada, o que pode estar diretamente relacionado às diferenças funcionais observadas entre essas proteínas. A HSPA1A e a HSPA8 possuem o motivo EEVD responsável pela interação com co-chaperonas que possuem o domínio TPR (COTO; SERAPHIM; BATISTA; DORES-SILVA *et al.*, 2018; DAUGAARD; ROHDE;

JÄÄTTELÄ, 2007; SCHEUFLER; BRINKER; BOURENKOV; PEGORARO *et al.*, 2000; SILVA; BERTOLINO-REIS; DORES-SILVA; ANNETA *et al.*, 2020). Já a HSPA5 possui o sinal de retenção KDEL que permite a secreção/retorno da proteína a partir do retículo endoplasmático ((DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; JIN; KOMITA; AOE, 2017). HSPA9 e HSPA5 possuem um sinal de localização, porém enquanto a HSPA9 é encontrada majoritariamente na matriz mitocondrial, a HSPA5 é encontrada majoritariamente no lúmen do retículo endoplasmático. As HSPA1A e HSPA8 compartilham as mesmas localizações subcelulares, sendo encontradas majoritariamente no citosol e no núcleo, respectivamente (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007).-Nos tópicos a seguir mais características sobre essas isoformas serão abordadas.

### **1.2.1. HSPA1A**

A HSPA1A é a principal Hsp70 induzível por estresse em humanos e camundongos. Em condições normais, a HSPA1A é expressa de maneira dependente do tipo de célula e do ciclo celular (MILARSKI; MORIMOTO, 1986; TAIRA; NARITA; IGUCHI-ARIGA; ARIGA, 1997). No estresse, a indução da HSPA1A é essencial para a homeostase e sobrevivência celular (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). Além de ser encontrada no citosol, a HSPA1A também é encontrada nas membranas plasmáticas de células sob estresse e cancerosas (BILOG; SMULDERS; OLIVERIO; LABANIEH *et al.*, 2019; DE MAIO, 2011; MULTHOFF; BOTZLER; WIESNET; MÜLLER *et al.*, 1995). Na membrana, a HSPA1A desempenha funções biológicas importantes, ativando o sistema imunológico, mediando a endocitose, facilitando a entrada viral e regulando a sobrevivência de células tumorais (ARISPE; DOH; SIMAKOVA; KURGANOV *et al.*, 2004; MULTHOFF; BOTZLER; WIESNET; MÜLLER *et al.*, 1995; NIMMERVOLL; CHTCHEGLOVA; JUHASZ; CREMADES *et al.*, 2015; ZHU; ZHAO; BURKHOLDER; GRAGEROV *et al.*, 1996).

### **1.2.2. HSPA8**

A HSPA8 é constitutivamente expressa e apresenta funções de manutenção celular, atuando principalmente no enovelamento e tráfego de proteínas



intermembranas (MAYER; BUKAU, 2005). Essa Hsp70 é também abundantemente encontrada no sistema nervoso de mamíferos, onde desempenha papel neuroprotetor (ANAGLI; ABOUNIT; STEMMER; HAN *et al.*, 2008; CHEN; BROWN, 2007; MURANYI; HE; FONG; LI, 2005). Nesse contexto, estudos mostraram a atuação da HSPA8 na prevenção de doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica (CASONI; BASSO; MASSIGNAN; GIANAZZA *et al.*, 2005; URUSHITANI; KURISU; TATENO; HATAKEYAMA *et al.*, 2004). Em células cancerosas a expressão da HSPA8 é aumentada e essa proteína é fundamental para a sobrevivência tumoral (KUBOTA; YAMAMOTO; ITOH; ABE *et al.*, 2010; ROHDE; DAUGAARD; JENSEN; HELIN *et al.*, 2005). Essas características fazem com que a HSPA8 seja um alvo terapêutico interessante, podendo ser utilizada como biomarcador tumoral (SANDOVAL; HOELZ; WOODRUFF; POWELL *et al.*, 2006) e também em imunoterapias (MIZUKAMI; KAJIWARA; ISHIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008).

### **1.2.3. HSPA5**

Dentre os membros da família Hsp70, a HSPA5 é a isoforma mais abundante (CASAS, 2017; SHAH; SINGH; DZIECIATKOWSKA; MALLELA, 2017). Além de participar diretamente da homeostase do  $Ca^{2+}$  na célula, (DE OLIVEIRA; PRIVIERO; TOSTES; WEBB *et al.*, 2021; KANIA; PAJAŃ; ORZECOWSKI, 2015; WANG; LEE; LIEM; PING, 2017) a HSPA5 atua no enovelamento de proteínas nascentes no lúmen do retículo endoplasmático (RADONS, 2016), apresenta função anti-apoptótica (LUO; LEE, 2013; RADONS, 2016; REDDY; MAO; BAUMEISTER; AUSTIN *et al.*, 2003), é um receptor de membrana celular que regula diferentes vias de sinalização (LUO; LEE, 2013; TSAI; HA; ZHAO; CARLOS *et al.*, 2018), participa ativamente da resposta ao estresse celular (BOOTH; ROBERTS; CASH; TAVALLAI *et al.*, 2015; DEDIEGO; NIETO-TORRES; JIMÉNEZ-GUARDEÑO; REGLA-NAVA *et al.*, 2011) e regula a resposta a proteínas não enoveladas (SUN; WEI; LI; CHANG *et al.*, 2006; TSAI; HA; ZHAO; CARLOS *et al.*, 2018). Dada a diversidade de atuações da HSPA5, essa proteína tem sido alvo de investigação em diferentes contextos, tais como cânceres (BAILLY; WARING, 2019; RAUSCHERT; BRÄNDLEIN; HOLZINGER; HENSEL *et al.*, 2008; TSENG; ZHANG; LEE, 2019; VOSTAKOLAEI; HATAMI-BAROOGH; BABAEI; MOLAVI *et*

*al.*, 2021; ZHANG; TSENG; TSAI; FU *et al.*, 2013), doenças cardiovasculares (WANG; LEE; LIEM; PING, 2017), neurodegenerativas (KAWAGUCHI; HAGIWARA; MIYATA; HODAI *et al.*, 2020; LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017; PARK; YOO; KIM, 2014), metabólicas (WANG; LEE; LIEM; PING, 2017), imunológicas (PARK; YOO; KIM, 2014; RAUSCHERT; BRÄNDLEIN; HOLZINGER; HENSEL *et al.*, 2008) e virais (BOOTH; ROBERTS; CASH; TAVALLAI *et al.*, 2015; ELFIKY; BAGHDADY; ALI; AHMED, 2020; GONZALEZ-GRONOW; SELIM; PAPALAS; PIZZO, 2009; IBRAHIM; ABDELMALEK; ELSHAHAT; ELFIKY, 2020; REID; SHURTLEFF; COSTANTINO; TRITSCH *et al.*, 2014).

#### **1.2.4. HSPA9**

A HSPA9 é constitutivamente expressa e está diretamente relacionada à senescência celular (WADHWA; KAUL; IKAWA; SUGIMOTO, 1993). Na matriz mitocondrial, a HSPA9 desempenha papel central no complexo PAM (do inglês *Presequence Translocase-Associated Motor*). O trânsito das proteínas mitocondriais requer primeiro a passagem pelo canal hidrofílico contido na membrana mitocondrial interna. É função da HSPA9 conduzir essa translocação e auxiliar o envelhecimento dessas proteínas (BOHNERT; PFANNER; VAN DER LAAN, 2007; REHLING; BRANDNER; PFANNER, 2004; VAN DER LAAN; HUTU; REHLING, 2010). O mau funcionamento da HSPA9 nesse processo (causado por envelhecimento incorretos ou auto agregação) está associado às falhas na biogênese mitocondrial, senescência celular e morte celular (WADHWA; KAUL; IKAWA; SUGIMOTO, 1993; WADHWA; KAUL; MITSUI; SUGIMOTO, 1993). Ainda na mitocôndria, a HSPA9 está envolvida no metabolismo de energia, na geração de radicais livres e proteostase (DEOCARIS; WIDODO; SHRESTHA; KAUR *et al.*, 2007; IOSEFSON; AZEM, 2010; LONDONO; OSORIO; GAMA; ALZATE, 2012; YANG; ZHOU; LIU; YANG *et al.*, 2011). Em outros compartimentos celulares a HSPA9 tem papel fundamental em processos que envolvem o controle da proliferação celular, o tráfego intracelular, o processamento de antígenos, a regulação da resposta celular sob condições de estresse e a inativação da proteína de supressão tumoral p53 (DOMANICO; DENAGEL; DAHLSEID; GREEN *et al.*, 1993; KAUL; DEOCARIS; WADHWA, 2007; MIZUKOSHI; SUZUKI; LOUPATOV;

URUNO *et al.*, 1999; SACTH; BRIGELIUS-FLOHÉ; KIESS; SZTAJER *et al.*, 1999). Por essas características a HSPA9 é alvo de estudos relacionados a doenças neurodegenerativas e cânceres (KAUL; DEOCARIS; WADHWA, 2007; LU; LEE; KAUL; LAN *et al.*, 2011; WADHWA; TAKANO; KAUR; DEOCARIS *et al.*, 2006).

### **1.3. As co-chaperonas da HSPA9**

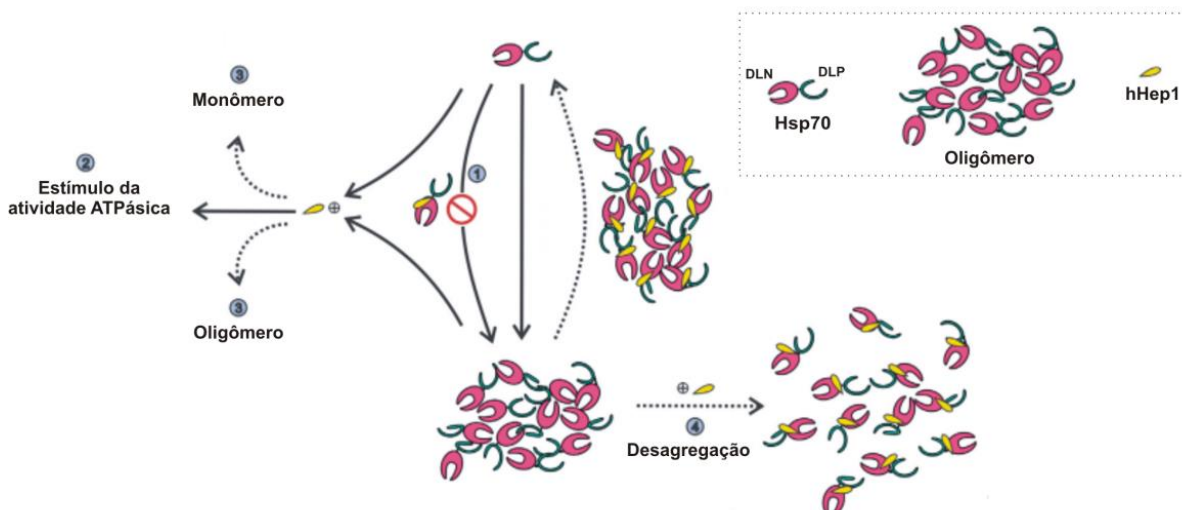
#### **1.3.1. Hep1**

Uma das co-chaperonas da HSPA9 é a Hep1 (do inglês *Hsp70-escort protein-1*). A Hep1 humana (hHep1) é uma pequena proteína que possui o motivo de ligação de zinco (ZFLR, do inglês *Zinc-Finger Like Region*, ou apenas *Zinc Finger*) (BURRI; VASCOTTO; FREDERSDORF; TIEDT *et al.*, 2004; DORES-SILVA; BELOTI; MINARI; SILVA *et al.*, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005; YAMAMOTO; MOMOSE; YATSUKAWA; OHSHIMA *et al.*, 2005). Estudos anteriores mostraram que o motivo de ligação de zinco é crítico para a função da Hep1 *in vivo* tanto em células de levedura quanto em células de humanos (VU; ZHAI; LEE; GUERRA *et al.*, 2012; YAMAMOTO; MOMOSE; YATSUKAWA; OHSHIMA *et al.*, 2005). A exclusão ou modificação do motivo de ligação de zinco da hHep1 leva a perda de atuação dessa co-chaperona sobre a HSPA9, sugerindo que essa região é essencial para a interação entre Hep1 e Hsp70 (VU; ZHAI; LEE; GUERRA *et al.*, 2012).

A Hep1 humana está presente na matriz mitocondrial e é responsável principalmente por prevenir a agregação da HSPA9 (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). Tal observação sugere que a Hep1 possui atividade chaperona intrínseca, podendo ser conhecida como “a chaperona da chaperona” (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021; GOSWAMI; CHITTOOR; D'SILVA, 2010; SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005). Além disso, a Hep1 é responsável por estimular a atividade ATPásica da HSPA9 (SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005; ZHAI; STANWORTH; LIU; SILBERG, 2008). *In vitro*, a co-expressão heteróloga da hHep1 e da HSPA9 permite a produção dessa última em quantidades adequadas para sua caracterização estrutural, mesmo em condições limitantes de concentração

proteica (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015). A Figura 4 mostra de forma sintetizada as funções da hHep1 descritas anteriormente.

**Figura 4: Representação esquemática das funções da Hep1 humana (hHep1).** Os monômeros de Hsp70 (1) são propensos a auto agregação e têm esse processo acelerado em condições adversas. A hHep1 pode se ligar tanto aos monômeros quanto aos oligômeros provocando o aumento da atividade ATPásica de ambas as espécies (2) e prevenindo a agregação (3). Uma vez que o oligômero é formado, a hHep1 pode também remodelá-los em partículas menores (4).

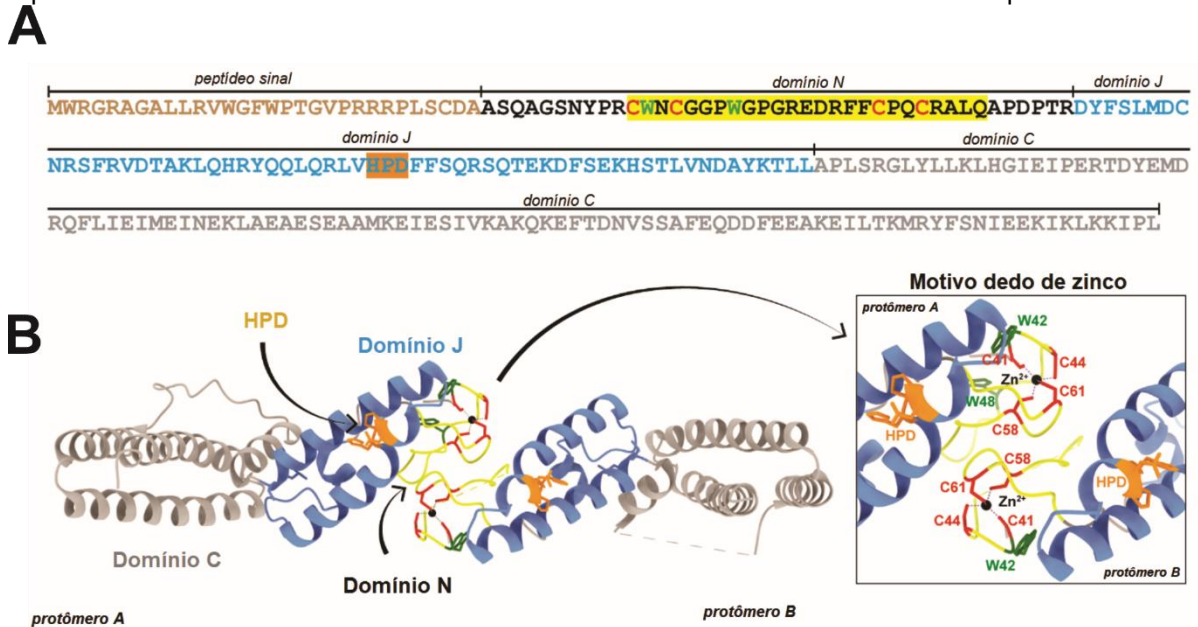


Fonte: adaptado de (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021).

### 1.3.2. DjC20

A DjC20 é uma JDP do tipo III que pode ser encontrada principalmente na matriz mitocondrial (PIETTE; ALERASOOL; LIN; LACOSTE *et al.*, 2021). Estruturalmente, a DjC20 é constituída por um peptídeo sinal na extremidade N-terminal seguido pelo chamado domínio N. Nesse domínio encontra-se um motivo dedo de zinco no qual 4 cisteínas coordenam um íon  $Zn^{+2}$  (Figura 5A, destacado em amarelo) (BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008). O Trp42, um resíduo conservado que faz parte do motivo dedo de zinco, e o Trp48 (Figura 5B) são fundamentais na estabilização do domínio N. Após o domínio N, a DjC20 possui o domínio J contendo um motivo HPD, região responsável por interagir e estimular a atividade ATPásica da HSPA9 (BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008). Um *linker* flexível conecta o domínio J ao domínio C (Figura 5B). O domínio C é formado por um conjunto de três hélices conhecido por interagir com a proteína de estrutura IscU em bactérias e leveduras (ANDREW; DUTKIEWICZ; KNIESZNER; CRAIG *et al.*, 2006; BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008; FÜZÉRY; TONELLI; TA; CORNILESCU *et al.*, 2008).

**Figura 5: Esquema da estrutura da DjC20 humana.** **A)** Sequência de aminoácidos da DjC20 exibindo a organização e as características dos domínios proteicos. O motivo de tetracisteína (semelhante a um dedo de zinco) está destacado em amarelo, e os resíduos de cisteína e triptofano estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente. O domínio J está marcado em azul e seu motivo HPD está destacado em laranja. A hDjC20 recombinante usada neste trabalho teve seu peptídeo sinal de direcionamento mitocondrial (marrom claro) removido. **B)** Estrutura cristalina de um dímero de hDjC20 (PDB: 3BVO). As cores seguem o mesmo padrão que em A. No lado direito, a região do motivo dedo de zinco do dímero de DjC20 é ampliada; os resíduos de cisteína e triptofano e o motivo HPD são indicados. Os íons  $Zn^{+2}$  são mostrados como esferas pretas.



Fonte: autoria própria.

Estudos de *knockout* com linhagens celulares cancerosas mostraram que a DjC20 é essencial para a proliferação celular em humanos (MEYERS; BRYAN; MCFARLAND; WEIR *et al.*, 2017; PIETTE; ALERASOOL; LIN; LACOSTE *et al.*, 2021). Tal observação deve-se ao papel fundamental que a DjC20 tem na mitocôndria. No processo de biogênese de proteínas [FeS] que ocorre nessa organela, a etapa final envolve a transferência de um grupo [FeS] de uma proteína doadora para uma proteína receptora. Esse processo é facilitado por um sistema chaperona especializado, que consiste em uma Hsp70 (HscA em bactérias, Ssq1 em leveduras ou HSPA9 em humanos) e uma JDP mitocondrial ubíqua (HscB em bactérias, Jac1 em leveduras, DjC20 em humanos) (BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008; KAMPINGA; CRAIG, 2010; VICKERY; CUPP-VICKERY, 2007). Em leveduras, os grupos [FeS] são montados em uma proteína de suporte (ylscU) e depois transferidos para proteínas receptoras (VICKERY; CUPP-VICKERY, 2007). O modelo de interação aceito propõe que a Jac1 auxilia na entrega da ylscU para a Ssq1, estimulando sua atividade ATPase enquanto a

Ssq1 se liga especificamente a um motivo conservado em yJscU. A maquinaria Ssq1/Jac1 facilita a entrega do grupo [FeS] para uma apoproteína receptora por meio da desestabilização do complexo yJscU-[FeS] (BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008; HOFF; SILBERG; VICKERY, 2000; KAMPINGA; CRAIG, 2010; SILBERG; TAPLEY; HOFF; VICKERY, 2004; VICKERY; CUPP-VICKERY, 2007). Em humanos (e outros eucariotos), a HSPA9 atua na biogênese de grupos [FeS]. Nesse caso, a especificidade do sistema é conduzida pela DjC20 ((KAMPINGA; CRAIG, 2010; SCHILKE; WILLIAMS; KNIESZNER; PUKSZTA *et al.*, 2006).

#### **1.4. A interação das Hsp70 com membranas lipídicas**

Como visto anteriormente, as Hsp70 podem ser encontradas em vários compartimentos subcelulares. Entretanto, foi apenas no início da década de 90 que estudos sugeriram que, além dos compartimentos citados, essas proteínas podem também se associar a membranas celulares (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021). Em 1992, Ferrarini e colaboradores detectaram a presença de Hsp70s na superfície de vários tipos de células tumorais humanas (FERRARINI; HELTAI; ZOCCHI; RUGARLI, 1992). No mesmo ano, Heufelder e colaboradores detectou a presença de Hsp70s na superfície de fibroblastos de pacientes acometidos pela oftalmopatia de Graves, uma doença autoimune (HEUFELDER; WENZEL; BAHN, 1992). Em 1994, Chouchane e colaboradores encontrou Hsp70s em células T infectadas pelo vírus HTLV-1 (responsável pela leucemia/linfoma de células T do adulto e pela mielopatia associada ao HTLV-1, doença neurológica semelhante à esclerose múltipla) (CHOUCHANE; BOWERS; SAWASDIKOSOL; SIMPSON *et al.*, 1994). Mais tarde, Asea e colaboradores apontou a importância de uma Hsp70 na sinalização celular e como biomarcador (ASEA; KRAEFT; KURT-JONES; STEVENSON *et al.*, 2000).

A partir dessas observações iniciais o interesse da comunidade científica em compreender o papel das Hsp70 em membranas celulares aumentou. Uma eficiente forma de mimetizar essa condição *in vitro* é estudar a interação dessas proteínas com bicamadas lipídicas artificiais: os lipossomas. Foi isso que foi feito no estudo de Arispe e De Maio, onde observou-se que a HSPA8 poderia formar canais iônicos estáveis e seletivos para cátions após a sua incorporação ao

lipossoma. A condutividade desse canal é dependente da atividade ATPásica da HSPA8: quando no estado ATP-ligado o canal é aberto e no estado ADP-ligado o canal é fechado (ARISPE; DE MAIO, 2000). Fica claro, portanto, que as Hsp70 não só se associam à superfície celular, como também podem ser encontradas embebidas/inseridas nas membranas celulares (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021).

Uma importante característica da interação das Hsp70 humanas com membranas é a alta seletividade dessas proteínas por fosfolipídios carregados negativamente, particularmente fosfatidilserina (ou PS, do inglês *phosphatidylserine*) (ARISPE; DOH; SIMAKOVA; KURGANOV *et al.*, 2004; ARMIJO; OKERBLOM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; LOPEZ; CAUVI; ARISPE; DE MAIO, 2016; MCCALLISTER; KDEISS; NIKOLAIDIS, 2016; SCHILLING; GEHRMANN; STEINEM; DE MAIO *et al.*, 2009). A Hsp70 bacteriana também tem a capacidade de interagir com membranas, porém essa alta seletividade não é observada. Logo, podemos inferir que a capacidade de interagir com membranas é uma característica ancestral das Hsp70, porém a seletividade por fosfolipídios carregados negativamente foi adquirida ao longo da evolução (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021). Outros fosfolipídios negativamente carregados mediam a interação das Hsp70 com membranas; são eles: POPG (do inglês *palmitoyl-oleoyl phosphatidylglycerol*) (ARMIJÓ; OKERBLOM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; MCCALLISTER; KDEISS; NIKOLAIDIS, 2016), BMP (do inglês *bis(monoacylglycerol)phosphate*) (KIRKEGAARD; ROTH; PETERSEN; MAHALKA *et al.*, 2010; MAHALKA; KIRKEGAARD; JUKOLA; JÄÄTTELÄ *et al.*, 2014) e cardiolipina (CL). O BMP é o principal constituinte dos lipossomas; a interação das Hsp70 com esse compartimento confere maior estabilidade a sua membrana, melhorando suas condições de armazenamento (BALOGI; MULTHOFF; JENSEN; LLOYD-EVANS *et al.*, 2019; KIRKEGAARD; ROTH; PETERSEN; MAHALKA *et al.*, 2010). Já a CL é um fosfolipídio encontrado principalmente nas membranas mitocondriais, em especial na membrana mitocondrial interna. De fato, a HSPA9 interage com lipossomas que mimetizam as membranas mitocondriais, mostrando maior seletividade por aqueles que são encontrados na membrana mitocondrial interna (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020).

A distribuição dos fosfolipídios na membrana plasmática é assimétrica; temos a cabeça de uma fosfatidilcolina (ou PC, do inglês *phosphatidylcholine*) exposta para o meio extracelular e PS ou fosfatidiletanolamina (ou PE, do inglês *phosphatidylethanolamine*) em contato com o citoplasma. As cabeças dos fosfolipídios dão origem a ambientes relativamente hidrossolúveis, enquanto as caudas formadas por ácidos graxos se arranjam de modo a ficarem concentradas no núcleo, originando um ambiente hidrofóbico (WIENER; WHITE, 1992). Em termos estatísticos, apenas uma pequena porção do conteúdo total de Hsp70 na célula pode ser encontrado junto às membranas; isso acontece pois somente Hsp70s não ligadas a proteínas-cliente podem realizar esse processo (DE MAIO, 2011; DE MAIO; HIGHTOWER, 2021).

Apesar de todas as Hsp70 terem maior seletividade por fosfolipídios negativamente carregados, o modo como cada uma delas é inserida na membrana lipídica não é idêntico— (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Os mecanismos de inserção das Hsp70 nos lipossomas são complexos, pouco estudados e representam um desafio, visto que essas proteínas não possuem domínios predominantemente hidrofóbicos que poderiam explicar sua inserção em membranas lipídicas (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021). Estudos sugerem que as Hsp70s interagem inicialmente com a cabeça de fosfolipídios carregados negativamente localizados na parte interna da membrana plasmática e em seguida sofrem mudanças conformacionais que facilitam a inserção na região hidrofóbica da membrana lipídica. Adicionalmente, as alterações de conformação provocam a oligomerização proteica após a inserção no lipossoma (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021; WIMLEY; HRISTOVA; LADOKHIN; SILVESTRO *et al.*, 1998). As Hsp70 são conhecidas por terem uma grande propensão a formar oligômeros em solução (APRILE; DHULESIA; STENGEL; ROODVELDT *et al.*, 2013; BENAROUDJ; TRINIOLLES; LADJIMI, 1996; GAO; EISENBERG; GREENE, 1996; GUIDON; HIGHTOWER, 1986; KIRALY; DORES-SILVA; SERRÃO; CAUVI *et al.*, 2020). Estudos sobre a interação de algumas Hsp70 com lipossomas mostraram que a formação de oligômeros são o resultado de ligações dissulfeto entre as extremidades N e C terminais de polipeptídeos adjacentes, dando origem a uma estrutura antiparalela de repetição (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY;



BORGES *et al.*, 2020). De um modo geral, a literatura recente nos revela informações interessantes sobre a inserção e a oligomerização das Hsp70 em membranas. Entretanto, o papel dessas proteínas nesse compartimento, bem como os mecanismos envolvidos nesses processos ainda precisam ser mais bem detalhados (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021).

O presente trabalho de doutorado visou dar continuidade aos estudos das interações entre Hsp70 humanas e lipossomas já em andamento no Grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (BBP) do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP). O Grupo BBP tem como objetivo caracterizar a estrutura e a função de Hsp70 e suas co-chaperonas de forma a avançar no seu entendimento em nível molecular, uma vez que as Hsp70 são proteínas essenciais para a viabilidade celular de vários organismos e a função desempenhada por essa família de chaperonas moleculares apresenta grande interesse biotecnológico e farmacêutico (DE MARCO; DEUERLING; MOGK; TOMOYASU *et al.*, 2007; ŻWIROWSKI; KŁOSOWSKA; OBUCHOWSKI; NILLEGODA *et al.*, 2017). Além disso, compreender a função das Hsp70 e co-chaperonas nas membranas celulares é de grande relevância para a compreensão e elucidação do papel dessas proteínas no desenvolvimento de doenças degenerativas, autoimunes e câncer (DE MAIO; HIGHTOWER, 2021; FLACHBARTOVÁ; KOVACECH, 2013; LU; LEE; KAUL; LAN *et al.*, 2011; WADHWA; TAKANO; KAUR; DEOCARIS *et al.*, 2006). Para tanto, o grupo BBP contou com a colaboração da equipe do Prof. Dr. Antônio de Maio, da Escola de Medicina da UC San Diego, Califórnia, EUA.

### **1.5. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi estudar estruturalmente a interação entre chaperonas moleculares e lipossomas negativamente carregados a fim de elucidar o mecanismo envolvido nesse processo. Foram objetivos específicos deste trabalho:

- Produzir os lipossomas negativamente carregados de CL (Cardiolipina) e de POPS (do inglês *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho L-serine*).

- Obter as proteínas recombinantes HSPA5, HSPA8, hHep1 e DjC20 com alto grau de pureza e em condições adequadas para a interação com os lipossomas.
- Avaliar o comportamento estrutural das chaperonas quando essas proteínas foram inseridas nos lipossomas a fim de obter informações sobre o mecanismo envolvido na interação.
- Avaliar os parâmetros termodinâmicos da interação entre as chaperonas e os lipossomas para obter informações sobre o mecanismo envolvido na interação.

## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. Materiais e métodos**

#### **2.1.1. Soluções-tampão**

Na Tabela 4 estão descritas as soluções-tampão que foram utilizadas nesse trabalho.

**Tabela 4: Soluções-tampão.** Descrição da composição, pH e finalidade das soluções-tampão utilizadas nos procedimentos experimentais descritos.

Solução-tampão	Composição	pH	Finalidade
A	50 mM Tris-HCl + 100 mM KCl	8,0	Lise bacteriana
B	20 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 20 mM Imidazol	7,5	Etapa de lavagem na cromatografia de afinidade ao níquel
C	20 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 500 mM Imidazol	7,5	Etapa de eluição das proteínas na cromatografia de afinidade ao níquel
D	25 mM Tris-HCl + 50 mM NaCl + 5 mM KCl + 2 mM $\beta$ -mercaptoetanol	7,5	Etapa de eluição das proteínas na cromatografia de exclusão molecular preparativa
E	50 mM Tris-HCl	7,5	Preparação dos lipossomas e ensaios de interação das proteínas com lipossomas

Fonte: autoria própria.

### 2.1.2. Expressão e purificação proteica

Os vetores plasmidiais contendo os DNA codantes para as proteínas humanas HspA5 (pET28a::HspA5), HspA8 (pET28a::HspA8) e DjC20 (pET28a::DjC20) foram obtidos comercialmente pela *Epoch Life Science Inc.* (Missouri City, Texas, USA). As construções correspondentes à HspA5 e à DjC20 não apresentam a sequência de aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal. O vetor plasmidial contendo o DNA codante para a hHep1 foi obtido como previamente descrito em (DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013) e também não possui a sequência de aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal para encaminhamento para a mitocôndria. Todas as construções proteicas foram feitas de modo a permitir a expressão de um peptídeo de fusão de poli-histidina localizado na extremidade N-terminal para posterior purificação por cromatografia de afinidade ao níquel.

Os vetores foram inseridos em cepas bacterianas competentes *E. coli* BL21(DE3) por transformação. As células bacterianas transformadas foram pré-inoculadas em 25 mL de meio *lysogenic broth* (LB) na presença de canamicina/ampicilina à 37 °C por aproximadamente 16 horas sob agitação a 200 rpm. O pré-inóculo resultante foi então diluído 20 vezes em 500 mL de meio LB contendo antibiótico e o cultivo celular ocorreu a 37 °C e 200 rpm até atingir uma  $DO_{600nm} \sim 0,6$ . A temperatura foi então reduzida para 30 °C e IPTG foi adicionado à cultura bacteriana para a expressão das proteínas. Após 4 horas de indução, as células foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C e posteriormente

colhidas e armazenadas a -20 °C. Os parâmetros utilizados para a indução e expressão das proteínas recombinantes estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5: Parâmetros de indução e expressão das proteínas recombinantes.** Descrição de algumas características de indução e expressão das proteínas HspA5, HspA8, hHep1 e DjC20.

Proteína	Vetor de expressão	Antibiótico	IPTG (mM)	Temperatura de indução (°C)	Tempo de indução (hs)
HSPA5	pET28a	Canamicina	0,4	30	4
HSPA8	pET28a	Canamicina	0,4	30	4
hHep1	pQE2	Ampicilina	0,4	30	4
DjC20	pET28a	Canamicina	0,2	30	4

Fonte: autoria própria.

As células bacterianas colhidas por centrifugação foram ressuspensas em tampão de lise (A) (40 mL de solução-tampão por litro de indução bacteriana). Em seguida, foram adicionadas 5 U de DNase e 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de lisozima e a incubação ocorreu durante 30 minutos em gelo. Após esse período, as células foram lisadas por sonicação e submetidas à centrifugação a 18000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas hidrofílicas PVDF com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser submetido à purificação.

A purificação das proteínas foi feita adotando dois passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel e cromatografia de exclusão molecular preparativa. Para o primeiro passo cromatográfico, o lisado celular filtrado foi aplicado em uma coluna *HisTrap* (GE Healthcare Lifesciences) devidamente carregada com íons  $\text{Ni}^{+2}$  e previamente equilibrada com tampão B. As proteínas foram eluídas na presença de tampão C. Após essa etapa a DjC20 foi a única proteína que teve sua His-tag clivada. Para tanto foram adicionados 1 U de trombina para cada 5-10 mg de proteína. A clivagem foi feita *overnight* em diálise exaustiva em tampão D. Por fim, as proteínas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular preparativa em coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Lifesciences) acoplada ao *ÄKTA Prime plus device* previamente equilibrada com tampão D. A eficiência dos protocolos de purificação das proteínas foi confirmada por eletroforese SDS-PAGE.

### 2.1.3. Características das proteínas recombinantes

Algumas características físico-químicas das proteínas estudadas foram resumidas na Tabela 6. Os valores apresentados foram obtidos pelos *softwares* Sednterp (disponível em: <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>) e ProtParam (disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>).

**Tabela 6: Características físico-químicas das proteínas recombinantes.** Descrição das proteínas HspA5, HspA8, hHep1 e DjC20 quanto aos parâmetros: números de resíduos de aminoácidos totais, massa molecular (MM) e coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ).

Nome	Nomes alternativos	UniprotKB	Resíduos de aminoácidos	MM (kDa)	$\epsilon_{280\text{nm}}$ Pace ( $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )
HSPA5 <sup>a,d</sup>	Grp78, BIP	P11021	631	69,8	30500
HSPA8 <sup>d</sup>	Hsc70	P11142	646	70,9	33600
hHep1 <sup>a,b</sup>	mtHsp70-escort protein, DNL-type zinc finger protein,	Q5SXM8	129	13,5	9970
DjC20 <sup>a,b,c</sup>	HscB, Hsc20, DNAJ20	Q8IWL3	206	24,5	21430

<sup>a</sup> sequências proteicas sem peptídeo sinal.

<sup>b</sup> valores obtidos pelo *software* ProtParam.

<sup>c</sup> sequência proteica sem considerar His-tag.

<sup>d</sup> valores obtidos pelo *software* Sednterp.

Fonte: autoria própria.

### 2.1.4. Quantificação proteica

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

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

onde  $C$  é a concentração molar (M),  $Abs$  é a absorvância em 280 nm (adimensional),  $l$  é o caminho óptico (cm) e  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar de Pace em 280 nm ( $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (Tabela 6).

### 2.1.5. Produção dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados conforme descrito em (LOPEZ; CAUVI; ARISPE; DE MAIO, 2016). Resumidamente, 40 mg de Cardiolipina ou POPS (ambos da Avanti Polar Lipids) foram dissolvidos em clorofórmio ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Após secagem com gás nitrogênio, os lipossomas foram ressuspensos em 1000  $\mu\text{L}$  de tampão E e vortexados por 30 segundos a cada 5 minutos. Esse último processo

foi repetido 6 vezes. Por fim, os lipossomas foram extrudados utilizando uma membrana de 100 nm (foram feitas 15 passagens pela membrana). A montagem do extrusor foi feita como visto no vídeo disponível na plataforma YouTube (<https://www.youtube.com/watch?v=8ei62ZmLgSM>).

#### **2.1.6. Incorporação das proteínas nos lipossomas**

Para os ensaios de incorporação, 400 µg de lipossomas de POPS ou CL foram incubados com as proteínas puras em tampão E por 30 minutos a 25 °C sob agitação contínua. Essa mistura foi posteriormente centrifugada a 100.000 x g por 1 hora a 4 °C. O pellet foi então ressuspenso em 300 µL de tampão contendo 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,5) e centrifugado novamente a 100.000 x g por 1 hora a 4 °C. Por fim, o pellet foi solubilizado em tampão E contendo 10 mM de β-mercaptoetanol e as proteínas foram resolvidas por eletroforese LDS-PAGE e visualizadas pela coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O software GelQuant (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>) foi utilizado para estimar a intensidade das bandas no gel e a porcentagem da proteína alvo incorporada aos lipossomas.

#### **2.1.7. Tratamento para remoção do íon zinco**

Para a remoção do metal, as co-chaperonas hHep1 e DjC20 puras foram dialisadas por 8 horas contra tampão D contendo 200 mM EDTA. Após esse período, foram feitas duas diálises de 4 horas com 500 mL de tampão E e uma última diálise de 8 horas com 1 L do mesmo tampão para garantir que todo o agente quelante foi retirado. Alíquotas de proteína tratada com EDTA e proteína não tratada com EDTA foram digeridas com ácido nítrico a 10% v/v durante 2 dias em temperatura ambiente. O zinco foi quantificado nessas alíquotas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) para a hHep1 e espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) para a DjC20. Para as medidas de FAAS foi utilizado um espectrômetro PINAACLE 900T (Perkin Elmer) e a concentração de zinco foi determinada indiretamente com o auxílio da curva de calibração. Já para as medidas da DjC20 foi utilizado um ICP-OES 5110 (Agilent) com um sistema de introdução de amostra composto por uma câmara de spray ciclônico de dupla passagem e um nebulizador Flow-blurring OneNeb® 2. As

medidas foram realizadas utilizando o modo de visualização dupla vertical síncrona (SVDV) e o comprimento de onda de emissão foi de 213,857 nm.

### **2.1.8. Digestão com proteinase K**

A hHep1 incorporada aos lipossomas de POPS ou CL foi incubada com proteinase K ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 1 hora a  $25^\circ\text{C}$  em tampão E. Em seguida, a mistura hHep1-lipossoma-proteinase K foi centrifugada a  $100.000 \times g$  por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . Os pellets resultantes foram ressuspensos em tampão E na presença de 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, resolvidos por LDS-PAGE e revelados usando coloração *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

### **2.1.9. Caracterização biofísica: espectropolarimetria de dicroísmo circular**

Os ensaios de dicroísmo circular foram feitos em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, INC). As medidas das proteínas na presença e ausência de lipossomas de POPS e CL em tampão E foram tomadas com taxa de aquisição de  $100 \text{ nm.min}^{-1}$  e largura da banda de 1 nm utilizando cubeta circular de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. As concentrações de proteína utilizadas variaram entre 2-10  $\mu\text{M}$  e foram utilizados 1 mM de lipossoma. Foram tomadas 40 acumulações em cada condição estudada. Os espectros resultantes foram normalizados para elipticidade residual molar ( $[\theta]$ , em  $\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ) de acordo com a equação:

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

onde  $\theta$  é o sinal de dicroísmo circular (graus),  $MM$  é a massa molecular proteica (kDa),  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos da proteína alvo,  $l$  é o caminho óptico (cm) e  $C$  é a concentração proteica ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ).

Nos ensaios onde a estabilidade da DjC20 foi investigada, a ureia foi utilizada como agente desnaturante. Nesse caso, a DjC20 (concentração final de 5  $\mu\text{M}$ ) em tampão D, na presença e na ausência de 5 mM EDTA, foi incubada com concentrações crescentes de ureia durante 60-120 minutos. A solução de ureia foi preparada no mesmo tampão da proteína e sua concentração foi determinada por refratometria de acordo com a equação abaixo (WARREN; GORDON, 1966):

$$[\text{ureia}] = (117,66 * \Delta N) + (29,573 * (\Delta N)^2) + (185,56 * (\Delta N)^3) \quad (3)$$

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

#### **2.1.10. Espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano**

O comportamento da estrutura terciária local das proteínas na presença e ausência de lipossomas de Cardiolipina e POPS foi monitorado pela emissão de fluorescência intrínseca do triptofano. As medidas foram tomadas em um fluorímetro F-4500 (Hitachi) utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As concentrações de proteína variaram entre 2-10  $\mu$ M e foram utilizados 1 mM de lipossoma. As amostras foram excitadas em comprimento de onda de 295 nm e os espectros de emissão foram coletados entre 310 e 420 nm. Os resultados obtidos foram analisados em relação ao comprimento máximo de emissão ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) e pelo valor de centro de massa espectral ( $\langle \lambda \rangle$ ):

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (4)$$

onde  $F_i$  são as intensidades de fluorescência e  $\lambda_i$  os respectivos comprimentos de onda.

Nos ensaios onde a estabilidade da DjC20 foi investigada, a proteína (na concentração final de 5  $\mu$ M) em tampão D, na presença e ausência de 5 mM EDTA, foi incubada com concentrações crescentes de ureia durante 60-120 minutos. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados obtidos foram interpretados em relação aos valores de  $\langle \lambda \rangle$  (Equação 4). Os ajustes dos dados foram feitos pelo *software* Origin 8.0 com a função bi dose-resposta (Boltzmann). A partir destes ajustes foi determinado o valor de  $C_m$ , isto é, o ponto de inflexão da curva sigmoidal graficada. Por fim, os experimentos de *quenching* foram realizados conforme descrito anteriormente em (BORGES; SERAPHIM; MOKRY; ALMEIDA *et al.*,



2012). Resumidamente, 5  $\mu\text{M}$  de DjC20 foram incubados com concentrações crescentes de acrilamida e as medidas foram registradas a 20  $^{\circ}\text{C}$ . As constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para a DjC20 na presença e ausência de 5 mM de EDTA e 4 M de ureia foram calculadas utilizando a equação de Stern-Volmer para processos de *quenching* colisional:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (5)$$

onde  $F$  e  $F_0$  são, respectivamente, as intensidades de emissão de fluorescência do triptofano máximas na presença e ausência do *quencher*,  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer; e  $[Q]$  é a concentração do *quencher*, a acrilamida, em M.

### 2.1.11. Calorimetria de titulação isotérmica

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram feitos em um microcalorímetro iTC200 (GE Healthcare Life Sciences). Em resumo, dezessete alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  de POPS ou CL (3 mM) foram tituladas em aproximadamente 203,8  $\mu\text{L}$  de proteína (em concentrações que variaram de 10-15  $\mu\text{M}$ ) a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Na análise dos dados, o calor da interação foi determinado a partir da integração das áreas dos picos gerados a cada injeção, as quais são proporcionais ao volume da célula, concentração de ligante e variação de entalpia ( $\Delta H$ ). Os valores de  $\Delta H_{app}$ ,  $n$  (coeficiente estequiométrico) e  $K_A$  foram estimados a partir do ajuste dos dados realizado no *software* Origin 7.0. Os demais parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G_{app}$  e  $\Delta S_{app}$ ) foram obtidos pela relação:

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

onde  $\Delta G_{app}$  é a variação da energia de Gibbs aparente,  $R$  é a constante dos gases em  $\text{cal.K}^{-1}.\text{M}^{-1}$ ,  $T$  é a temperatura absoluta em K,  $K_A$  é a constante de associação em  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta H_{app}$  é a variação da entalpia aparente e  $\Delta S_{app}$  é a variação da entropia aparente. Por fim, a constante de dissociação ( $K_D$ , em  $\mu\text{M}$ ) foi obtida como o inverso de  $K_A$ . Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos a partir de, pelo menos, duas titulações.

## 2.2. Resultados e discussão

É sabido que algumas Hsp70 estão presentes no meio extracelular, onde exibem uma importante função de sinalização (DE MAIO, 2011; 2014; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como essas proteínas são ativamente exportadas para o meio extracelular; alguns deles são translocação através da membrana plasmática (via lisossomo-endossomo), liberação associada a exossomos ou mesmo pela liberação passiva após a morte celular (DE MAIO, 2014; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; MAMBULA; CALDERWOOD, 2006; SCHMITT; GEHRMANN; BRUNET; MULTHOFF *et al.*, 2007; VEGA; RODRÍGUEZ-SILVA; FREY; GEHRMANN *et al.*, 2008). O principal obstáculo para a exportação ativa das Hsp70 para o ambiente extracelular é a passagem pelo ambiente hidrofóbico formado pela membrana plasmática, o que é considerado termodinamicamente desfavorável. No entanto, é possível encontrar várias evidências experimentais de que as Hsp70 interagem com membranas lipídicas (BALOGI; MULTHOFF; JENSEN; LLOYD-EVANS *et al.*, 2019; DE MAIO; HIGHTOWER, 2021; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; LATHANGUE, 1984; VELAZQUEZ; DIDOMENICO; LINDQUIST, 1980; VELAZQUEZ; LINDQUIST, 1984; WELCH; SUHAN, 1986).

Estudos mostram que a HSPA1A pode ser encontrada associada à membrana plasmática (MULTHOFF; BOTZLER; WIESNET; MÜLLER *et al.*, 1995; VEGA; RODRÍGUEZ-SILVA; FREY; GEHRMANN *et al.*, 2008). Além disso, essa Hsp70 apresentou seletividade por fosfolipídios negativamente carregados e glicolipídios (ARISPE; DOH; SIMAKOVA; KURGANOV *et al.*, 2004; ARMIJO; OKERBLUM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; GEHRMANN; LIEBISCH; SCHMITZ; ANDERSON *et al.*, 2008; KIRKEGAARD; ROTH; PETERSEN; MAHALKA *et al.*, 2010; MAMBULA; CALDERWOOD, 2006; SCHILLING; GEHRMANN; STEINEM; DE MAIO *et al.*, 2009) e tem a capacidade de se inserir espontaneamente em bicamadas lipídicas também com grande seletividade dando origem a canais de condutância iônica cuja atividade é regulada por nucleotídeos (ARISPE; DE MAIO, 2000; ARISPE; DOH; SIMAKOVA; KURGANOV *et al.*, 2004; ARMIJO; OKERBLUM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; MACAZO; WHITE, 2014; VEGA; RODRÍGUEZ-SILVA; FREY; GEHRMANN *et al.*, 2008). Nesse contexto, observou-se também que a HSPA1A forma complexos diméricos ou multioligoméricos

antiparalelos ao se inserir na membrana lipídica (ARMIJO; OKERBLOM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; LOPEZ; CAUVI; ARISPE; DE MAIO, 2016), o que é um requisito fundamental para a formação de canais iônicos.

A HSPA9 também possui seletividade por fosfolipídios negativamente carregados. No entanto, percebe-se que a HSPA9 possui maior afinidade pela cardiolipina do que a HSPA1A (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). A cardiolipina é encontrada principalmente em membranas mitocondriais e bacterianas, constituindo aproximadamente 18% da membrana mitocondrial interna (ZINSER; SPERKA-GOTTLIEB; FASCH; KOHLWEIN *et al.*, 1991). De fato, a HSPA9 se insere de forma muito eficiente em uma mistura de lipídios que se assemelha à composição lipídica da membrana mitocondrial interna. No entanto, a HSPA9 apresentou afinidade reduzida por uma mistura de lipídios que mimetiza a membrana mitocondrial externa (que contém cardiolipina em quantidades bem menores, menos de 1% da constituição total). Essa observação sugere que a HSPA9, que está principalmente localizada na matriz mitocondrial, seja capaz de interagir com a membrana interna dessa organela, possivelmente facilitando o transporte de proteínas através dessa barreira via complexo TIM (DEMISHTEIN; FRAIBERG; BERKO; TIROSH *et al.*, 2017; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; LONDONO; OSORIO; GAMA; ALZATE, 2012; SOKOL; SZTOLSZTENER; WASILEWSKI; HEINZ *et al.*, 2014).

Embora as estruturas secundárias da HSPA1A e da HSPA9 não sejam afetadas pela inserção dessas proteínas na bicamada lipídica, experimentos de calorimetria e de suscetibilidade à digestão com proteinase K sugerem que o mecanismo de inserção da HSPA9 nas membranas é diferente daquele adotado pela HSPA1A (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Como citado anteriormente, a HSPA1A forma complexos oligoméricos antiparalelos dentro da membrana lipídica, o que leva suas extremidades N e C terminais a ficarem expostas na superfície dos lipossomas. No entanto, as extremidades N e C terminais da HSPA9 mostram-se bem menos expostas do que as da HSPA1A quando a proteína está inserida nos lipossomas (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Além disso, as interações da HSPA1A e da HSPA9 com lipossomas de POPS foram ambas exotérmicas. No entanto, a interação da HSPA9

com lipossomas de CL foi endotérmica, enquanto a interação da HSPA1A com lipossomas de CL foi exotérmica. Tais características revelam que as inserções dessas proteínas nas membranas, além de diferentes, são constituídas de várias etapas complexas que podem estar relacionadas à natureza heterogênea da bicamada lipídica. A inserção pode, por exemplo, iniciar pela interação da proteína com as cabeças polares dos fosfolipídios e em seguida, após mudanças conformacionais, a acomodação das proteínas na bicamada é facilitada (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; WHITE; WIMLEY, 1998; WIENER; WHITE, 1992; WIMLEY; HRISTOVA; LADOKHIN; SILVESTRO *et al.*, 1998). Por fim, levando em consideração estudos sobre outras proteínas que interagem espontaneamente com membranas lipídicas (MIRZABEKOV; LIN; KAGAN, 1996; ROJAS; ARISPE; HAIGLER; BURNS *et al.*, 1992; SHATURSKY; HEUCK; SHEPARD; ROSSJOHN *et al.*, 1999; SHEPARD; SHATURSKY; JOHNSON; TWETEN, 2000), podemos inferir que as folhas- $\beta$  do DLP da HSPA9 e da HSPA1A parecem desempenhar um papel fundamental na inserção dessas proteínas na membrana (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Isto posto, os resultados obtidos para as interações das isoformas HSPA8 e HSPA5 com lipossomas de POPS e CL serão apresentados a seguir.

### **2.2.1. A interação da HSPA8 e HSPA5 com lipossomas**

Assim como a HSPA1A, a HSPA8 também apresenta seletividade por fosfolipídios negativamente carregados e dá origem a canais iônicos na bicamada lipídica (ARISPE; DE MAIO, 2000; ARMIJO; OKERBLOM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; VEGA; RODRÍGUEZ-SILVA; FREY; GEHRMANN *et al.*, 2008). Esses canais apresentam condutância regulada por nucleotídeos, onde o ATP promove a abertura do canal, enquanto o ADP os fecha, sugerindo que mudanças conformacionais podem regular a via iônica (ARISPE; DE MAIO, 2000). Além disso, a HSPA8 foi detectada na superfície de células ductais do fígado fetal de rato, células progenitoras hepáticas, colangiocitócitos maduros e carcinoma hepatocelular (MILLS; HASKELL; CALLANAN; FLANAGAN *et al.*, 2010).

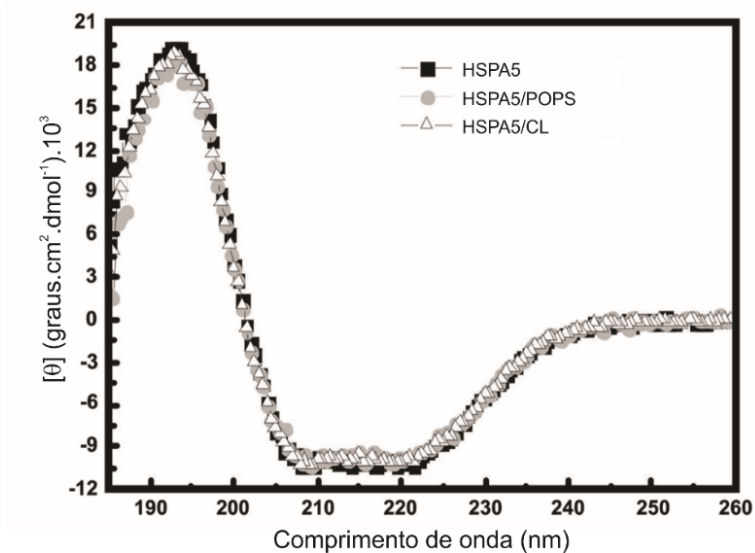
A HSPA5, assim como as outras isoformas, também pode ser encontrada associada às membranas celulares (SUZUKI; BONIFACINO; LIN; DAVIS *et al.*, 1991; ZHANG; TSENG; TSAI; FU *et al.*, 2013). Estudos anteriores sugerem que a

HSPA5 possui algumas regiões com grande potencial para interagir com membranas lipídicas, particularmente na extremidade C-terminal (TSAI; ZHANG; TSENG; STANCIAUSKAS *et al.*, 2015; TSENG; ZHANG; LEE, 2019; ZHANG; TSENG; TSAI; FU *et al.*, 2013). No entanto, não é possível encontrar na literatura mais informações a respeito dos mecanismos das interações entre essas chaperonas e as membranas lipídicas. Por isso, tendo como referência os estudos feitos para a HSPA1A e HSPA9, a interação da HSPA5 e da HSPA8 com lipossomas de POPS e CL foi investigada utilizando técnicas biofísicas tais como espectropolarimetria de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica.

Assim como foi observado para a HSPA1A e a HSPA9, a estrutura secundária da HSPA5 não sofre alterações significativas após a inserção da proteína nas membranas lipídicas (Figura 6). Já o estudo calorimétrico mostra que tanto a interação da HSPA5 com POPS quanto com CL são exotérmicas (Figuras 7A e 7B). A Figura 7C sugere que existem contribuições entálpicas e entrópicas, com destaque para a contribuição entrópica. Os parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas estão resumidos na Tabela 7.

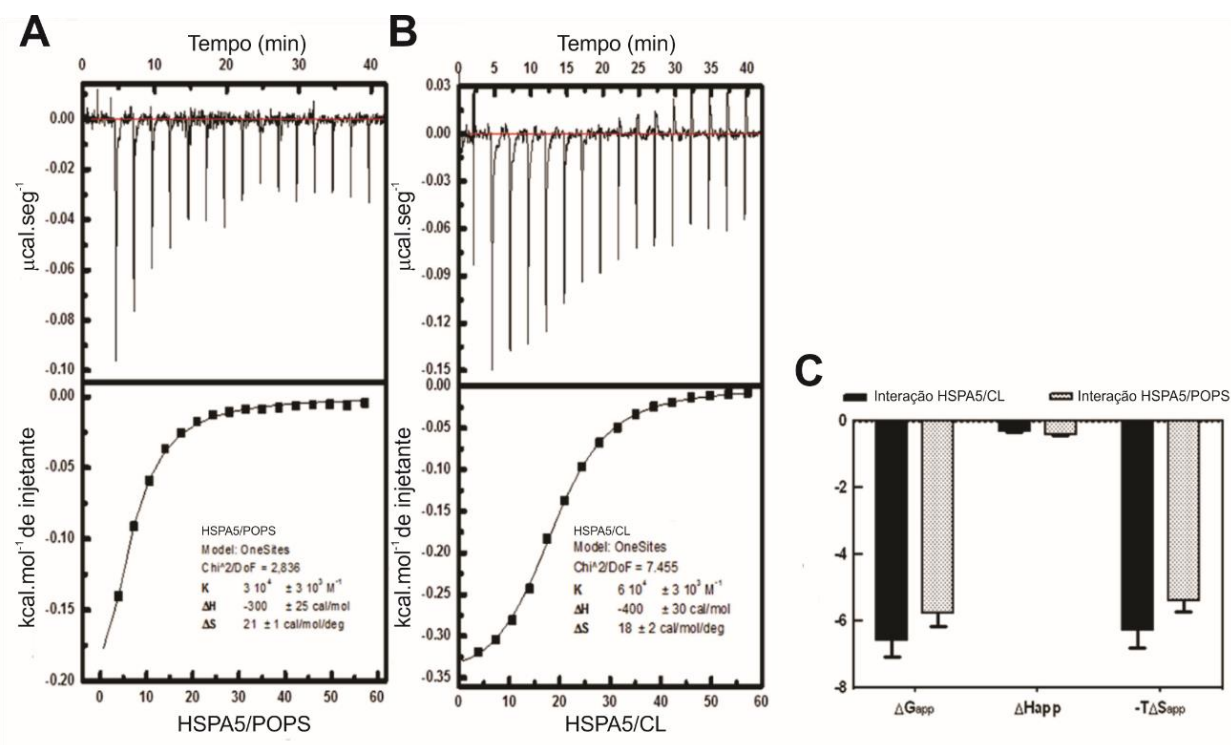
De fato, as interações com ambos os lipossomas possuem  $\Delta G_{app}$  de aproximadamente  $-6000 \text{ cal.mol}^{-1}$ , valores de  $\Delta H_{app}$  muito baixos ( $-300 \pm 50 \text{ cal.mol}^{-1}$  para HSPA5/POPS e  $-400 \pm 70 \text{ cal.mol}^{-1}$  para HSPA5/CL) e valores altos de  $-T\Delta S_{app}$  ( $-5800 \pm 600 \text{ cal.mol}^{-1}.K$  para HSPA5/POPS e  $-6100 \pm 500 \text{ cal.mol}^{-1}.K$  para HSPA5/CL), indicando que a variação da entropia desempenha um papel crítico nas interações entre HSPA5 e lipossomas. Tal característica deve-se, provavelmente, às alterações na camada de solvatação da proteína e/ou lipossomas que decorrem do mecanismo de inserção (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020). Os valores de  $K_D$  para a associação de HSPA5 com lipossomas feitos com POPS ou CL foram de  $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$  e  $1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ , respectivamente.

**Figura 6: Espectros de CD para a interação da HSPA5 com lipossomas negativamente carregados.** A obtenção dos dados de dicroísmo circular foi realizada antes e após a incorporação da HSPA5 em lipossomas de POPS e CL. O espectro da HSPA5 é representado por quadrados, a interação HSPA5/POPS por círculos e a interação HSPA5/CL por triângulos.



Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020).

**Figura 7: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre HSPA5 e lipossomas negativamente carregados. A)** Termograma da interação entre HSPA5 e POPS. **B)** Termograma da interação entre HSPA5 e CL. **C)** Assinatura termodinâmica da interação entre HSPA5 e CL (barras sólidas) e HSPA5 e POPS (barras hachuradas) mostram uma discreta contribuição entálpica, sugerindo que a interação é entropicamente dirigida. Os valores do eixo y são em  $\text{kcal.mol}^{-1}$ .



Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020).

**Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSPA5 e lipossomas negativamente carregados.** Os valores foram obtidos a partir dos termogramas. O tratamento dos dados foi feito no *software* Origin 7.

Interação	$\Delta G_{\text{app}}$ (cal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{\text{app}}$ (cal.mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S_{\text{app}}$ (cal.mol <sup>-1</sup> .K)	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
HSPA5/POPS	$-6100 \pm 500$	$-300 \pm 50$	$-5800 \pm 600$	$3,5 \pm 0,8$
HSPA5/CL	$-6500 \pm 500$	$-400 \pm 70$	$-6100 \pm 500$	$1,6 \pm 0,5$

Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020).

Estudos complementares publicados em (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020) mostram que a HSPA5, assim como a HSPA1A, passa por um processo de oligomerização após a inserção na membrana lipídica. Esse processo é mediado pela formação de pontes dissulfeto. A HSPA5 contém dois resíduos de cisteína, um no início da extremidade N-terminal (conservado na HSPA1A, HSPA8 e HSPA9) e o segundo na extremidade C-terminal (ausente na HSPA1A, HSPA8 e HSPA9). Embora não existam evidências de que esses resíduos possam formar pontes intramoleculares, aparentemente eles podem produzir ligações intermoleculares coordenando a montagem de complexos oligoméricos (ARMIJO; OKERBLUM; CAUVI; LOPEZ *et al.*, 2014; MORGNER; SCHMIDT; BEILSTEN-EDMANDS; EBONG *et al.*, 2015). Esses complexos de múltiplos polipeptídeos

parecem se montar após a inserção da proteína na bicamada lipídica, uma vez que foram observados apenas na presença de lipossomas, sugerindo que a bicamada lipídica pode fornecer um ambiente oxidativo que favorece a formação das pontes dissulfeto.

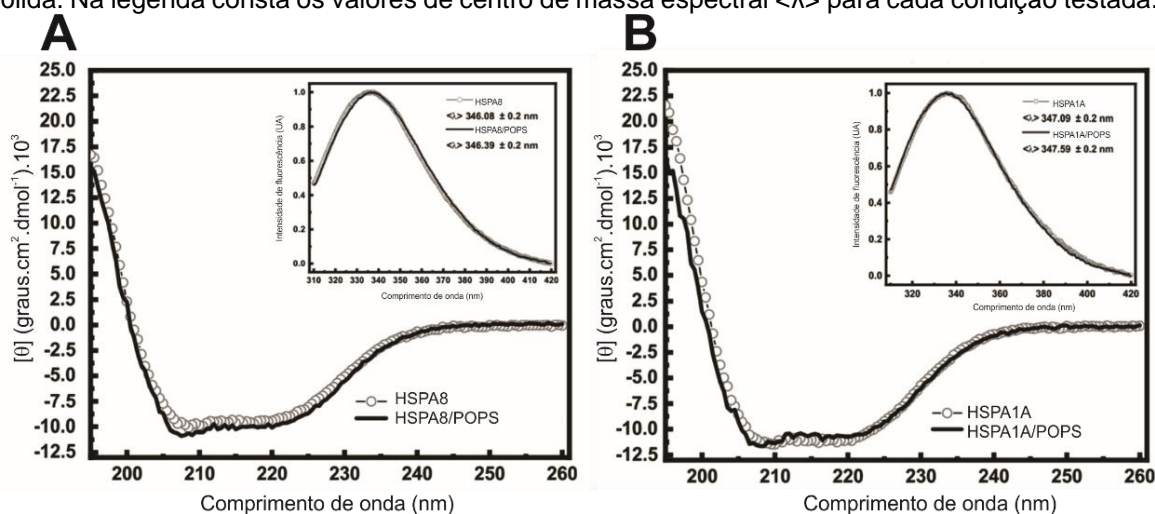
Apesar de estar presente majoritariamente no retículo endoplasmático (Figura 3), a HSPA5 ainda não foi detectada inserida na membrana dessa organela (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; YEUNG; GILBERT; SHI; SILVIUS *et al.*, 2008). No entanto, observa-se que a HSPA5 possui afinidade pela CL, a maior componente da membrana mitocondrial interna. De fato, a HSPA5 foi detectada associada à membrana mitocondrial interna após ativação da resposta a proteínas desdobradas (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; HORVATH; DAUM, 2013; SUN; WEI; LI; CHANG *et al.*, 2006). Essa associação pode sugerir que a HSPA5 está envolvida na importação de proteínas para as mitocôndrias, assim como observado para a HSPA9 (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; DE MAIO, 1999; DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020).

Como visto na Tabela 3, HSPA8 e HSPA1A compartilham alta identidade sequencial (86%), a maior entre as Hsp70 analisadas. Além disso, ambas compartilham as mesmas localizações subcelulares (Figura 3). Sabendo disso, nós decidimos fazer um estudo biofísico comparativo entre as duas proteínas (Figura 8). Assim como visto anteriormente para as demais isoformas, as interações com lipossomas de POPS e CL (dados não mostrados) não causam alterações significativas na estrutura secundária da HSPA8 e da HSPA1A. Os espectros de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (insertos nas Figuras 8A e 8B) nos fornecem informações a respeito do ambiente dos triptofanos das proteínas antes e após a inserção nos lipossomas. Essas informações podem ser avaliadas pelos valores  $\langle\lambda\rangle$  calculados em cada condição. Assim como visto para os dados de CD, as interações com os lipossomas de POPS e CL (dados não mostrados) não causam alterações significativas em termos de estrutura terciária local da HSPA8 e da HSPA1A. É importante ressaltar que os dados de interação dessas proteínas com lipossomas de CL possuem o mesmo perfil dos dados para a



interação com lipossomas de POPS mostrados abaixo e por isso não foram mostrados.

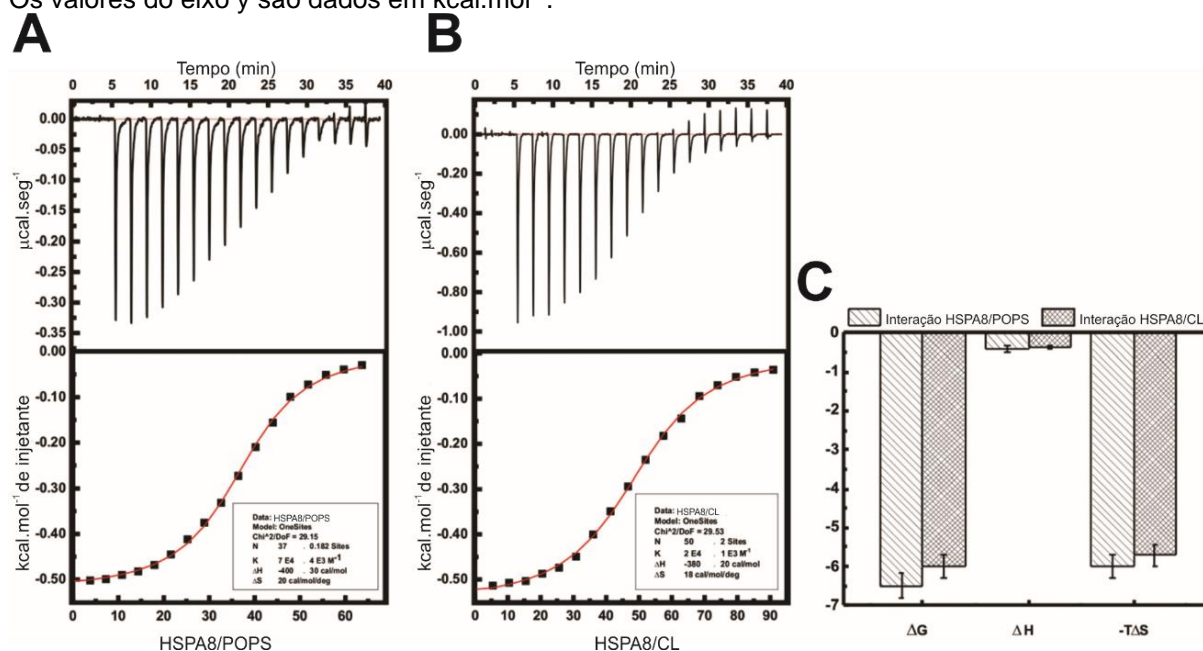
**Figura 8: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da HSPA8 e HSPA1A com POPS.** A obtenção dos dados foi realizada antes e após a incorporação das proteínas em lipossomas de POPS. **A)** O espectro de CD da HSPA8 é representado por círculos, enquanto a interação HSPA8/POPS pela linha sólida. *Inserto:* espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano. Os dados foram normalizados. A HSPA8 é representada pelos círculos e a interação HSPA8/POPS pela linha sólida. Na legenda consta os valores de centro de massa espectral  $\langle\lambda\rangle$  para cada condição testada. **B)** O espectro de CD da HSPA1A é representado por círculos, enquanto a interação HSPA1A/POPS pela linha sólida. *Inserto:* espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano. Os dados foram normalizados. A HSPA1A é representada pelos círculos e a interação HSPA1A/POPS pela linha sólida. Na legenda consta os valores de centro de massa espectral  $\langle\lambda\rangle$  para cada condição testada.



Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

Os experimentos termodinâmicos foram feitos apenas para a HSPA8 na presença de lipossomas de POPS e CL (Figura 9A e 9B, respectivamente). Os parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos termogramas estão resumidos na Tabela 8. As assinaturas termodinâmicas para a interação entre HSPA8 e os lipossomas indicaram uma contribuição discreta da entalpia ( $\Delta H_{app} = -400 \pm 30 \text{ cal.mol}^{-1}$  e  $-380 \pm 20 \text{ cal.mol}^{-1}$  para lipossomas de POPS e CL, respectivamente), e grande contribuição da entropia ( $-T\Delta S_{app} = -6100 \pm 300 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}$  e  $-5700 \pm 400 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}$  para lipossomas de POPS e CL, respectivamente). A constante de dissociação ( $K_D$ ) foi de  $17 \mu\text{M} \pm 1$  para a interação com lipossomas de POPS e  $33 \mu\text{M} \pm 2$  para lipossomas de CL. A  $\Delta G_{app}$  foi de  $-6500 \pm 300 \text{ cal.mol}^{-1}$  para HSPA8/POPS e  $-6080 \pm 400 \text{ cal.mol}^{-1}$  para lipossomas de HSPA8/CL. Em suma, as interações da HSPA8 com ambos os lipossomas foram processos espontâneos e entropicamente dirigidos, principalmente (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

**Figura 9: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre HSPA8 e lipossomas negativamente carregados. A) Termograma da interação entre HSPA8 e POPS. B) Termograma da interação entre HSPA8 e CL. C) Assinatura termodinâmica da interação entre HSPA8 e CL (barras hachuradas) e HSPA8 e POPS (barras apenas com linhas diagonais) mostram uma discreta contribuição entálpica, sugerindo que a interação é entropicamente dirigida. Os valores do eixo y são dados em kcal.mol<sup>-1</sup>.**



Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

**Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSPA8 e lipossomas negativamente carregados.** Os valores foram obtidos a partir dos termogramas. O tratamento dos dados foi feito no *software* Origin 7.

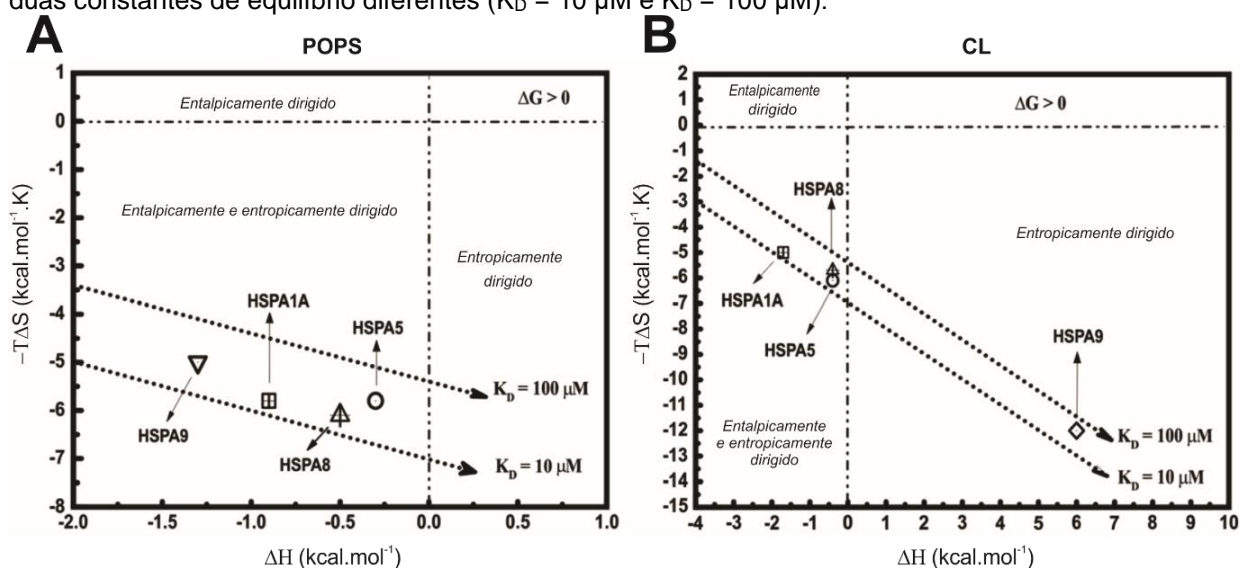
Interação	$\Delta G_{app}$ (cal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{app}$ (cal.mol <sup>-1</sup> )	$-T \Delta S_{app}$ (cal.mol <sup>-1</sup> .K)	$K_D$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
HSPA8/POPS	$-6500 \pm 300$	$-400 \pm 30$	$-6100 \pm 300$	$17 \pm 1$
HSPA8/CL	$-6080 \pm 400$	$-380 \pm 20$	$-5700 \pm 400$	$33 \pm 2$

Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

Os parâmetros termodinâmicos obtidos para a interação HSPA8/POPS são semelhantes àqueles relatados para a interação da HSPA1A, HSPA5 e HSPA9 com lipossomas de POPS (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). No entanto, os parâmetros para a interação HSPA8/CL foram semelhantes aos observados para HSPA1A e HSPA5 (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020), mas diferente daqueles obtidos para a HSPA9, visto que a interação HSPA9/CL é desfavorável entalpicamente e impulsionada somente pela entropicamente (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). O

comportamento termodinâmico das interações entre as HSPAs citadas e os lipossomas POPS e CL estão resumidos na Figura 10. As duas linhas tracejadas representam possíveis combinações de valores de  $\Delta H_{app}$  e  $-T\Delta S_{app}$  que dão origem à dois valores diferentes de constantes de equilíbrio ( $K_D = 10 \mu M$  e  $K_D = 100 \mu M$ ). Todas as isoformas interagiram com lipossomas de POPS e CL com valores semelhantes de  $K_D$  e conseqüentemente de  $\Delta G_{app}$ . No entanto, os possíveis mecanismos para cada interação foram ligeiramente distintos, envolvendo diferentes níveis de interações intramoleculares, como forças de hidrogênio e de Van der Waals, bem como interações hidrofóbicas, mudanças na camada de solvatação das proteínas e/ou lipossomas (e conseqüente deslocamento de moléculas de água) e mudanças conformacionais (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que o comportamento mais destoante foi observado para a interação HSPA9/CL, o único em que  $\Delta S_{app} > 0$ .

**Figura 10: Resumo das características termodinâmicas das interações entre as Hsp70 e lipossomas carregados negativamente.** As proteínas estudadas apresentam comportamentos ligeiramente diferentes como podemos ver no gráfico de dispersão de  $-T\Delta S$  em função de  $\Delta H$  para a interação de HSPA1A, HSPA5, HSPA8 e HSPA9 com lipossomas de POPS (A) e CL (B). As duas linhas tracejadas representam possíveis combinações de valores de  $\Delta H$  e  $-T\Delta S$  que resultam em duas constantes de equilíbrio diferentes ( $K_D = 10 \mu M$  e  $K_D = 100 \mu M$ ).



Fonte: adaptada de (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

Estudos complementares publicados em (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021) mostram que, assim como já visto anteriormente para a HSPA5 e a HSPA1A, a HSPA8 também oligomeriza após a inserção em lipossomas de POPS e CL e essa oligomerização é mediada pela formação de pontes dissulfeto (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; DORES-SILVA; CAUVI;

COTO; SILVA *et al.*, 2021). A HSPA8 possui quatro resíduos de cisteína, dois no domínio DLN e dois no domínio DLP, que provavelmente estão envolvidos nesse processo de oligomerização. Para que isso aconteça, a membrana lipídica provavelmente proporciona o ambiente oxidado responsável pela formação das pontes dissulfeto. Além disso, pode ser que a proteína sofra mudanças conformacionais, assim como discutido para a HSPA5. O processo de oligomerização também pode envolver moléculas de água da superfície da proteína, aumentando a entropia do sistema, o que justifica a grande contribuição entrópica indicada nos estudos termodinâmicos apresentados. Apesar de tanto a HSPA8 como a HSPA1A formarem canais iônicos em membranas lipídicas, as características das interações com as membranas são diferentes para cada proteína. De fato essa observação já foi relatada em (ARISPE; DOH; DE MAIO, 2002) e pode ser reforçada quando interpreta-se os experimentos de ITC mostrados anteriormente.

Interessantemente, a interação da HSPA8 com lipossomas POPS ou CL depende do pH do meio de incubação. Ocorre uma maior incorporação em pH 5,0 e uma redução em pH 9,0, sugerindo que a carga líquida da proteína pode desempenhar um papel na interação com os fosfolípidios (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021). A estrutura primária da HSPA8 apresenta uma distribuição aleatória e homogênea de aminoácidos carregados positivamente e negativamente na superfície da proteína, o que é muito similar a outros membros da família Hsp70. A carga líquida teórica da HSPA8 é positiva em pH 5,0 e negativa em pH 9,0, sugerindo que microambientes positivos na superfície da HSPA8 podem estar envolvidos na interação com a bicamada de fosfolípidios com carga negativa (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021). Sabendo disso, pode-se inferir que a interação da HSPA8 com as cabeças polares negativa dos fosfolípidios é provavelmente o primeiro passo para a sua inserção na membrana, como postulado para a interação de outras proteínas com membranas lipídicas, o que pode ser seguido por uma mudança conformacional que facilita a incorporação na região mais hidrofóbica da membrana (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021; WIENER; WHITE, 1992; WIMLEY; HRISTOVA; LADOKHIN; SILVESTRO *et al.*, 1998). Além disso, a incorporação da HSPA8 em lipossomas de POPS ou CL foi estudada na presença de ATP ou ADP, e os resultados sugerem que as mudanças

conformacionais após a ligação dos nucleotídeos podem perturbar negativamente a associação da chaperona com os lipossomas. Provavelmente isso aconteça porque na presença de nucleotídeos de adenosina a HSPA8 não pode se mover livremente entre as suas duas principais conformações, um processo que pode ser necessário para a interação da proteína com a cabeça de fosfolípido ou a inserção na membrana (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021).

De um modo geral, os resultados aqui apresentados mostraram que os mecanismos de inserção da HSPA5 e da HSPA8 em lipossomas negativamente carregados se assemelham àqueles previamente observados para a HSPA1A e HSPA9. O estudo estrutural mostrou que a interação com os lipossomas não causou alterações estruturais significativas nas Hsp70. Além disso, as assinaturas termodinâmicas das interações também são parecidas, especialmente quando consideramos o lipossoma de POPS. Apesar do aumento das informações sobre a inserção dessas isoformas da Hsp70 nas membranas lipídicas, os mecanismos que essas chaperonas utilizam nesse processo ainda não estão claros. As HSAs estudadas são proteínas altamente carregadas e sem domínios hidrofóbicos importantes que justifiquem suas inserções espontâneas em membranas. Sendo assim, novas abordagens e mais estudos se fazem necessários.

### **2.2.2. A interação da Hep1 humana com lipossomas**

Como visto anteriormente, a isoforma da Hsp70 que apresentou comportamento mais discrepante frente aos lipossomas negativamente carregados foi a HSPA9. Sabendo da importância dessa chaperona na importação e enovelamento de proteínas na mitocôndria, decidimos estudar a interação da co-chaperona hHep1 com lipossomas. Além de elucidar o mecanismo de inserção da hHep1 em membranas, esse estudo visou também elucidar indiretamente o mecanismo de inserção da HSPA9, visto que a hHep1 é fundamental para a manutenção e bom funcionamento da HSPA9. O potencial da hHep1 em se associar a membranas lipídicas foi previamente investigado (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). Os dados mostram que a hHep1 interage indiscriminadamente com lipossomas negativamente carregados e lipossomas positivamente carregados. Entretanto, vale ressaltar que foi notada uma ligeira preferência dessa proteína por uma mistura de lipídios que mimetiza a membrana

mitocondrial interna (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). Sendo assim, os estudos com a hHep1 foram aprofundados investigando a interação dessa proteína com lipossomas de POPS e CL.

Os aspectos estruturais da interação entre a hHep1 e os lipossomas estão representados na Figura 11. A interação com os lipossomas provoca um incremento no sinal de CD da hHep1 na região entre 205-215 nm (Figura 11). Na presença de lipossomas preparados com CL, a hHep1 parece ganhar sinal de CD ligeiramente maior em 205-215 nm do que na presença dos lipossomas de POPS. As alterações em nível de estrutura secundária são corroboradas pelos espectros de emissão de fluorescência da hHep1 (Figura 11, inserto). Na ausência dos lipossomas, o espectro de emissão de fluorescência da hHep1 apresenta características de uma proteína dobrada na qual um único triptofano está parcialmente exposto ao solvente, com um  $\lambda_{\max}$  de  $338,6 \pm 0,3$  nm e  $\langle \lambda \rangle$  de  $345,6 \pm 0,1$  nm (DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013). Os resultados na presença dos lipossomas mostraram um ligeiro deslocamento para o vermelho (*red-shift*) nos espectros de emissão de fluorescência da hHep1. Na presença de lipossomas de CL os valores de  $\lambda_{\max}$  e  $\langle \lambda \rangle$  foram  $340,2 \pm 0,3$  nm e  $346,9 \pm 0,1$  nm, respectivamente. Já os valores de  $\lambda_{\max}$  e  $\langle \lambda \rangle$  registrados na presença de lipossomas de POPS foram  $339,6 \pm 0,3$  nm e  $346,5 \pm 0,1$  nm, respectivamente. Com base nesses valores, concluiu-se que os lipossomas de CL causaram mais mudanças na estrutura da hHep1 do que os lipossomas de POPS. No entanto, a presença dos lipossomas não levou ao desenovelamento da hHep1, uma vez que tanto os valores de  $\lambda_{\max}$  quanto de  $\langle \lambda \rangle$  obtidos estão de acordo com aquele esperado para o triptofano parcialmente exposto ao solvente (BATISTA; ALMEIDA; SERAPHIM; SILVA *et al.*, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013). Em suma, ao contrário do que foi observado para as HSPAs, as avaliações da estrutura secundária e terciária local indicaram que as interações com POPS e CL causaram mudanças significativas na estrutura da hHep1, provocando a redução de seu conteúdo estrutural sem levar a proteína ao seu desenovelamento completo.

**Figura 11: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da hHep1 com lipossomas negativamente carregados.** Espectros de CD antes e após a interação da hHep1 com lipossomas de POPS (em vermelho) e CL (em azul) avaliados por espectroscopia de dicroísmo circular e por emissão de fluorescência intrínseca do triptofano

(inserto). Nesse último caso, os espectros apresentados foram normalizados. Os valores de  $\langle \lambda \rangle$  (centro de massa espectral) e  $\lambda_{max}$  calculados em cada condição são mostrados na legenda da Figura. Os espectros da hHep1 estão representados em preto.

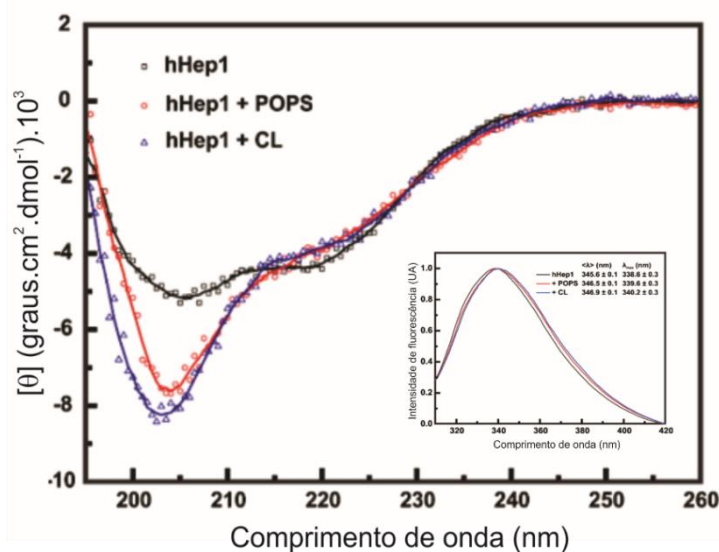
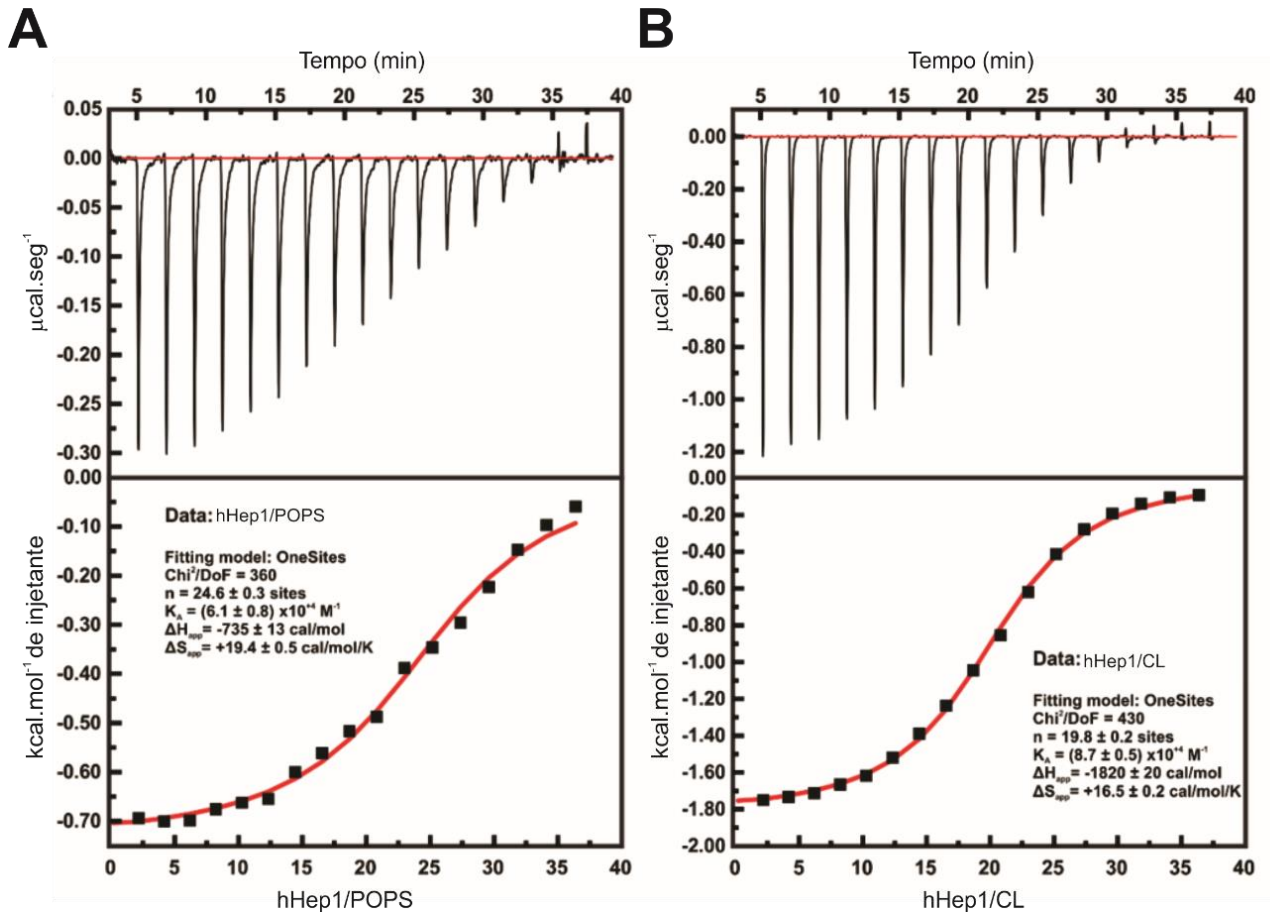


Figura: autoria própria.

Os aspectos termodinâmicos da interação entre a hHep1 e os lipossomas foram investigados por ITC e podem ser vistos na Figura 12. Na Tabela 9 estão resumidos os parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos termogramas. Os resultados indicaram que as interações entre hHep1 e lipossomas de POPS e CL são ambos processos exotérmicos. É importante ressaltar que se tratam de processos entalpicamente e entropicamente dirigidos, perfil termodinâmico similar ao observado para a HSPA1A, HSPA5 e HSPA8 e diferente daquele observado para a HSPA9. A interação da hHep1 com lipossomas de CL resultou em uma liberação de calor ( $\Delta H_{app}$ ) aproximadamente 2,5 vezes maior do que a observada para a interação entre hHep1 com lipossomas de POPS, provavelmente devido a uma formação mais eficiente de interações relacionadas à carga. Apesar dos perfis exotérmicos, ambas as interações resultaram em valores semelhantes de  $\Delta G_{app}$ , o que indica que os valores de  $K_D$  também são semelhantes (Tabela 9). Além disso, os valores positivos para  $\Delta S_{app}$  indicam que as interações são entropicamente dirigidas, provavelmente devido à liberação de moléculas de água e a outros eventos que proporcionaram um estado de maior grau de liberdade, tais como mudanças conformacionais.

**Figura 12: Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a interação entre hHep1 e lipossomas negativamente carregados. A)** Termograma da interação entre hHep1 e POPS. **B)** Termograma da interação entre hHep1 e CL.



Fonte: autoria própria.

**Tabela 9: Parâmetros termodinâmicos da interação entre hHep1 e lipossomas negativamente carregados.** Os valores foram obtidos a partir dos termogramas. O tratamento dos dados foi feito no *software* Origin 7.

Interação	ΔG <sub>app</sub> (cal.mol <sup>-1</sup> )	ΔH <sub>app</sub> (cal.mol <sup>-1</sup> )	-TΔS <sub>app</sub> (cal.mol <sup>-1</sup> .K)	K <sub>D</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )
hHep1/POPS	-6500 ± 100	-730 ± 50	-5800 ± 200	17 ± 3
hHep1/CL	-6720 ± 60	-1870 ± 50	-4850 ± 60	12 ± 1

Fonte: autoria própria.

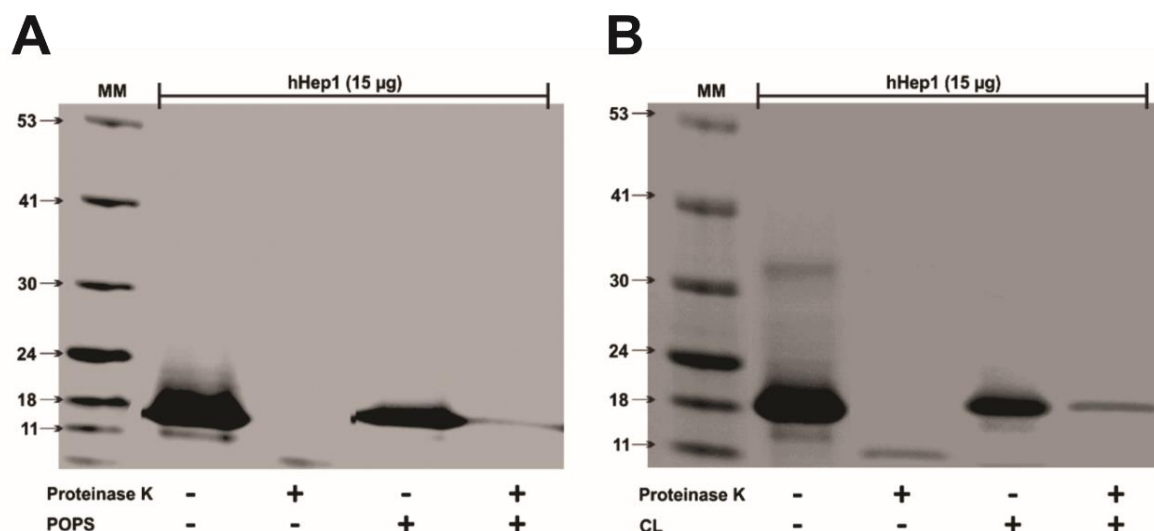
Ensaio de suscetibilidade à digestão proteica por proteinase K foram realizados para identificar as regiões da hHep1 que foram inseridas nos lipossomas. Quando comparamos as intensidades das bandas da hHep1 após a associação com os lipossomas de POPS (Figura 13A) e CL (Figura 13B) na ausência ou presença de proteinase K após 1 hora de incubação, observa-se que a hHep1 foi quase completamente degradada pela proteinase K, visto que as intensidades das bandas nas condições contendo hHep1, lipossoma e proteinase



K são bem menos intensas do que as intensidades das bandas nas condições contendo apenas hHep1 e lipossoma. Observando as Figura 13A e 13B pode-se dizer que a hHep1 foi ligeiramente mais resistente à digestão pela proteinase K quando inserida na bicamada de CL do que quando inserida na bicamada de POPS. De um modo geral, os resultados sugerem que a interação entre a hHep1 e os lipossomas ocorre superficialmente, sem uma grande inserção da proteína na bicamada lipídica. Essa característica é diferente daquela observada para a HSPA9 e demais HSAs, pois em condições semelhantes essas chaperonas foram detectadas bem protegidas da digestão pela proteinase K pelos lipossomas (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; KIRALY *et al.*, 2020; DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021; DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020).

Apesar dos resultados aqui apresentados sugerirem que a interação entre a hHep1 e as membranas lipídicas é superficial, estudos *in vivo* ainda não publicados pelo nosso grupo mostraram que a hHep1 recombinante pode ser encontrada dentro de fibroblastos humanos e células U2OS após um período de incubação. Tais observações sugerem que o ambiente complexo da membrana celular pode ser fundamental para a inserção dessa proteína na membrana.

**Figura 13: A interação de hHep1 com a bicamada lipídica é superficial.** Géis LDS-PAGE mostrando a interação da hHep1 (15 µg) com lipossoma de POPS (A) e CL (B) na presença e ausência de proteinase K, conforme ilustrado nas legendas.



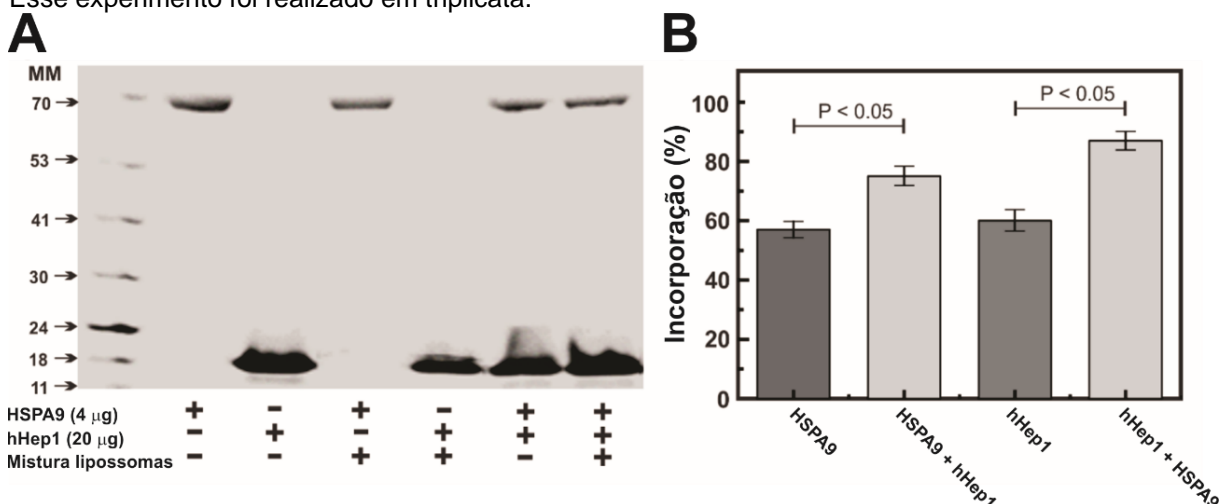
Fonte: autoria própria.

Investigamos também se a incorporação da hHep1 em lipossomas preparados a partir de uma mistura de lipídios que mimetizam a membrana mitocondrial interna é influenciada pela presença da HSPA9 (e vice-versa). Para isso, preparamos uma mistura de lipídios contendo 3% de POPS, 18% de CL, 45% de POPC e 34% de POPE. A HSPA9 foi adicionada à hHep1 em uma razão molar de 1:25 e, em seguida, as proteínas foram incubadas com a mistura de lipídios citada acima. A razão molar escolhida foi baseada em estudos anteriores que sugerem que a interação hHep1-HSPA9 tem  $K_D$  na faixa submicromolar (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). Por fim, as proteínas que interagiram e ficaram retidas pelos lipossomas foram resolvidas (Figura 14A). A quantidade de proteína incorporada a mistura de lipídios foi estimada por análise densitométrica (Figura 14B). Como esperado, ambas as proteínas interagiram com a mistura de lipídios (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). As taxas de incorporação para a HSPA9 e a hHep1 sozinhas são semelhantes, em torno de 60%. Quando analisamos a condição em que temos a interação das duas proteínas para formar um complexo, observamos que a taxa de incorporação de ambas as proteínas aumentou em cerca de 20%. Portanto, pode-se inferir que a interação entre HSPA9 e hHep1 foi benéfica para a inserção de ambas as proteínas na bicamada lipídica.

A maior eficácia da incorporação do complexo proteico pode ser explicada se lembrarmos algumas características da HSPA9. Na literatura é relatado que

essa Hsp70 não sofre agregação quando inserida na bicamada lipídica (DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020). Logo, permanecer em seu estado monomérico parece ser essencial para que a HSPA9 cumpra seu papel nesse compartimento subcelular. Nesse sentido, a interação entre a hHep1 e a HSPA9 foi fundamental, visto que as principais funções dessa co-chaperona foi justamente prevenir a agregação da HSPA9 e mantê-la estável e funcional ((DORES-SILVA; CAUVI; KIRALY; BORGES *et al.*, 2020; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; MOMOSE; OHSHIMA; MAEDA; ENDO, 2007; YAMAMOTO; MOMOSE; YATSUKAWA; OHSHIMA *et al.*, 2005).

**Figura 14: Formação do complexo hHep1-HSPA9 e interação com lipossomas. A)** Gel LDS-PAGE mostrando a interação da hHep1 com HSPA9 na presença e ausência de uma mistura de lipídios que mimetizam a membrana mitocondrial interna (POPS 3%, CL 18%, POPC 45% e POPE 34%). **B)** O *software* GelQuant foi utilizado para analisar a intensidade das bandas no gel e, conseqüentemente, estimar a porcentagem de hHep1 e HSPA9 incorporadas em cada condição. Esse experimento foi realizado em triplicata.



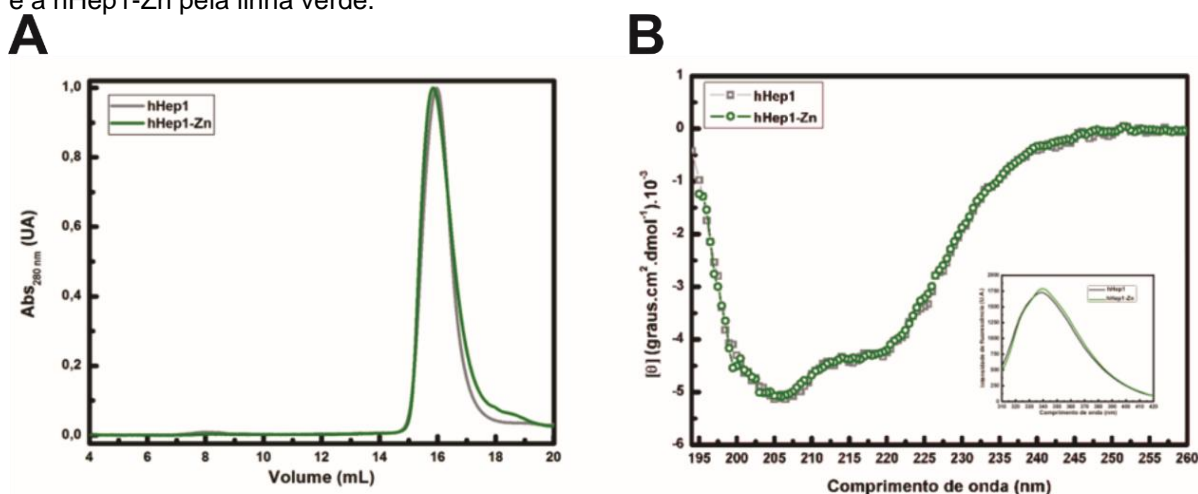
Fonte: autoria própria.

### 2.2.3. O motivo zinc finger da Hep1 humana

O motivo de ligação de zinco, além de ser fundamental para a estabilidade estrutural da hHep1, possui papel fundamental na interação da hHep1 com a HSPA9 (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; MOMOSE; OHSHIMA; MAEDA; ENDO, 2007; VU; ZHAI; LEE; GUERRA *et al.*, 2012). Sabendo disso, a hHep1 foi submetida a um protocolo de retirada do íon zinco. Como descrito anteriormente, foi feita a incubação da hHep1 pura em altas concentrações de EDTA e em seguida foram feitas sucessivas diálises exaustivas para remoção do agente quelante. O objetivo dessa retirada foi identificar as alterações estruturais decorrentes da

ausência do íon zinco e, principalmente, avaliar a importância do motivo *zinc finger* na interação da hHep1 com lipossomas negativamente carregados.

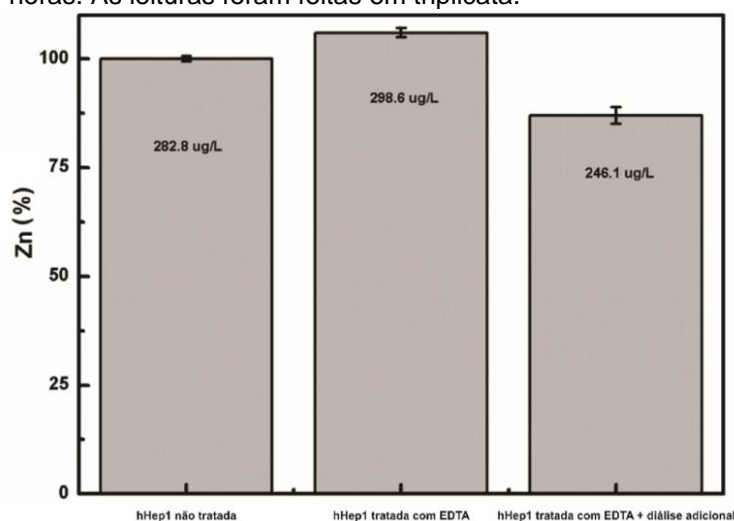
**Figura 15: Aspectos estruturais da retirada do íon zinco da hHep1.** **A)** Os perfis de eluição da hHep1 (linha cinza) e da hHep1 que passou pelo tratamento para retirada do zinco (hHep1-Zn, linha verde) mostram que a proteína eluiu na forma de uma única espécie. Os experimentos foram feitos em uma coluna Superdex 200 GL 10/300 e não mostram diferenças significativas nas propriedades hidrodinâmicas da hHep1 após o tratamento para retirada do zinco. **B)** O espectro de CD da hHep1 (representada pelos quadrados cinzas) e o espectro de CD para a hHep1 após o tratamento para a retirada do zinco (círculos verdes) são praticamente idênticos. Essa mesma característica também foi observada nos experimentos de fluorescência (inserto). Nesse último, os espectros de emissão foram normalizados para facilitar a comparação. A hHep1 também é representada pela linha cinza e a hHep1-Zn pela linha verde.



Fonte: autoria própria.

As Figuras 15A e 15B mostram que não existem alterações significativas entre a hHep1 íntegra (em cinza) e a hHep1 submetida ao protocolo de retirada do íon zinco (hHep1-Zn, em verde). Na Figura 15A é possível observar que ambas eluíram praticamente no mesmo volume (em torno de 16 mL) e majoritariamente na forma de uma única espécie, indicando que os parâmetros hidrodinâmicos da hHep1-Zn não diferem dos parâmetros da proteína íntegra. Já na Figura 15B é possível observar que não existem diferenças significativas entre os espectros de CD da hHep1 e da hHep1-Zn; no inserto, observa-se que ambas as espécies apresentam praticamente o mesmo centro de massa espectral ( $\lambda$ ) - em torno de 345 nm. Logo, pode-se concluir que a hHep1 e a hHep1-Zn não diferem em suas estruturas secundária e terciária local. Tais observações colocaram em dúvida a eficiência do protocolo de retirada do íon zinco. Para investigar se as amostras de hHep1-Zn eram satisfatórias, alíquotas da hHep1 antes e depois de receber o tratamento com EDTA foram submetidas a espectrometria de absorção atômica. Os resultados podem ser vistos na Figura abaixo.

**Figura 16: Concentração de íons zinco na proteína recombinante hHep1 detectada por espectrometria de absorção atômica.** Comparação entre a concentração de íon zinco contido na hHep1 pura não tratada e a concentração de íon zinco contido na hHep1 após a mesma ser submetida ao protocolo de retirada do íon zinco descrito na metodologia. Na última barra, a diálise adicional foi de 94 horas. As leituras foram feitas em triplicata.



Fonte: autoria própria.

A concentração de zinco para a amostra de hHep1 não tratada (proteína pura) foi considerada como 100%. As concentrações de zinco para a hHep1 tratada com EDTA e para a hHep1 tratada com EDTA + diálise adicional (onde a proteína foi submetida a 94 horas de diálise exaustiva após o tratamento com EDTA) foram calculadas com base no valor obtido para a proteína não tratada. Como visto na Figura 16, após a realização do protocolo de retirada a concentração de zinco na hHep1 não sofreu alterações significativas. Mesmo um longo período de diálise após o tratamento com EDTA não favoreceu de maneira significativa a retirada do metal (observa-se apenas uma redução de aproximadamente 10% na concentração do íon). Considerando a quantidade de hHep1 na amostra inicial, a quantidade calculada de íon zinco deveria ser de aproximadamente 296,8  $\mu\text{g/L}$ . Nossos resultados (283  $\mu\text{g/L}$  na amostra não tratada, 299  $\mu\text{g/L}$  na tratada e 246  $\mu\text{g/L}$  na tratada + diálise adicional) são consistentes com uma estequiometria de 1 íon de  $\text{Zn}^{2+}$  por monômero. Por fim, podemos concluir que a retirada do zinco não foi eficaz. De fato, o protocolo adotado não parece ser eficiente para retirar o zinco da hHep1. Resultados mais eficientes poderiam ser obtidos utilizando outros agentes quelantes, aumentando a temperatura ou mesmo trabalhando em outras faixas de pH (DE JESUS; ARAGÃO; ARRUDA; RAMOS, 2019). Estudos já mostraram que a interação entre EDTA e  $\text{Zn}^{2+}$  de proteínas que possuem o mesmo motivo pode ser favorecida em pH 5 (ABIAN; NEIRA; VELAZQUEZ-CAMPOY,

2009). De todo modo, chama a atenção a alta afinidade da proteína pelo íon zinco. Outros aspectos sobre essa afinidade serão abordados no tópico a seguir, com a hDjC20.

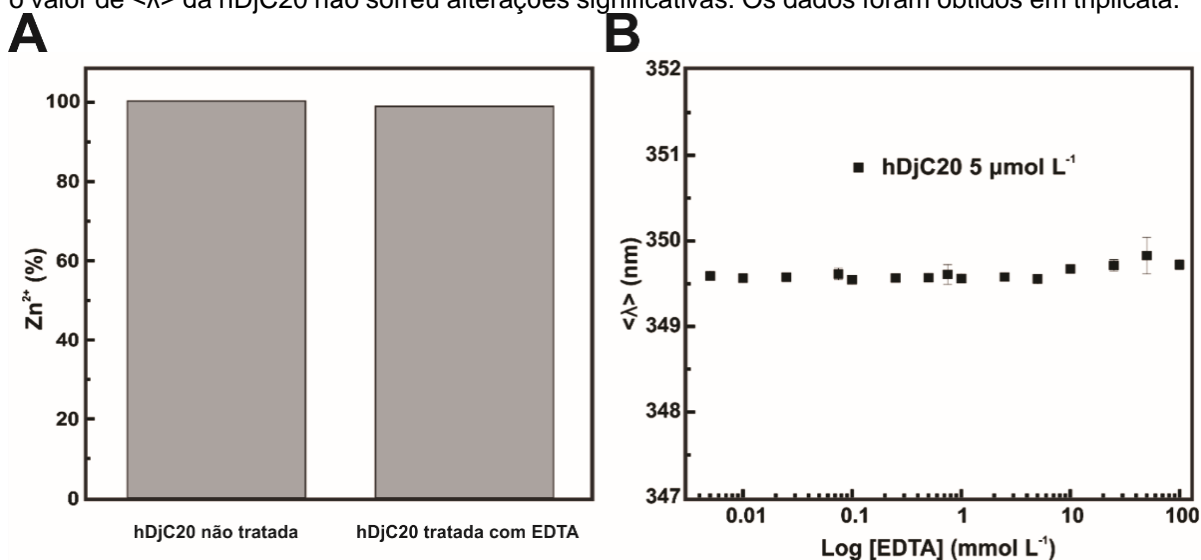
#### **2.2.4. DjC20: outra co-chaperona da HSPA9 que possui o motivo zinc finger**

Nós estudamos a DjC20 humana, uma chaperona da família JDP que está envolvida na biogênese de proteínas com o *cluster* Fe-S na matriz mitocondrial (BITTO; BINGMAN; BITTOVA; KONDRASHOV *et al.*, 2008; KAMPINGA; CRAIG, 2010; VICKERY; CUPP-VICKERY, 2007). Nesse mesmo compartimento celular ela também atua como co-chaperona da HSPA9, fazendo a seleção e entrega de proteínas cliente para essa Hsp70 e estimulando a sua atividade ATPásica (GAO; EISENBERG; GREENE, 1996; GREENE; MASKOS; LANDRY, 1998; KAMPINGA; CRAIG, 2010; SZABO; LANGER; SCHRODER; FLANAGAN *et al.*, 1994). O motivo *zinc finger* da hDjC20 está situado no domínio N-terminal e, quando analisamos a estrutura proteica, observamos que esse motivo está espacialmente muito próximo ao domínio J (Figura 5B). Assim como vimos para a hHep1, o motivo *zinc finger* também parece ser essencial na manutenção da estabilidade e bom funcionamento da hDjC20. Sendo assim, os resultados obtidos a partir da tentativa de retirada do íon zinco da hDjC20 e os estudos de estabilidade realizados podem ser vistos a seguir.

O mesmo protocolo empregado para a retirada do íon zinco da hHep1 foi empregado na hDjC20. As amostras de hDjC20 tratadas e não tratadas com EDTA foram analisadas por ICP-OES e as concentrações de íons zinco foram muito semelhantes em ambos os casos: 0,041  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  na amostra não tratada e 0,043  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  na amostra tratada com EDTA (Figura 17A). Considerando a concentração de zinco calculada para a amostra inicial, que era de aproximadamente 0,045  $\mu\text{mol}$ , nossos resultados são consistentes com uma estequiometria de 1 íon de  $\text{Zn}^{2+}$  por monômero. Ao considerar os valores de  $\langle\lambda\rangle$  para a hDjC20 incubada em concentrações crescentes de EDTA (Figura 17B), não observamos quaisquer alterações significativas. Esses dados sugerem que a afinidade do hDjC20 pelo  $\text{Zn}^{2+}$  é alta e que o EDTA não foi capaz de extraí-lo nas condições utilizadas. Apesar dessa aparente alta afinidade e da incapacidade de remover o íon metálico da proteína pelo tratamento com EDTA, decidimos

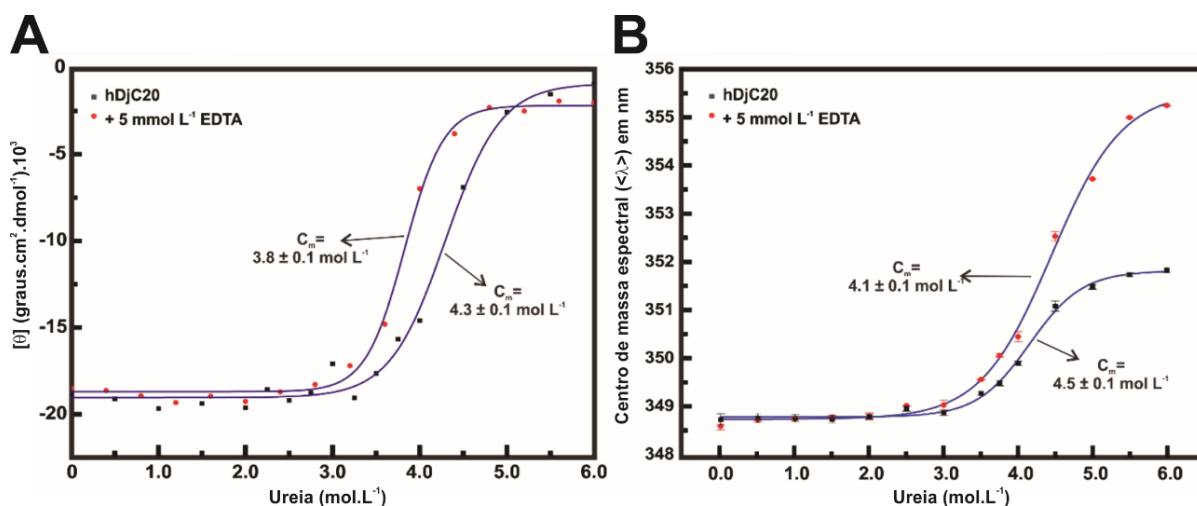
investigar a influência do  $Zn^{2+}$  na estrutura da hDjC20 comparando a estabilidade química da proteína na ausência e presença de EDTA.

**Figura 17: Concentração de íons zinco na proteína recombinante DjC20.** **A)** Concentrações de zinco detectadas por ICP-OES. O tratamento com EDTA seguido de diálises exaustivas não foi capaz de remover o íon da hDjC20. **B)** Os valores de  $\langle \lambda \rangle$  para a hDjC20 em várias concentrações de EDTA (de 0,005 a 100  $mmol.L^{-1}$ ) são mostrados. Mesmo em concentrações elevadas de EDTA, o valor de  $\langle \lambda \rangle$  da hDjC20 não sofreu alterações significativas. Os dados foram obtidos em triplicata.



Fonte: autoria própria.

**Figura 18: Efeito do íon zinco na estabilidade estrutural da hDjC20.** **A)** Desnaturação química da hDjC20 induzida por ureia e monitorada por CD em 222 nm. Os dados foram obtidos na ausência (quadrados pretos) e na presença (círculos vermelhos) de EDTA. **B)** Desnaturação química da hDjC20 induzida por ureia e monitorada pela emissão de fluorescência intrínseca do triptofano. Os quadrados pretos e círculos vermelhos representam a hDjC20 na ausência e na presença de EDTA, respectivamente. As linhas azuis correspondem ao *fitting* sigmoidal (Boltzmann). Os dados foram obtidos em triplicata.



Fonte: autoria própria.

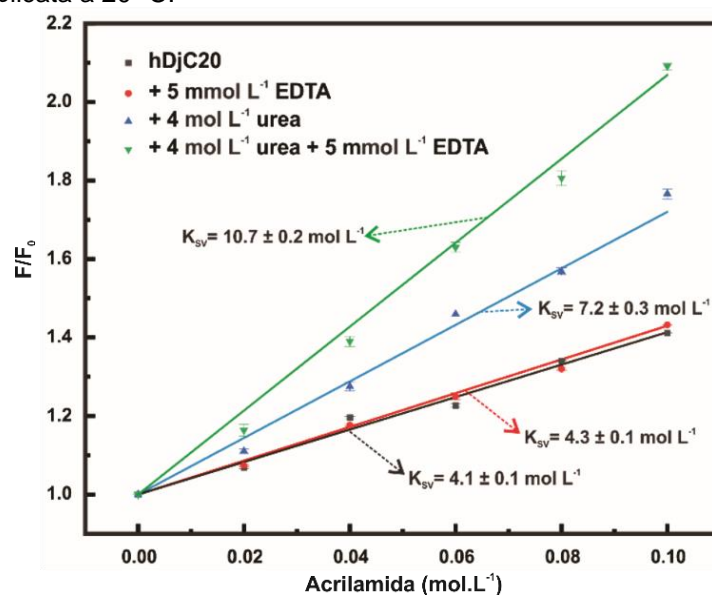
Ambos os gráficos da Figura 18 mostram uma desnaturação química que se comporta como um único evento de transição no qual a presença de EDTA causou uma redução na estabilidade química. Quando a estrutura terciária local da hDjC20 é investigada usando como sonda a emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (Figura 18B), o valor de  $C_m$  medido na ausência de EDTA (4,5 mol.L<sup>-1</sup>) foi bastante semelhante àquele obtido na desnaturação química acompanhada por CD em 222 nm nas mesmas condições ( $C_m = 4,3$  mol.L<sup>-1</sup>, Figura 18A). Na presença de EDTA, duas diferenças foram observadas: *i*) uma ligeira redução nos valores de  $C_m$  e *ii*) um desvio adicional para o vermelho (*red-shift*) que pode ser visto na Figura 14B. Essa segunda diferença sugere que, no decorrer do desdobramento proteico, a afinidade da hDjC20 pelo  $Zn^{+2}$  diminui devido à ação da ureia, permitindo então que o íon seja liberado e quelado pelo EDTA. Esses eventos levaram ao desvio adicional para a região do vermelho devido à proximidade espacial entre o motivo *zinc finger* e os resíduos de Trp no domínio N-terminal da hDjC20.

O efeito sinérgico entre a ureia e o EDTA foi mais bem investigado por experimentos de fluorescência onde nós avaliamos a exposição dos triptofanos da hDjC20 a um *quencher* dinâmico como a acrilamida (Figura 19). Desse modo foi possível obter valores de  $K_{sv}$  (constante de Stern-Volmer) para cada condição estudada. Em todas as condições, as curvas foram bem ajustadas por uma equação de primeira ordem, sugerindo que ambos os triptofanos presentes no domínio N-terminal da hDjC20 devem estar igualmente expostos ao *quencher* dinâmico. A hDjC20 íntegra na ausência e na presença de 5 mM de EDTA foram



igualmente expostas ao *quencher*, mostrando valores de  $K_{sv}$  muito parecidos (cerca de 4,1 - 4,3 M). No entanto, o valor de  $K_{sv}$  aumentou significativamente para aproximadamente 7,2 M na condição onde ureia estava presente e aumentou ainda mais ( $K_{sv} = 10,7 \pm 0,2$  M) na condição onde EDTA foi adicionado à proteína incubada com ureia. Em conjunto, esses resultados indicam que a interação entre os íons  $Zn^{2+}$  e os resíduos de cisteínas do motivo *zinc finger* é forte o suficiente para não ser afetada apenas pela presença de EDTA. No entanto, quando um agente desnaturante como a ureia enfraquece a estabilidade estrutural da hDjC20, levando-a a um estado "metaestável", a afinidade da proteína pelo  $Zn^{2+}$  é reduzida de tal forma que o EDTA pode quelar o íon metálico, causando um efeito desnaturante aditivo.

**Figura 19: O EDTA e a ureia causaram efeitos sinérgicos na exposição dos triptofanos da hDjC20 ao solvente.** Experimentos de *quenching* dinâmico foram realizados para a hDjC20 usando acrilamida como *quencher* na presença ou ausência de ureia e/ou EDTA. Cada condição é representada por uma cor específica, de acordo com a legenda. Os ajustes lineares forneceram os valores de  $K_{sv}$ , de acordo com a equação descrita na metodologia. Os experimentos foram realizados em triplicata a 20 °C.



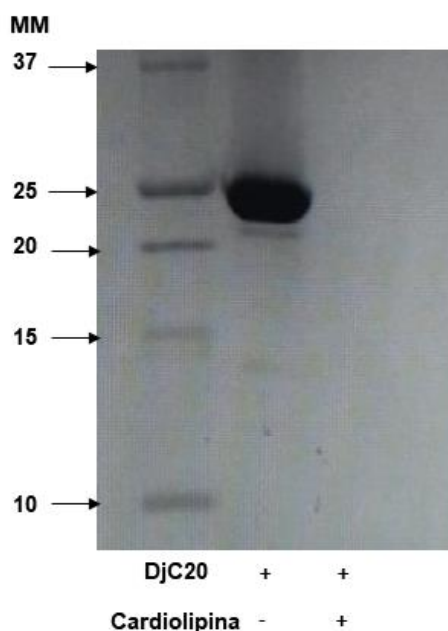
Fonte: autoria própria.

### 2.2.5. Interação da hDjC20 com lipossomas

A interação da hDjC20 com lipossomas também foi investigada. Aqui, nos limitamos a estudar a interação dessa proteína com lipossomas de CL, o principal componente da membrana mitocondrial interna. Essa escolha foi baseada no fato da hDjC20 ser uma proteína mitocondrial. No gel SDS-PAGE onde foi revelada a

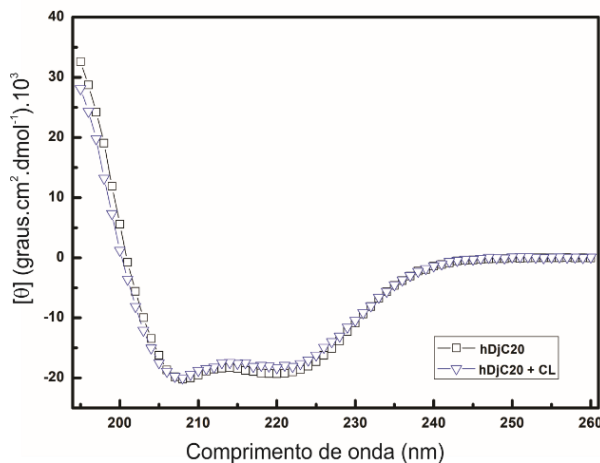
incorporação da hDjC20 em lipossomas de CL nenhuma banda com tamanho correspondente a hDjC20 foi observada (Figura 20). Os aspectos estruturais dessa interação podem ser vistos na Figura 21. Nenhuma alteração significativa em nível de estrutura secundária e de estrutura terciária local foi observada. Em conjunto esses dados sugerem que, nas condições testadas, a hDjC20 não interagiu com lipossomas de CL. Esse é um comportamento distinto daqueles observados para as chaperonas mitocondriais HSPA9 e hHep1 na presença desse mesmo lipossoma. Apesar dessas observações, uma investigação mais detalhada se faz necessária, em especial do ponto de vista termodinâmico.

**Figura 20: A interação de hDjC20 com lipossomas.** Gel SDS-PAGE mostrando a interação da hDjC20 (15 µg) com o lipossoma de CL.

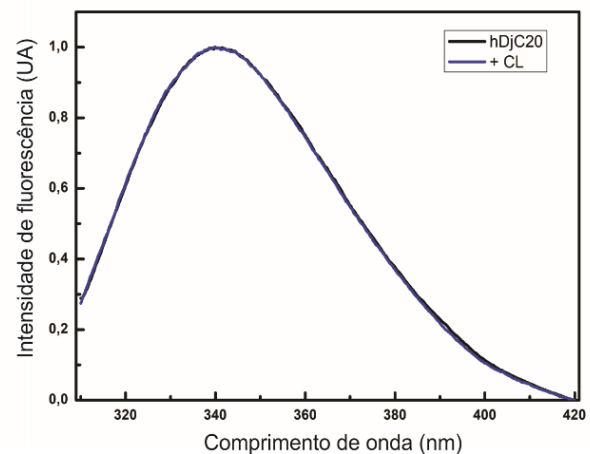


Fonte: autoria própria.

**Figura 21: Espectros de CD e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para a interação da hDjC20 com lipossomas de CL.** Espectros de CD antes e após a interação da hHep1 com lipossomas de CL (em azul) avaliados por espectroscopia de dicroísmo circular (A) e por emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (B). Nesse último caso, os espectros apresentados foram normalizados. O valor de  $\langle \lambda \rangle$  (centro de massa espectral) para a hDjC20 foi de  $351,35 \pm 0,2$  nm e para a hDjC20 + CL foi de  $350,75 \pm 0,2$  nm. Já os valores de  $\lambda_{\max}$  para a hDjC20 e para a hDjC20 + CL foram de  $340 \pm 0,3$  nm e  $339,8 \pm 0,3$  nm, respectivamente.

**A**

Fonte: autoria própria.

**B**

### 3. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostram que:

- Apesar das isoformas da Hsp70 compartilharem alta identidade, elas interagem com lipossomas negativamente carregados por mecanismos distintos e ainda pouco elucidados.
- Todas as isoformas da Hsp70 possuem preferência por lipossomas negativamente carregados, em especial POPS e CL.
- A inserção das isoformas da Hsp70 em lipossomas de POPS e CL não provocam alterações nas estruturas secundárias e terciárias locais das proteínas.
- Todas as isoformas da Hsp70 estudadas interagem espontaneamente com lipossomas de POPS, com destaque para a contribuição entrópica que dirige esses processos.
- Quando consideramos lipossomas de CL, HSPA1A, HSPA5 e HSPA8 interagem de modos parecidos, isto é, espontaneamente e dirigidos entropicamente. Para a HSPA9 a interação com CL é endotérmica.
- A hHep1 também interage com lipossomas de POPS e CL. Diferente do que foi visto para as HSPAs, essa interação causa mudanças estruturais em nível secundário e terciário local na hHep1, em especial quando consideramos a interação com o lipossoma de CL. Apesar das mudanças estruturais, a hHep1 mantém-se parcialmente enovelada.
- As interações entre hHep1 e lipossomas de POPS e CL são processos exergônicos dirigidos tanto entropicamente quanto entalpicamente.

- A hHep1 é suscetível à digestão da proteinase K quando inserida nos lipossomas. Essa característica sugere que a interação da hHep1 com os lipossomas de POPS e CL é superficial, diferente das HSPAs que ficam mais inseridas na bicamada lipídica e protegidos da ação proteolítica da proteinase K.
- A presença da hHep1 favorece a incorporação da HSPA9 na bicamada lipídica. O inverso também é observado, sugerindo que a formação do complexo proteico e a presença de outros componentes do ambiente celular podem ser fundamentais no mecanismo de inserção dessas proteínas nas membranas.
- A afinidade da hHep1 pelo íon zinco é alta, exigindo estratégias de retirada diferentes das utilizadas nesse trabalho.
- A hDjC20 é outra co-chaperona da HSPA9 que possui o motivo *zinc finger*. Assim como visto para a hHep1, esse motivo é fundamental para a estabilidade estrutural e bom funcionamento da proteína. O tratamento com EDTA não foi eficaz na retirada do metal, evidenciando que a afinidade da hDjC20 pelo íon zinco também é alta.
- Adicionalmente, estudos de estabilidade química mostram que o íon zinco só é retirado da hDjC20 quando a mesma sofre a ação desnaturante da ureia. Nessa condição, após a ação da ureia, o EDTA consegue quelar o íon, causando um efeito desnaturante adicional.
- Sabendo que a afinidade das co-chaperonas hHep1 e hDjC20 pelo íon zinco é alta, o estudo dessas proteínas na ausência do metal foi inviabilizado. Outras condições experimentais e estratégias de retirada do zinco devem ser empregadas.
- A hDjC20 não interagiu com lipossomas de CL nas condições testadas. Tal observação pode sugerir que a atuação dessa proteína se limita à matriz mitocondrial. Entretanto, uma investigação mais minuciosa se faz necessária.

#### 4. LISTA DE PUBLICAÇÕES

Relação de artigos com participação da aluna elaborados durante o período de realização do seu doutorado (07-2018 até 07-2023):

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; **COTO, A. L. S.**; KIRALY, V. T. R.; BORGES, J. C.; DE MAIO, A. Interaction of HSPA5 (Grp78, BIP) with negatively

charged phospholipid membranes via oligomerization involving the N-terminal end domain. *Cell Stress Chaperones*, 25, n. 6, p. 979-991, 11 2020.

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; **COTO, A. L. S.**; SILVA, N. S. M.; BORGES, J. C.; DE MAIO, A. Human heat shock cognate protein (HSC70/HSPA8) interacts with negatively charged phospholipids by a different mechanism than other HSP70s and brings HSP90 into membranes. *Cell Stress Chaperones*, 26, n. 4, p. 671-684, Jul 2021.

**COTO, A.L.S.**; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, S.D.; DORES-SILVA, P.R.; SILVA, N. S. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; GAVA, L. M.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Zn<sup>2+</sup>-dependent stability of human DjC20/HscB molecular chaperone. *BBA – Protein and Proteomics (submetido em maio/2023)*.

MORITZ, M.N.O.; DORES-SILVA, P.R.; **COTO, A.L.S.**; ARAUJO, H. S.; LEITAO, A.; CAUVI, D.; DE MAIO, A.; CARRA, S.; BORGES, J. C. Human Hsp70-Escort Protein 1 (hHep1) interacts with negative charged lipid bilayers and cell membranes. *Cell Stress & Chaperones (submetido em julho/2023)*.

## 5. REFERÊNCIAS

ABIAN, O.; NEIRA, J. L.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by binding event. **Proteins**, Hoboken, v. 77, n. 3, p. 624-636, 2009.

ANAGLI, J.; ABOUNIT, K.; STEMMER, P.; HAN, Y.; ALLRED, L.; WEINSHEIMER, S.; MOVSISYAN, A.; SEYFRIED, D. Effects of cathepsins B and L inhibition on postischemic protein alterations in the brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Philadelphia, v. 366, n. 1, p. 86-91, 2008.

ANDREW, A. J.; DUTKIEWICZ, R.; KNIESZNER, H.; CRAIG, E. A.; MARSZALEK, J. Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 281, n. 21, p. 14580-14587, 2006.

APRILE, F. A.; DHULESIA, A.; STENGEL, F.; ROODVELDT, C.; BENESCH, J. L.; TORTORA, P.; ROBINSON, C. V.; SALVATELLA, X.; DOBSON, C. M.; CREMADES, N. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the interdomain linker and the substrate-binding domain. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e67961, 2013.

ARISPE, N.; DE MAIO, A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, n. 40, p. 30839-30843, 2000.

ARISPE, N.; DOH, M.; DE MAIO, A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 7, n. 4, p. 330-338, 2002.

ARISPE, N.; DOH, M.; SIMAKOVA, O.; KURGANOV, B. DE MAIO, A. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. **FASEB J.**, Hoboken, v. 18, n. 14, p. 1636-1645, 2004.

ARMIJO, G.; OKERBLUM, J.; CAUVI, D. M.; LOPEZ, V.; SCHLAMADINGER, D.E.; KIM, J.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 877-886, 2014.

ASEA, A.; KRAEFT, S. K.; KURT-JONES, E. A.; STEVENSON, M. A.; SCHLAMADINGER, D. E.; KIM, J.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nat. Med.**, New York, v. 6, n. 4, p. 435-442, 2000.

ASHRAF, G. M.; GREIG, N. H.; KHAN, T. A.; HASSAN, I.; TABREZ, S.; SHAKIL, S.; SHEIKH, I. A.; ZAIDI, S. K.; AKRAM, M.; JABIR, N. R.; FIROZ, C. K.; NAEEM, A.; ALHAZZA, I. M. DAMANHOURI, G. A.; KAMAL, M. A. Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, Oak Park, v. 13, n. 7, p. 1280-1293, 2014.

BAILLY, C.; WARING, M. J. Pharmacological effectors of GRP78 chaperone in cancers. **Biochem. Pharmacol.**, Philadelphia, v. 163, p. 269-278, 2019.

BALOGI, Z.; MULTHOFF, G.; JENSEN, T. K.; LLOYD-EVANS, E.; YAMASHIMA, T.; JÄÄTTELÄ, M.; HARWOOD, J. L.; VÍGH, L. Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v. 74, p. 18-30, 2019.

BATISTA, F. A.; ALMEIDA, G. S.; SERAPHIM, T. V.; SILVA, K. P.; MURTA, S. M.; BARBOSA, L. R.; BORGES, J. C. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **FEBS J.**, Chichester, v. 282, n. 2, p. 388-406, 2015.

BATISTA, F. A.; GAVA, L. M.; PINHEIROS, G. M. S.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. From conformation to interaction: techniques to explore the Hsp70/Hsp90 network. **Curr. Protein Pept. Sci.**, Sharjah, v. 16, n. 8, p. 735-753, 2015.

BENAROUDJ, N.; TRINIOLLES, F.; LADJIMI, M. M. Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, n. 31, p. 18471-18476, 1996.

BILOG, A. D.; SMULDERS, L.; OLIVERIO, R.; LABANIEH, C.; ZAPANTA, J.; STAHELIN, R. V.; NIKOLAIDIS, N. Membrane localization of HspA1A, a stress inducible 70-kDa heat-shock protein, depends on its interaction with intracellular phosphatidylserine. **Biomolecules**, Basel, v. 9, n. 4, 2019.

BITTO, E.; BINGMAN, C. A.; BITTOVA, L.; KONDRASHOV, D. A.; BANNEN, R. M.; FOX, B. G.; MARKLEY, J. L.; PHILLIPS, G. N. JR. Structure of human J-type co-chaperone HscB reveals a tetracysteine metal-binding domain. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 283, n. 44, p. 30184-30192, 2008.

BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 581, n. 15, p. 2802-2810, 2007.

BOOTH, L.; ROBERTS, J. L.; CASH, D. R.; TAVALLAI, S.; JEAN, S.; FIDANZA, A.; CRUZ-LUNA, T.; SIEMBIBA, P.; CYCON, K. A.; CORNELISSEN, C. N.; DENT, P. GRP78/BiP/HSPA5/Dna K is a universal therapeutic target for human disease. **J. Cell. Physiol.**, Hoboken, v. 230, n. 7, p. 1661-1676, 2015.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept. Lett.**, Oak Park, v. 12, n. 3, p. 257-261, 2005.

BORGES, J. C.; SERAPHIM, T. V.; MOKRY, D. Z.; ALMEIDA, F. C.; CYR, D. M.; RAMOS, C. H. Identification of regions involved in substrate binding and dimer stabilization within the central domains of yeast Hsp40 Sis1. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e50927, 2012.

BOZAYKUT, P.; OZER, N. K.; KARADEMIR, B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. **Free Radic. Biol. Med.**, Philadelphia, v. 77, p. 195-209, 2014.

BRANDVOLD, K. R.; MORIMOTO, R. I. The chemical biology of molecular chaperones--implications for modulation of proteostasis. **J. Mol. Biol.**, London, v. 427, n. 18, p. 2931-2947, 2015.

BUKAU, B.; WEISSMAN, J.; HORWICH, A. Molecular chaperones and protein quality control. **Cell**, Cambridge, v. 125, n. 3, p. 443-451, 2006.

BURRI, L.; VASCOTTO, K.; FREDERSDORF, S.; TIEDT, R.; HALL, M. N.; LITHGOW, T. Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 279, n. 48, p. 50243-50249, 2004.

CAPLAN, A. J. What is a co-chaperone? **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 8, n. 2, p. 105-107, 2003.

CASAS, C. GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection. **Front Neurosci.**, Basel, v. 11, p. 177, 2017.

CASONI, F.; BASSO, M.; MASSIGNAN, T.; GIANAZZA, E.; CHERONI, C.; SALMONA, M.; BENDOTTI, C.; BONETTO, V. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 280, n. 16, p. 16295-16304, 2005.

CHAI, Y.; KOPPENHAFFER, S. L.; BONINI, N. M.; PAULSON, H. L. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. **J Neurosci.**, Washington, v. 19, n. 23, p. 10338-10347, 1999.

CHEN, S.; BROWN, I. R. Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress. **J. Neurosci. Res.**, Basel, v. 85, n. 2, p. 402-409, 2007.

CHOUCHANE, L.; BOWERS, F. S.; SAWASDIKOSOL, S.; SIMPSON, R. M.; Kindt, T. J. Heat-shock proteins expressed on the surface of human T cell leukemia virus type I-infected cell lines induce autoantibodies in rabbits. **J. Infect. Dis.** Cary, v. 169, n. 2, p. 253-259, 1994.



COTO, A. L. S.; SERAPHIM, T. V.; BATISTA, F. A. H.; DORES-SILVA, P. R.; BARRANCO, A. B. F.; TEIXEIRA, F. R.; GAVA, L. M.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* SGT co-chaperone indicate that it shares structural features with HIP and can interact with both Hsp90 and Hsp70 with similar affinities. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 118, n. Pt A, p. 693-706, 2018.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein Pept. Lett.**, Oak Park, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2011.

DAHIYA, V.; BUCHNER, J. Functional principles and regulation of molecular chaperones. **Adv. Protein Chem. Struct. Biol.**, San Diego, v. 114, p. 1-60, 2019.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 581, n. 19, p. 3702-3710, 2007.

DE JESUS, J. R.; ARAGÃO, A. Z. B.; ARRUDA, M. A. Z.; RAMOS, C. H. I. Optimization of a methodology for quantification and removal of zinc gives insights into the effect of this metal on the stability and function of the zinc-binding co-chaperone Ydj1. **Front Chem.**, Lausanne, v. 7, p. 416, 2019.

DE MAIO, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock**, Farsta, v. 11, n. 1, p. 1-12, 1999.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 235-249, 2011.

DE MAIO, A. Extracellular Hsp70: export and function. **Curr. Protein Pept. Sci.**, Sharjah, v. 15, n. 3, p. 225-231, 2014.

DE MAIO, A.; HIGHTOWER, L. The interaction of heat shock proteins with cellular membranes: a historical perspective. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 769-783, 2021.

DE MARCO, A.; DEUERLING, E.; MOGK, A.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. **BMC Biotechnol.**, London, v. 7, p. 32, 2007.

DE OLIVEIRA, A. A.; PRIVIERO, F.; TOSTES, R. C.; WEBB, R. C.; NUNES, K. P. Dissecting the interaction between HSP70 and vascular contraction: role of [Formula: see text] handling mechanisms. **Sci Rep.**, London, v. 11, n. 1, p. 1420, 2021.

DEDIEGO, M. L.; NIETO-TORRES, J. L.; JIMÉNEZ-GUARDEÑO, J. M.; REGLA-NAVA, J. A.; ALVAREZ, E.; OLIVEROS, J. C.; ZHAO, J.; FETT, C.; PERLMAN, S.; ENJUANES, L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. **PLoS Pathog.** San Francisco, 7, n. 10, p. e1002315, 2011.

DEMISHTEIN, A.; FRAIBERG, M.; BERKO, D.; TIROSH, B.; ELAZAR, Z.; NAVON, A. SQSTM1/p62-mediated autophagy compensates for loss of proteasome polyubiquitin recruiting capacity. **Autophagy**, Philadelphia, v. 13, n. 10, p. 1697-1708, 2017.

DEOCARIS, C. C.; WIDODO, N.; SHRESTHA, B. G.; KAUR, K.; OHTAKA, M.; YAMASAKI, K.; KAUL, S. C.; WADHWA, R. Mortalin sensitizes human cancer cells to MKT-077-induced senescence. **Cancer Lett.**, E Park, v. 252, n. 2, p. 259-269, 2007.

DOMANICO, S. Z.; DENAGEL, D. C.; DAHLSEID, J. N.; GREEN, J. M.; PIERCE, S. K. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. **Mol. Cell Biol.**, E Park, v. 13, n. 6, p. 3598-3610, 1993.

DORES-SILVA, P. R.; BARBOSA, L. R.; RAMOS, C. H.; BORGES, J. C. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e0117170, 2015.

DORES-SILVA, P. R.; BELOTI, L. L.; MINARI, K.; SILVA, S. M.; BARBOSA, L. R.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein--Hep1-- of *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 79, p. 903-912, 2015.

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; COTO, A. L. S.; KIRALY, V. T. R.; BORGES, J. C.; DE MAIO, A. Interaction of HSPA5 (Grp78, BIP) with negatively charged phospholipid membranes via oligomerization involving the N-terminal end domain. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 979-991, 2020.

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; COTO, A. L. S.; SILVA, N. S. M.; BORGES, J. C.; DE MAIO, A. Human heat shock cognate protein (HSC70/HSPA8) interacts with negatively charged phospholipids by a different mechanism than other

HSP70s and brings HSP90 into membranes. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 671-684, 2021.

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; KIRALY, V. T. R.; BORGES, J. C.; DE MAIO, A. Human HSPA9 (mtHsp70, mortalin) interacts with lipid bilayers containing cardiolipin, a major component of the inner mitochondrial membrane. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.**, Amsterdam, v.1862, n. 11, p. 183436, 2020.

DORES-SILVA, P. R.; KIRALY, V. T. R.; MORITZ, M. N. O.; SERRÃO, V. H. B.; DOS PASSOS, P. M. S.; SPAGNOL, V.; TEIXEIRA, F. R.; GAVA, L. M.; CAUVI, D. M.; RAMOS, C. H. I.; DE MAIO, A.; BORGES, J. C. New insights on human Hsp70-escort protein 1: chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 182, p. 772-784, 2021.

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

ELFIKY, A. A.; BAGHDADY, A. M.; ALI, S. A.; AHMED, M. I. GRP78 targeting: hitting two birds with a stone. **Life Sci.**, Philadelphia, v. 260, p. 118317, 2020.

ENGLISH, C. A.; SHERMAN, W.; MENG, W.; GIERASCH, L. M. The Hsp70 interdomain linker is a dynamic switch that enables allosteric communication between two structured domains. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 292, n. 36, p. 14765-14774, 2017.

FERRARINI, M.; HELTAI, S.; ZOCCHI, M. R.; RUGARLI, C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. **Int. J. Cancer**, Hoboken, v. 51, n. 4, p. 613-619, 1992.

FLACHBARTOVÁ, Z.; KOVACECH, B. Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration. **Acta Virol.**, Lausanne, v. 57, n. 1, p. 3-15, 2013.

FORGET, K. J.; TREMBLAY, G.; ROUCOU, X. p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e69242, 2013.

FÜZÉRY, A. K.; TONELLI, M.; TA, D. T.; CORNILESCU, G.; VICKERY, L. E.; MARKLEY, J. L. Solution structure of the iron-sulfur cluster cochaperone HscB and its binding surface for the iron-sulfur assembly scaffold protein IscU. **Biochemistry**, Washington, v. 47, n. 36, p. 9394-9404, 2008.

GAO, B.; EISENBERG, E.; GREENE, L. Effect of constitutive 70-kDa heat shock protein polymerization on its interaction with protein substrate. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, n. 28, p. 16792-16797, 1996.

GEHRMANN, M.; LIEBISCH, G.; SCHMITZ, G.; ANDERSON, R.; STEINEM, C.; DE MAIO, A.; POCKLEY, G.; MULTHOFF, G. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e1925, 2008.

GONG, H.; YANG, X.; ZHAO, Y.; PETERSEN, R. B.; LIU, X.; LIU, Y.; HUANG, K. Amyloidogenicity of p53: a hidden link between protein misfolding and cancer. **Curr. Protein Pept Sci.**, Sharjah, v. 16, n. 2, p. 135-146, 2015.

GONZALEZ-GRONOW, M.; SELIM, M. A.; PAPALAS, J.; PIZZO, S. V. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. **Antioxid Redox Signal**, New Rochelle, v. 11, n. 9, p. 2299-2306, 2009.

GOSWAMI, A. V.; CHITTOOR, B.; D'SILVA, P. Understanding the functional interplay between mammalian mitochondrial Hsp70 chaperone machine components. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 285, n. 25, p. 19472-19482, 2010.

GREENE, M. K.; MASKOS, K.; LANDRY, S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 95, n. 11, p. 6108-6113, 1998.

GUIDON, P. T.; HIGHTOWER, L. E. Purification and initial characterization of the 71-kilodalton rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 25, n. 11, p. 3231-3239, 1986.

GUPTA, R. S.; SINGH, B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. **Curr. Biol.**, Cambridge, v. 4, n. 12, p. 1104-1114, 1994.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, Washington, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, 2002.

HEUFELDER, A. E.; WENZEL, B. E.; BAHN, R. S. Cell surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retroocular fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Cary, v. 74, n. 4, p. 732-736, 1992.

HOFF, K. G.; SILBERG, J. J.; VICKERY, L. E. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 97, n. 14, p. 7790-7795, 2000.

HORVATH, S. E.; DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 590-614, 2013.

IBRAHIM, I. M.; ABDELMALEK, D. H.; ELSHAHAT, M. E.; ELFIKY, A. A. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. **J. Infect.**, Cary, v. 80, n. 5, p. 554-562, 2020.

IOSEFSON, O.; AZEM, A. Reconstitution of the mitochondrial Hsp70 (mortalin)-p53 interaction using purified proteins--identification of additional interacting regions. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 584, n. 6, p. 1080-1084, 2010.

JIN, H.; KOMITA, M.; AOE, T. The role of BiP retrieval by the KDEL receptor in the early secretory pathway and its effect on protein quality control and neurodegeneration. **Front Mol. Neurosci.**, Lausanne, v. 10, p. 222, 2017.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010.

KANIA, E.; PAJAŁ, B.; ORZECZOWSKI, A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. **Biomed. Res. Int.**, London, p. 352794, 2015.

KAUL, S. C.; DEOCARIS, C. C.; WADHWA, R. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. **Exp. Gerontol.**, Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 263-274, 2007.

KAWAGUCHI, Y.; HAGIWARA, D.; MIYATA, T.; HODAI, Y.; KURIMOTO, J.; TAKAGI, H.; SUGA, H.; KOBAYASHI, T.; SUGIYAMA, M.; ONOUE, T.; ITO, Y.; IWAMA, S.; BANNO, R.; GRINEVICH, V.; ARIMA, H. Endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 knockdown leads to autophagy and cell death of arginine vasopressin neurons in mice. **Sci. Rep.**, London, v. 10, n. 1, p. 19730, 2020.

KIRALY, V. T. R.; DORES-SILVA, P. R.; SERRÃO, V. H. B.; CAUVI, D. M.; DE MAIO, A.; BORGES, J.C. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 146, p. 320-331, 2020.

KIRKEGAARD, T.; ROTH, A. G.; PETERSEN, N. H.; MAHALKA, A. K.; OLSEN, O. D.; MOILANEN, I.; ZYLICZ, A.; KNUDSEN, J.; SANDHOFF, K.; ARENZ, C.; KINNUNEN, P. K.; NYLANDSTED, J.; JÄÄTTELÄ, M. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. **Nature**, London, v. 463, n. 7280, p. 549-553, 2010.

KUBOTA, H.; YAMAMOTO, S.; ITOH, E.; ABE, Y.; NAKAMURA, A.; IZUMI, Y.; OKADA, H.; IIDA, M.; NANJO, H.; ITOH, H.; YAMAMOTO, Y. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 15, n. 6, p. 1003-1011, 2010.

LACKIE, R. E.; MACIEJEWSKI, A.; OSTAPCHENKO, V. G.; MARQUES-LOPES, J.; CHOY, W. Y.; DUENNWALD, M. L.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. **Front Neurosci.**, Basel, v. 11, p. 254, 2017.

LATHANGUE, N. B. A major heat-shock protein defined by a monoclonal antibody. **EMBO J.**, Chichester, v. 3, n. 8, p. 1871-1879, 1984.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, 1988.

LONDONO, C.; OSORIO, C.; GAMA, V.; ALZATE, O. Mortalin, apoptosis, and neurodegeneration. **Biomolecules**, Basel, v. 2, n. 1, p. 143-164, 2012.

LOPEZ, V.; CAUVI, D. M.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. Bacterial Hsp70 (DnaK) and mammalian Hsp70 interact differently with lipid membranes. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 21, n. 4, p. 609-616, 2016.

LU, W. J.; LEE, N. P.; KAUL, S. C.; LAN, F.; POON, R. T.; WADHWA, R.; LUK, J. M. Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. **Cell Death. Differ.**, London, v. 18, n. 6, p. 1046-1056, 2011.

LUO, B.; LEE, A. S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. **Oncogene**, London, v. 32, n. 7, p. 805-818, 2013.

MACAZO, F. C.; WHITE, R. J. Monitoring charge flux to quantify unusual ligand-induced ion channel activity for use in biological nanopore-based sensors. **Anal. Chem.**, Washington, v. 86, n. 11, p. 5519-5525, 2014.

MAHALKA, A. K.; KIRKEGAARD, T.; JUKOLA, L. T.; JÄÄTTELÄ, M.; KINNUNEN, P. K. Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1838, n. 5, p. 1344-1361, 2014.

MAMBULA, S. S.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. **J Immunol.**, Rockville, v. 177, n. 11, p. 7849-7857, 2006.

MAYER, M. P.; BREHMER, D.; GÄSSLER, C. S.; BUKAU, B. Hsp70 chaperone machines. **Adv. Protein Chem.**, San Diego, v. 59, p. 1-44, 2001.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell Mol. Life Sci.**, Cham, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MCCALLISTER, C.; KDEISS, B.; NIKOLAIDIS, N. Biochemical characterization of the interaction between HspA1A and phospholipids. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 41-53, 2016.

MEIMARIDOU, E.; GOOLJAR, S. B.; CHAPPLE, J. P. From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. **J. Mol. Endocrinol.**, Bristol, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2009.

MEYERS, R. M.; BRYAN, J. G.; MCFARLAND, J. M.; WEIR, B. A.; SIZEMORE, A. E.; XU, H.; DHARIA, N. V.; MONTGOMERY, P. G.; COWLEY, G. S.; PANTEL, S.; GOODALE, A.; LEE, Y.; ALI, L. D.; JIANG, G.; LUBONJA, R.; HARRINGTON, W. F.; STRICKLAND, M.; WU, T.; HAWES, D. C. ZHIVICH, V. A.; WYATT, M. R.; KALANI, Z.; CHANG, J. J.; OKAMOTO, M.; STEGMAIER, K.; GOLUB, T. R.; BOEHM, J. S.; VAZQUEZ, F.; ROOT, D. E.; HAHN, W. C.; TSHERNIAK, A. Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells. **Nat. Genet.**, New York, v. 49, n. 12, p. 1779-1784, 2017.

MILARSKI, K. L.; MORIMOTO, R. I. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Washington, v. 83, n. 24, p. 9517-9521, 1986.

MILLS, D. R.; HASKELL, M. D.; CALLANAN, H. M.; FLANAGAN, D. L.; BRILLIANT, K. E.; YANG, D.; HIXSON, D. C. Monoclonal antibody to novel cell surface epitope on Hsc70 promotes morphogenesis of bile ducts in newborn rat liver. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 15, n. 1, p. 39-53, 2010.

MIRZABEKOV, T. A.; LIN, M. C.; KAGAN, B. L. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, n. 4, p. 1988-1992, 1996.

MIZUKAMI, S.; KAJIWARA, C.; ISHIKAWA, H.; KATAYAMA, I.; YUI, K.; UDONO, H. Both CD4+ and CD8+ T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors. **Cancer Sci.**, v. 99, n. 5, p. 1008-1015, 2008.

MIZUKOSHI, E.; SUZUKI, M.; LOUPATOV, A.; URUNO, T.; HAYASHI, H.; MISONO, T.; KAUL, S. C.; WADHWA, R.; IMAMURA, T. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. **Biochem. J.**, Tokio, v. 343 Pt 2, n. Pt 2, p. 461-466, 1999.

MOMOSE, T.; OHSHIMA, C.; MAEDA, M.; ENDO, T. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. **EMBO Rep.**, Chichester, v. 8, n. 7, p. 664-670, 2007.

MORGNER, N.; SCHMIDT, C.; BEILSTEN-EDMANDS, V.; EBONG, I. O.; PATEL, N. A.; CLERICO, E. M.; KIRSCHKE, E.; DATURPALLI, S.; JACKSON, S. E.; AGARD, D.; ROBINSON, C.V. Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90. **Cell Rep.**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 759-769, 2015.

MULTHOFF, G.; BOTZLER, C.; WIESNET, M.; MÜLLER, E.; MEIER, T.; WILMANN, W.; ISSELS, R. D. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. **Int. J. Cancer**, Hoboken, v. 61, n. 2, p. 272-279, 1995.

MURANYI, M.; HE, Q. P.; FONG, K. S.; LI, P. A. Induction of heat shock proteins by hyperglycemic cerebral ischemia. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. 80-87, 2005.

NIMMERVOLL, B.; CHTCHEGLOVA, L. A.; JUHASZ, K.; CREMADES, N.; APRILE, F. A.; SONNLEITNER, A.; HINTERDORFER, P.; VIGH, L.; PREINER, J.; BALOGI, Z. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 589, n. 19 Pt B, p. 2747-2753, 2015.

PARK, Y. J.; YOO, S. A.; KIM, W. U. Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. **J. Korean Med. Sci.**, Seoul, v. 29, n. 1, p. 2-11, 2014.

PIETTE, B. L.; ALERASOOL, N.; LIN, Z. Y.; LACOSTE, J.; LAM, M. H. Y.; QIAN, W. W.; TRAN, S.; LARSEN, B.; CAMPOS, E.; PENG, J.; GINGRAS, A. C.; TAIPALE, M. Comprehensive interactome profiling of the human Hsp70 network



highlights functional differentiation of J domains. **Mol. Cell**, E Park, v. 81, n. 12, p. 2549-2565.e2548, 2021.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**. London, v. 228, n. 2, p. 111-133, 2003.

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016.

RAUSCHERT, N.; BRÄNDLEIN, S.; HOLZINGER, E.; HENSEL, F.; MÜLLER-HERMELINK, H. K.; VOLLMERS, H. P. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. **Lab Invest.**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 375-386, 2008.

REDDY, R. K.; MAO, C.; BAUMEISTER, P.; AUSTIN, R. C.; KAUFMAN, R. J.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278, n. 23, p. 20915-20924, 2003.

REHLING, P.; BRANDNER, K.; PFANNER, N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 5, n. 7, p. 519-530, 2004.

REID, S. P.; SHURTLEFF, A. C.; COSTANTINO, J. A.; TRITSCH, S. R.; RETTERER, C.; SPURGERS, K. B.; BAVARI, S. HSPA5 is an essential host factor for Ebola virus infection. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 109, p. 171-174, 2014.

ROHDE, M.; DAUGAARD, M.; JENSEN, M. H.; HELIN, K.; NYLANDSTED, J.; JÄÄTTELÄ, M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. **Genes Dev.**, Woodbury, v. 19, n. 5, p. 570-582, 2005.

ROJAS, E.; ARISPE, N.; HAIGLER, H. T.; BURNS, A. L.; POLLARD, H. B. Identification of annexins as calcium channels in biological membranes. **Bone Miner.**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 214-218, 1992.

ROSENZWEIG, R.; NILLEGODA, N. B.; MAYER, M. P.; BUKAU, B. The Hsp70 chaperone network. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** London, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.

RÜDIGER, S.; GERMERTH, L.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. **EMBO J.**, Chichester, v. 16, n. 7, p. 1501-1507, 1997.

RÜDIGER, S.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. **EMBO J.**, Chichester, v. 20, n. 5, p. 1042-1050, 2001.

SACHT, G.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIESS, M.; SZTAJER, H.; FLOHÉ, L. ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I. **Biofactors**, Hoboken, v. 9, n. 1, p. 49-60, 1999.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 14, n. 10, p. 630-642, 2013.

SANDOVAL, J. A.; HOELZ, D. J.; WOODRUFF, H. A.; POWELL, R. L.; JAY, C. L.; GROSFELD, J. L.; HICKEY, R. J.; MALKAS, L. H. Novel peptides secreted from human neuroblastoma: useful clinical tools? **J. Pediatr. Surg.**, Philadelphia, v. 41, n. 1, p. 245-251, 2006.

SCHEUFLER, C.; BRINKER, A.; BOURENKOV, G.; PEGORARO, S.; MORODER, L.; BARTUNIK, H.; HARTL, F. U.; MOAREFI, I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, Cambridge, v. 101, n. 2, p. 199-210, 2000.

SCHILKE, B.; WILLIAMS, B.; KNIESZNER, H.; PUKSZTA, S.; D'SILVA, P.; CRAIG, E. A.; MARSZALEK, J. Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. **Curr. Biol.**, Cambridge, v. 16, n. 16, p. 1660-1665, 2006.

SCHILLING, D.; GEHRMANN, M.; STEINEM, C.; DE MAIO, A.; POCKLEY, A. G.; ABEND, M.; MOLLS, M.; MULTHOFF, G. Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. **FASEB J.**, Hoboken, v. 23, n. 8, p. 2467-2477, 2009.

SCHMITT, E.; GEHRMANN, M.; BRUNET, M.; MULTHOFF, G.; GARRIDO, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **J. Leukoc. Biol.**, Oxford, v. 81, n. 1, p. 15-27, 2007.

SHAH, D. D.; SINGH, S. M.; DZIECIATKOWSKA, M.; MALLELA, K. M. G. Biophysical analysis of the effect of chemical modification by 4-oxononenal on the structure, stability, and function of binding immunoglobulin protein (BiP). **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0183975, 2017.

SHATURSKY, O.; HEUCK, A. P.; SHEPARD, L. A.; ROSSJOHN, J.; PARKER, M. W.; JOHNSON, A. E.; TWETEN, R. K. The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. **Cell**, Cambridge, v. 99, n. 3, p. 293-299, 1999.

SHEPARD, L. A.; SHATURSKY, O.; JOHNSON, A. E.; TWETEN, R. K. The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 33, p. 10284-10293, 2000.

SICHTING, M.; MOKRANJAC, D.; AZEM, A.; NEUPERT, W.; HELL, K. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. **EMBO J.**, Chichester, v. 24, n. 5, p. 1046-1056, 2005.

SILBERG, J. J.; TAPLEY, T. L.; HOFF, K. G.; VICKERY, L. E. Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 279, n. 52, p. 53924-53931, 2004.

SILVA, N. S. M.; BERTOLINO-REIS, D. E.; DORES-SILVA, P. R.; ANNETA, F. B.; SERAPHIM, T. V.; BARBOSA, L. R. S.; BORGES, J. C. Structural studies of the Hsp70/Hsp90 organizing protein of plasmodium falciparum and its modulation of Hsp70 and Hsp90 ATPase activities. **Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.**, Amsterdam, v. 1868, n. 1, p. 140282, 2020.

SMITH, H. L.; LI, W.; CHEETHAM, M. E. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, London, v. 40, p. 142-152, 2015.

SOKOL, A. M.; SZTOLSZTENER, M. E.; WASILEWSKI, M.; HEINZ, E.; CHACINSKA, A. Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 588, n. 15, p. 2484-2495, 2014.

STRAVOPODIS, D. J.; MARGARITIS, L. H.; VOUTSINAS, G. E. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. **Curr. Med. Chem.**, Weinheim, v. 14, n. 29, p. 3122-3138, 2007.

SUN, F. C.; WEI, S.; LI, C. W.; CHANG, Y. S.; CHAO, C. C.; LAI, Y. K. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. **Biochem J.**, Tokio, v. 396, n. 1, p. 31-39, 2006.

SUZUKI, C. K.; BONIFACINO, J. S.; LIN, A. Y.; DAVIS, M. M.; KLAUSNER, R. D. Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. **J. Cell Biol.**, New York, v. 114, n. 2, p. 189-205, 1991.

SZABO, A.; LANGER, T.; SCHRODER, H.; FLANAGAN, J.; BUKAU, B.; HARTL, F.U. The Atp hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia-Coli Hsp70 System - Dnak, Dnaj, and Grpe. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 91, n. 22, p. 10345-10349, 1994.

TAIRA, T.; NARITA, T.; IGUCHI-ARIGA, S. M.; ARIGA, H. A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. **Nucleic Acids Res.**, Washington, v. 25, n. 10, p. 1975-1983, 1997.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. **Protein Pept. Lett.**, Oak Park, v. 18, n. 2, p. 101-109, 2011.

TSAI, Y. L.; HA, D. P.; ZHAO, H.; CARLOS, A. J.; WEI, S.; PUN, T. K.; WU, K.; ZANDI, E.; KELLY, K.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- $\beta$  signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 115, n. 18, p. E4245-E4254, 2018.

TSAI, Y. L.; ZHANG, Y.; TSENG, C. C.; STANCIAUSKAS, R.; PINAUD, F.; LEE, A. S. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 290, n. 13, p. 8049-8064, 2015.

TSENG, C. C.; ZHANG, P.; LEE, A. S. The COOH-terminal proline-rich region of GRP78 is a key regulator of its cell surface expression and viability of tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Neoplasia**, Philadelphia, v. 21, n. 8, p. 837-848, 2019.

URUSHITANI, M.; KURISU, J.; TATENNO, M.; HATAKEYAMA, S.; NAKAYAMA, K.; KATO, S.; TAKAHASHI, R. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. **J. Neurochem.**, Chichester, v. 90, n. 1, p. 231-244, 2004.

VAN DER LAAN, M.; HUTU, D. P.; REHLING, P. On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1803, n. 6, p. 732-739, 2010.

VEGA, V. L.; RODRÍGUEZ-SILVA, M.; FREY, T.; GEHRMANN, M.; DIAZ, J. C.; STEINEM, C.; MULTHOFF, G.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. **J Immunol.**, Rockville, v. 180, n. 6, p. 4299-4307, 2008.

VELAZQUEZ, J. M.; DIDOMENICO, B. J.; LINDQUIST, S. Intracellular localization of heat shock proteins in Drosophila. **Cell**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 679-689, 1980.

VELAZQUEZ, J. M.; LINDQUIST, S. Hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. **Cell**, Cambridge, v. 36, n. 3, p. 655-662, 1984.

VICKERY, L. E.; CUPP-VICKERY, J. R. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, Abingdon, v. 42, n. 2, p. 95-111, 2007.

VOSTAKOLAEI, M. A.; HATAMI-BAROOGH, L.; BABAEI, G.; MOLAVI, O.; KORDI, S.; ABDOLALIZADEH, J. Hsp70 in cancer: a double agent in the battle between survival and death. **J. Cell Physiol.**, Hoboken, v. 236, n. 5, p. 3420-3444, 2021.

VU, M. T.; ZHAI, P.; LEE, J.; GUERRA, C.; LIU, S.; GUSTIN, M.C.; SILBERG, J.J. The DNLZ/HEP zinc-binding subdomain is critical for regulation of the mitochondrial chaperone HSPA9. **Protein Sci.**, Hoboken, v. 21, n. 2, p. 258-267, 2012.

WADHWA, R.; KAUL, S. C.; IKAWA, Y.; SUGIMOTO, Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 9, p. 6615-6621, 1993.

WADHWA, R.; KAUL, S. C.; MITSUI, Y.; SUGIMOTO, Y. Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, Waltham, v. 207, n. 2, p. 442-448, 1993.

WADHWA, R.; TAKANO, S.; KAUR, K.; DEOCARIS, C. C.; PEREIRA-SMITH, O. M.; REDDEL, R. R.; KAUL, S. C. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, Hoboken, v.118, n. 12, p. 2973-2980, 2006.

WANG, J.; LEE, J.; LIEM, D.; PING, P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. **Gene**, Amsterdam, v. 618, p. 14-23, 2017.

WANG, X.; VENABLE, J.; LAPOINTE, P.; HUTT, D. M.; KOULOV, A. V.; COPPINGER, J.; GURKAN, C.; KELLNER, W.; MATTESON, J.; PLUTNER, H.; RIORDAN, J. R.; KELLY, J. W.; YATES, J. R.; BALCH, W. E. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 4, p. 803-815, 2006.

WARREN, J. R.; GORDON, J. A. On the refractive indices of aqueous solutions of urea. **J. Phys. Chem.**, Washington, v. 70, p. 297-300, 1966.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. **Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 151, p. 1-44, 2004.

WELCH, W. J.; SUHAN, J. P. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. **J. Cell Biol.**, New York, v. 103, n. 5, p. 2035-2052, 1986.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1376, n. 3, p. 339-352, 1998.

WIENER, M. C.; WHITE, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. **Biophys. J.**, St. Louis, v. 61, n. 2, p. 434-447, 1992.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K.; LADOKHIN, A. S.; SILVESTRO, L.; AXELSEN, P. H.; WHITE, S. H. Folding of beta-sheet membrane proteins: a hydrophobic hexapeptide model. **J. Mol. Biol.**, London, v. 277, n. 5, p. 1091-1110, 1998.

YAMAMOTO, H.; MOMOSE, T.; YATSUKAWA, Y.; OHSHIMA, C.; ISHIKAWA, D.; SATO, T.; TAMURA, Y.; OHWA, Y.; ENDO, T. Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. **FEBS Lett.**, Oxford, v. 579, n. 2, p. 507-511, 2005.

YANG, H.; ZHOU, X.; LIU, X.; YANG, L.; CHEN, Q.; ZHAO, D.; ZUO, J.; LIU, W. Mitochondrial dysfunction induced by knockdown of mortalin is rescued by Parkin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Philadelphia, v. 410, n. 1, p. 114-120, 2011.

YEUNG, T.; GILBERT, G. E.; SHI, J.; SILVIUS, J.; KAPUS, A.; GRINSTEIN, S. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. **Science**, Washington, v. 319, n. 5860, p. 210-213, 2008.

ZHAI, P.; STANWORTH, C.; LIU, S.; SILBERG, J. J. The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 283, n. 38, p. 26098-26106, 2008.

ZHANG, Y.; TSENG, C. C.; TSAI, Y. L.; FU, X.; SCHIFF, R.; LEE, A. S. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocalization of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80071, 2013.

ZHU, X.; ZHAO, X.; BURKHOLDER, W. F.; GRAGEROV, A.; OGATA, C. M.; GOTTESMAN, M. E.; HENDRICKSON, W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, Washington, v. 272, n. 5268, p. 1606-1614, 1996.

ZINSER, E.; SPERKA-GOTTLIEB, C. D.; FASCH, E. V.; KOHLWEIN, S. D.; PALTAUF, F.; DAUM, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol.**, Washington, v. 173, n. 6, p. 2026-2034, 1991.

ŻWIROWSKI, S.; KŁOSOWSKA, A.; OBUCHOWSKI, I.; NILLEGODA, N. B.; PIRÓG, A.; ZIĘTKIEWICZ, S.; BUKAU, B.; MOGK, A.; LIBEREK, K. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. **EMBO J.**, Chichester, v. 36, n. 6, p. 783-796, 2017.