

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química de São Carlos

**Carlos Sabino de Oliveira**

**Estudo estrutural-funcional do NBD (*Nucleotide Binding Domain*) e do PBD (*Peptide Binding Domain*) da proteína  
HspA1A**

São Carlos

2022

Carlos Sabino de Oliveira

**Estudo estrutural-funcional do NBD (*Nucleotide Binding Domain*) e do PBD (*Peptide Binding Domain*) da proteína HspA1A**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), da Universidade de São Paulo (USP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica.

**Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges**

São Carlos

2022

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:** Carlos Sabino de Oliveira

**Data:**02/08/2022

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

Oliveira, Carlos Sabino de

Estudo estrutural-funcional do NBD (Nucleotide Binding Domain) e do PBD (Peptide Binding Domain) da proteína HspA1A / Carlos Sabino de Oliveira. — São Carlos, 2022.

69 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

1. Chaperonas moleculares. 2. Hsp70. 3. HspA1A. 4. NBD. 5. PBD. I. Título.

*Wilneide do Carmo Marchi Maiorano - CRB: 3978/8*



## AGRADECIMENTOS

A **Deus e Nossa Senhora Aparecida**, por terem me dado à permissão de chegar até aqui, por toda a força concedida na concretização dessa etapa, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais, **Cleuza e Benedito**, minhas bases, por tanto amor, por tudo o que sou, por terem me proporcionado educação e amor pelos estudos, por sempre acreditarem em minha capacidade e, apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

Aos meus **tios, tias, primos e primas** pelo apoio, pela “propaganda” positiva a meu respeito e pela força.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Borges**, agradeço, primeiramente, por ter me aceitado, sem, ao menos, me conhecer, e por ter acreditado em mim desde sempre. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Tenho orgulho em dizer que fui seu orientando.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Ao **Instituto de Química de São Carlos (IQSC)** e à **Universidade de São Paulo (USP)**, por toda a estrutura e suporte acadêmico fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao **Dr. Paulo Roberto Dores-Silva** por adquirir e trazer os plasmídeos para a produção das proteínas recombinantes estudadas.

As amigas que fiz em São Carlos (e que vou levar para a vida toda), especialmente à **Noeli, Amanda Coto, Marcos, Élio, Felipe** pelas conversas, risadas, companheirismo, conselhos e amparos. Vocês foram essenciais durante esses anos e com certeza tornaram meus dias mais alegres. Obrigado por tudo.

À “Querida” da minha vida **Caroline Leite**, por ser a flor do meu jardim, pelo apoio incondicional e pela amizade verdadeira.

Aos amigos de longa data **de Matão, Araraquara e da G. E.** pela amizade, por sempre estarem juntos, mesmo que não nos vendo sempre, me apoiando e ajudando nas minhas decisões.

Aos **integrantes do Grupo BBP** meu muito obrigado por todo o apoio, sempre estarem à disposição, comentários pertinentes e me incentivando a acreditar que tudo daria certo.

A **todos** que com ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram direta ou indiretamente neste projeto. Meus sinceros agradecimentos.

*“Rápido como um cervo. Silencioso como uma sombra. O medo corta mais fundo do que espadas.”*

George R. R. Martin

## RESUMO

Dentre a classe das chaperonas moleculares, existe uma superfamília denominada como proteínas de choque térmico ou, do inglês, *Heat Shock Proteins* (Hsps) que são demasiadamente expressas nas células, sob condição normais e de estresse e atuam na proteostase celular. A família das Hsp70, proteínas de 70 kDa, apresentam cerca de 40-60% de identidade na sequência de aminoácidos e são proteínas monoméricas, altamente conservadas, ubíquas e ATP-dependentes. Dentre os diferentes membros pertencentes à família das Hsp70 humanas (HspA), a isoforma HspA1A citossólica, é uma importante constituinte da rede celular das chaperonas moleculares e provedoras de folding dentro das células. Estruturalmente, as Hsp70 são proteínas compostas por dois domínios, o domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*), localizado na região N-terminal, responsável pela atividade ATPásica intrínseca, e o domínio de ligação ao peptídeo (PBD, do inglês *Peptide Binding Domain*), presente na região C-terminal e responsável pela interação com sequências de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na proteína-cliente. A investigação da função, dinâmica, estrutura e estabilidade do PBD e NBD individualizados da HspA1A, pode auxiliar na elucidação do papel dessa no desenvolvimento de algumas patologias degenerativas e cânceres. Desta forma, o presente trabalho consistiu em avaliar algumas propriedades estruturais e funcionais dos domínios da HspA1A individuais. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas recombinantes referentes às construções HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD foram produzidas em sua forma enovelada, com conteúdo de estrutura secundária, e se comportam, respectivamente, como monômero e mistura de oligômero em solução. As proteínas apresentaram estabilidade térmica diferentes, sendo o PBD parcialmente reversível e o NBD irreversível. O NBD apresenta maior estabilidade térmica na presença dos nucleotídeos adenosina. A estabilidade química, para ambos, apresentou duas transições, de forma que para o PBD, foi característico de desenovelamento cooperativo e, para o NBD, parcialmente cooperativo. O NBD e canônica (sob as mesmas condições) apresentaram atividade ATPásica baixa e similar, de forma que a afinidade da HspA1A pelo ATP foi maior do que a do domínio. Em suma, os resultados obtidos enriquecem as informações à cerca das características individuais dos domínios e suas influências na canônica HspA1A, complementando o conhecimento à cerca dessas.

**Palavras-chave:** Chaperonas moleculares, Hsp70, HspA, HspA1A, Domínios, NBD, PBD.

## ABSTRACT

Among the class of molecular chaperones, there is a superfamily called heat shock proteins or, in English, Heat Shock Proteins (Hsps) that are overexpressed in cells, under normal and stress conditions, and act on cellular proteostasis. The Hsp70 family, 70 kDa proteins, show about 40-60% amino acid sequence identity and are monomeric, highly conserved, ubiquitous and ATP-dependent proteins. Among the different members belonging to the human Hsp70 (HspA) family, the cytosolic HspA1A isoform is an important constituent of the cellular network of molecular chaperones and providers of folding within cells. Structurally, Hsp70 are proteins composed of two domains, the Nucleotide Binding Domain (NBD), located in the N-terminal region, responsible for ATPase activity, and the Peptide Binding Domain (PBD), present in the C-terminal region and responsible for the interaction with sequences of hydrophobic amino acid residues in the client protein. The investigation of the function, dynamics, structure and stability of PBD and NBD individualized from HspA1A, may help to elucidate its role in the development of some degenerative pathologies and cancers. Therefore, the present work consisted of evaluating some structural and functional properties of individual HspA1A domains. The results obtained showed that the recombinant proteins referring to the HspA1A\_NBD and HspA1A\_PBD constructs were produced in their folded form, with secondary structure content, and behave, respectively, as monomer and oligomer mixture in solution. The proteins showed different thermal stability, PBD being partially reversible and NBD irreversible. NBD has greater thermal stability in the presence of adenosine nucleotides. The chemical stability, for both, presented two transitions, so that for the PDB, it was characteristic of cooperative unfolding and, for the NBD, partially cooperative. NBD and canonical (under the same conditions) showed low and similar ATPase activity, so that the affinity of HspA1A for ATP was greater than that of the domain. In short, the results obtained enrich the information about the individual characteristics of the domains and their influences on the canonical HspA1A, complementing the knowledge about these.

**Keywords:** Molecular chaperones, Hsp70, HspA, HspA1A, Domains, NBD, PBD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da estrutura atômica da Hsp70 de Escherichia coli, com ênfase nos domínios PBD e NBD .....	4
<b>Figura 2.</b> O ciclo alostérico das Hsp70 acoplado a ligação dos nucleotídeos adenosina e a hidrólise do ATP aos processos de ligação e liberação de substrato.....	5
<b>Figura 3.</b> Desenho esquemático comparativo das regiões presentes nas HspA .....	22
<b>Figura 4.</b> Alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos NBDs de HspA.....	23
<b>Figura 5.</b> Alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos PBDs de HspA .....	24
<b>Figura 6.</b> Monitoramento das etapas de expressão e purificação das proteínas HspA1A_NBD e HspA1A_PBD recombinantes por SDS-PAGE.....	27
<b>Figura 7.</b> Caracterização da estrutura secundária das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD por espectropolarimetria de CD.....	28
<b>Figura 8.</b> Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano para as proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD, realizados na presença e ausência de GndHCl e, a última, também na presença e ausência ATP e ADP e íons $Mg^{2+}$ .....	31
<b>Figura 9.</b> Localização dos resíduos de triptofano presentes nas proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD .....	32
<b>Figura 10.</b> Caracterização da estrutura terciária da proteína HspA1A_NBD por espectropolarimetria de CD na região do UV-Próximo .....	34
<b>Figura 11.</b> Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC) das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD.....	35
<b>Figura 12.</b> Curvas de desenovelamento térmico das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD monitoradas por $CD_{222nm}$ .....	38
<b>Figura 13.</b> Termogramas das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD monitoradas por DSC .....	39
<b>Figura 14.</b> Estabilidade química das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD monitoradas por $CD_{222nm}$ e emissão de fluorescência intrínseca do triptofano.....	42
<b>Figura 15.</b> Curvas de Atividade Enzimática da proteína humana HspA1A e seu NBD sob as mesmas condições experimentais.....	44



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Proteínas da família das Hsp70 humanas e seus respectivos nomes alternativos, localizações celulares, quantidade de aminoácidos, genes e se são induzíveis por estresse ou não .....	7
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas dos NBD e PBD da HspA1A .....	11
<b>Tabela 3.</b> Identificação das soluções-tampões a serem utilizadas nos procedimentos experimentais.....	12
<b>Tabela 4.</b> Identidade e Similaridade percentual entre os NBD e PBD e as versões completas das HspA. ....	25
<b>Tabela 5.</b> Conteúdo de estrutura secundária das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD na presença e ausência de nucleotídeos adenosina e íons $Mg^{2+}$ .....	29
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros espectroscópicos de fluorescência intrínseca do triptofano obtidos para as proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD.....	33
<b>Tabela 7.</b> Propriedades hidrodinâmicas das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD obtidas por aSEC.....	36
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros de estabilidade térmica das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD .....	40
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros de estabilidade química das proteínas HspA1A_PBD e HspA1A_NBD .....	43
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros Cinéticos obtidos da atividade ATPásica das proteínas HspA1A_NBD, HspA1A (pH = 8,0) e outras proteínas da família das Hsp70, inclusive, a canônica HspA1A em outras condições experimentais .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$ : alfa;

Å: angstrom;

$\beta$ : beta;

$\Delta$ : delta;

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar;

$\gamma$ : gama;

$\lambda$ : comprimento de onda;

$\lambda_{\max}$ : comprimento de onda máximo;

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

[ $\Theta$ ]: elipticidade molar residual;

$\Sigma$ : somatório;

%: porcentagem;

$\mu\text{L}$ : microlitros ( $10^{-6}$  litros);

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ : micromolar ( $10^{-6}$  molar);

**3D**: tridimensional;

**A**: absorvância;

**aa**: aminoácido;

**ADP**: adenosina difosfato;

**aSEC**: do inglês, *analytical Size Exclusion Chromatography*;

**ATP**: adenosina trifosfato;

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

**BSA**: do inglês, *Bovine Serum Albumin*;

**C**: concentração molar;

**CD**: do inglês, *Circular Dichroism*;

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

**cm**: centímetro;

**C<sub>m</sub>**: concentração de transição do ponto médio;

**C<sub>p</sub>**: capacidade térmica;

**DNA**: do inglês, *Deoxyribonucleic acid*;

**D.O.:** densidade óptica;

**DSC:** do inglês, *Differential scanning calorimetry*;

**EDTA:** do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*;

***E. coli:*** *Escherichia coli*;

***f/f*<sub>0</sub>:** razão friccional;

**Fes1:** do inglês, *Factor exchange for SSA1 protein*;

**F<sub>i</sub>:** intensidade de Fluorescência;

**FTN:** fator de troca de nucleotídeo;

**GdnHCl:** hidrócloridrato de guanidina;

**GrpE:** do inglês, *groP-like gene E*;

**His-tag:** cauda de polihistidina;

**Hsp:** do inglês, *heat shock protein*;

**HspA:** do inglês, *heat shock protein family human A*;

**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*;

**IPTG:** do inglês, *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*;

**ITC:** do inglês, *Isothermal Titration calorimetry*;

**k<sub>av</sub>:** coeficiente de partição;

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

**kDa:** quilodalton;

**K<sub>m</sub>:** constante de Michaelis-Menten;

**l:** caminho óptico;

**LB:** do inglês, *lysogeny broth*;

**min:** minutos;

**mL:** mililitro (10<sup>-3</sup> litros);

**mm:** milímetro (10<sup>-3</sup> metro)

**mmol.L<sup>-1</sup>:** milimolar (10<sup>-3</sup> molar);

**MM**: massa molecular;

**MM<sub>app</sub>**: massa molecular aparente;

**M**: molar;

**n**: número de resíduos de aminoácidos;

**NBD**: do inglês, *Nucleotide Binding Domain*;

**NCBI**: do inglês, *National Center for Biotechnology Information*;

**nm**: nanômetro;

**ηM**: nanomolar;

**°C**: graus Celsius;

**PBD**: do inglês, *Peptide Binding Domain*;

**PDB**: do inglês, *protein data bank*;

**Pi**: fosfato inorgânico;

**pI**: ponto isoelétrico;

**pH**: potencial hidrogeniônico;

**PQC**: do inglês, *Protein quality control*;

**rpm**: rotação por minuto;

**R<sub>s</sub>**: raio de Stokes;

**seg**: segundos;

**SDS**: do inglês, *Dodecyl sulfate sodium*;

**SDS-PAGE**: do inglês, *Dodecyl sulfate sodium PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*;

**T<sub>m</sub>**: temperatura média de desenovelamento;

**Tris-HCl**: tris-hidrocloro;

**Trp**: triptofano

**U**: unidade;

**UV**: ultravioleta;

**V<sub>0</sub>**: volume da fase móvel;

**V**: volume;

**v<sub>bar</sub>**: volume parcial específico;

**V<sub>e</sub>**: volume de eluição;

**V<sub>max</sub>**: velocidade máxima;

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CHAPERONAS MOLECULARES .....	2
1.2 A FAMÍLIA DAS HSP70 .....	3
1.3 ESTRUTURA DAS HSP70: OS NBD E PBD .....	4
1.4 AS HSP70 HUMANAS .....	6
1.5 HSPA1A.....	8
1.6 PROBLEMATIZAÇÃO.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3. METODOLOGIA E ANÁLISE.....</b>	<b>11</b>
3.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO NBD E PBD DE HSP70 HUMANAS.....	11
3.2 SOLUÇÕES-TAMPÃO .....	12
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO NBD E PBD DA HSPA1A RECOMBINANTES .....	12
3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NBD E PBD DA HSPA1A RECOMBINANTES .....	14
3.5 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA .....	15
3.5.1 ESPECTROPOLARIMETRIA DE DICROÍSMO CIRCULAR .....	15
3.5.2 FLUORESCÊNCIA INTRÍSECA DO TRIPTOFANO.....	16
3.5.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO ANALÍTICA .....	17
3.5.4 DESENOVELAMENTO TÉRMICO .....	18
3.5.5 DESENOVELAMENTO QUÍMICO .....	19
3.5.6 ATIVIDADE ATPÁSICA .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
4.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DOS NBD E PBD DE HSP70 HUMANAS.....	22
4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO NBD E PBD DA HSPA1A .....	26
4.3 ESPECTROPOLARIMETRIA DE CD DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA.....	30
4.4.1 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO.....	30
4.4.2 UV-PRÓXIMO DA PROTEÍNA HspA1A_NBD RECOMBINANTE .....	33
4.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO ANALÍTICA.....	35
4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DAS PROTEÍNAS.....	37
4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DAS PROTEÍNAS .....	41
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA DO NBD EM COMPARAÇÃO A CANÔNICA.....	44
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Proteínas (oriunda da palavra grega *protos* que significa “a primeira” ou “a mais importante”) são as macromoléculas biológicas mais abundantes nas células vivas e que apresentam uma diversidade de funções, dentre elas, o transporte de oxigênio, componente estrutural, constituição de membranas, defesa do organismo e catálise reacional (NELSON, D. L., COX, M. M., 2006). São compostas por um mesmo conjunto de 20 aminoácidos (aa), em diversas combinações, por meio das ligações peptídicas. As estruturas proteicas são classificadas segundo o grau de organização tridimensional que os aa, da cadeia polipeptídica, adquirem, sendo a estrutura primária, correspondente à ordem sequencial das ligação entre os aa; a estrutura secundária, que diz respeito a organização espacial local que a cadeia polipeptídica obtêm; a estrutura terciária, característica de interações não-locais, culminando na organização tridimensional das cadeias laterais e a estrutura quaternária, que engloba o arranjo espacial que as subunidades adquirem (NELSON, D. L., COX, M. M., 2006; KUHLMAN, B., BRADLEY, P., 2019).

As funções biológicas desempenhadas pelas proteínas estão intrinsicamente relacionadas à sua estrutura tridimensional característica (estrutura nativa), ou seja, o estado termodinamicamente mais estável, adotada após o enovelamento proteico, portanto, o correto enovelamento é de extrema importância para a fisiologia celular (SMITH, H. L., LI, W., CHEETHAM, M. E., 2015; HETZ, C., ZHANG, K., KAUFMAN, R. J., 2020).

O processo de enovelamento proteico, envolve diversos fatores como energia livre, força iônica do meio, pH, presença de pontes de dissulfeto, entre outros (ANFINSEN *et al.*, 1955; NELSON D. L., COX, M. M., 2002), e decorrer de forma espontânea ou auxiliado de proteínas, estas, denominadas chaperonas moleculares (SERAPHIM *et al.*, 2015; CHAPLOT, K., JARVELA, T. S., LINDBERG, I., 2020; HUAFENG, X., 2022). Em situações de estresse, como elevadas temperaturas, privação de nutrientes e presença de metais pesados, o processo de enovelamento não ocorre corretamente, acarretando, às proteínas, a obtenção de conformações estruturais que se distanciam de sua estrutura nativa, tal como: agregados proteicos (SCHAFFERT, L. N., CARTER, W. G., 2020; MATHIEU, C., PAPPU, R. V., TAYLOR, J. P., 2020; HUAFENG, X., 2022).

Os agregados proteicos podem precipitar ou se depositar, tanto *in vitro* como *in vivo*, representando um perigo para a homeostase celular, devido ao caráter tóxico que apresenta ao ambiente em que se encontram (CHAUDHURI, T. K., PAUL, S., 2006; SCHAFFERT, L. N.,

CARTER, W. G., 2020), desta forma, sua formação pode estar relacionada a algumas doenças humanas, tais como, Doença de Alzheimer, Fibrose Cística, cânceres, Parkinson e Huntington, entre outras (FORGET, K. J., TREMBLAY, G., ROUCOU, X., 2013; MATHIEU, C., PAPPU, R. V., TAYLOR, J. P., 2020; WU, S., DU, L., 2020; STOTT, S. R., WYSE, R. K., BRUNDIN, P., 2020; MACARIO, A. J. L., DE MACARIO, E. C., 2021). Neste sentido, impedir a formação de agregados proteicos ou reverter sua agregação, é primordial para regular os processos de síntese e enovelamento, e, conseqüentemente uma boa estratégia na busca da prevenção para as citadas patologias (PENG, C., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. Y., 2020; KELLY, J. W., 2021; NATARAJAN *et al.*, 2022).

## 1.1 CHAPERONAS MOLECULARES

Como forma de auxílio nos processos do enovelamento proteico, os sistemas biológicos desenvolveram um mecanismo de Controle de Qualidade Proteico (PQC, do inglês *Protein Quality Control*) foi constituído por chaperonas moleculares (LUCAS *et al.*, 2011; TIROLI-CEPEDA, A. O., RAMOS, C. H. I., 2011; NATARAJAN *et al.*, 2022). Esta maquinaria desempenha papel fundamental na manutenção da proteostase (homeostase proteica) evitando o mal enovelamento e a agregação (SMITH, H. L., LI, W., CHEETHAM, M. E., 2015; BALCHIN, D., HAYER-HARTL, M., HARTL, F. U., 2020). Além disso, o supracitado controle de qualidade se faz essencial, visto que, o acúmulo proteico de moléculas não enoveladas de maneira profícua, no ambiente celular, acarreta diversas doenças degenerativas, como a Alzheimer e Parkinson (SCHAFFERT, L. N., CARTER, W. G., 2020; STOTT, S. R., WYSE, R. K., BRUNDIN, P., 2020; CHAPLOT, K., JARVELA, T. S., LINDBERG, I., 2020; MACARIO, A. J. L., DE MACARIO, E. C., 2021). Adicionalmente, as chaperonas moleculares podem atuar dissolvendo agregados, proporcionando uma nova oportunidade para um enovelamento eficiente de proteínas ou encaminhando-as para proteólise (BUCHNER, J., 1996; WALTER, S., BUCHNER, J., 2002; RADONS, J., 2016) e na translocação e transporte de proteínas para compartimentos celulares (BARDWELL *et al.*, 2022).

As proteínas de choque térmico ou, do inglês, *Heat Shock Proteins* (Hsps) são altamente expressas em células sob condições de estresse térmico conformacional, porém, também são expressas constitutivamente pelos sistemas de expressão celular em condições de não-stress (WANG *et al.*, 2006; SAIBIL, H., 2013), tornando-as essenciais para a preservação e subsistência celular, de forma que, nessas condições, inúmeros processos do metabolismo celular podem não ocorrer (BUCHNER, J., 2019).

Essa classe de proteínas apresenta a capacidade de ação de supervisionar, interagir, estabilizar e auxiliar o enovelamento de proteínas sintetizadas (SCHOPF, F. H., BIELBL, M. M., BUCHNER, J., 2017; TITTELMEIER, J., NACHMAN, E., NUSSBAUM-KRAMMER, C., 2020). São proteínas ubíquas, ou seja, estão presentes em todos os compartimentos celulares e organismos que contenham moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (RADONS, J., 2016; BUCHNER, J., 2019).

As Hsps, de acordo com as massas moleculares, identidade sequencial de aminoácidos e função, estão classificadas em 6 grandes famílias: as Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e *Small Hsps*. Além das características já descritas, as chaperonas são altamente conservadas e estão envolvidas no reconhecimento e ligação a superfícies hidrofóbicas de proteínas levemente ou completamente desenoveladas (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2005; TIROLI-CEPEDA, A. O., RAMOS, C. H. I., 2011; BATISTA *et al.*, 2015; BARDWELL *et al.*, 2022).

## **1.2 A FAMÍLIA DAS HSP70**

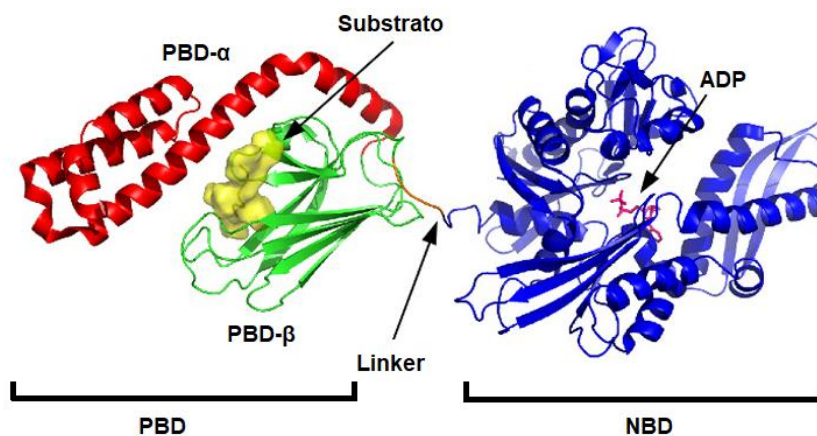
As Hsp70 são chaperonas que exibem massa molecular de aproximadamente 70 kDa, possuindo cerca de 40-60% de identidade entre seus membros eucariotos e procariotos, portanto, altamente conservadas entre si, ATP-dependentes e uma família de proteínas abundantes (KARLIN, S., BROCCHERI, L., 1998; DA SILVA, K. P., BORGES, J. C., 2011). Diversos processos fisiológicos são mediados pela ação das Hsp70, tais como, o enovelamento de novas proteínas, transporte de proteínas para organelas, tráfego celular, estabilização de fatores de transcrição celular, regulação de metabólicos em todos os processos da homeostase celular, a prevenção da agregação proteica, recuperação/desagregação de proteínas de agregados, marcação de proteínas para degradação, entre outros (SHARMA, D., MASISON, D. C., 2009; DORES-SILVA *et al.*, 2013; RADONS, J., 2016; TIROLI-CEPEDA *et al.*, 2019). A função dessas macromoléculas deve-se, principalmente, à capacidade de atuarem como pivô favorecendo assim a ligação a proteínas-cliente que estejam desenoveladas, mal enoveladas, enoveladas parcialmente ou incorretamente e encaminhando-as para os respectivos processos especializados (DA SILVA, K. P., BORGES, J. C., 2011; BATISTA *et al.*, 2015; RADONS, J., 2016; VOSTAKOLAEI *et al.*, 2020).



### 1.3 ESTRUTURA DAS HSP70: OS NBD E PBD

Estruturalmente, as Hsp70 são proteínas monoméricas e flexíveis, compostas por dois domínios: um domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*), localizado na região N-Terminal, constituído de aproximadamente 45 kDa, sendo composto por dois subdomínios que possuem estruturas secundárias  $\alpha$ -hélices. Estas estruturas, se ligam ao nucleotídeo ATP e o hidrolisa em ADP e Pi, logo, é responsável pela atividade ATPásica intrínseca. O outro domínio é o de ligação ao peptídeo (PBD, do inglês *Peptide Binding Domain*), na região C-Terminal, de aproximadamente 25 kDa, composto também por dois subdomínios, o PBD- $\beta$  e o PBD- $\alpha$ , respectivamente, mais rígido e o outro mais flexível. O primeiro consiste em oito fitas- $\beta$  organizadas em duas folhas- $\beta$  e contém uma cavidade de ligação à proteína-cliente com uma fenda hidrofóbica central, esta, responsável pela interação com motivos compostos por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na proteína-cliente. Já o segundo é um subdomínio totalmente  $\alpha$ -helicoidal que cobre a fenda de ligação da proteína-cliente como uma “tampa” (ZHU *et al.*, 1996; SHONHAI, A., BOSHOFF, A., BLATCH, G. L., 2007; SHARMA, D., MASISON, D. C., 2009; SERAPHIM, T. V., RAMOS, C. H. I., BORGES, J. C., 2014; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). Esses domínios são conectados por um interdomínio flexível denominado *linker*, que apresenta importante papel na comunicação alostérica entre eles (ENGLISH *et al.*, 2017; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020) (Figura 1).

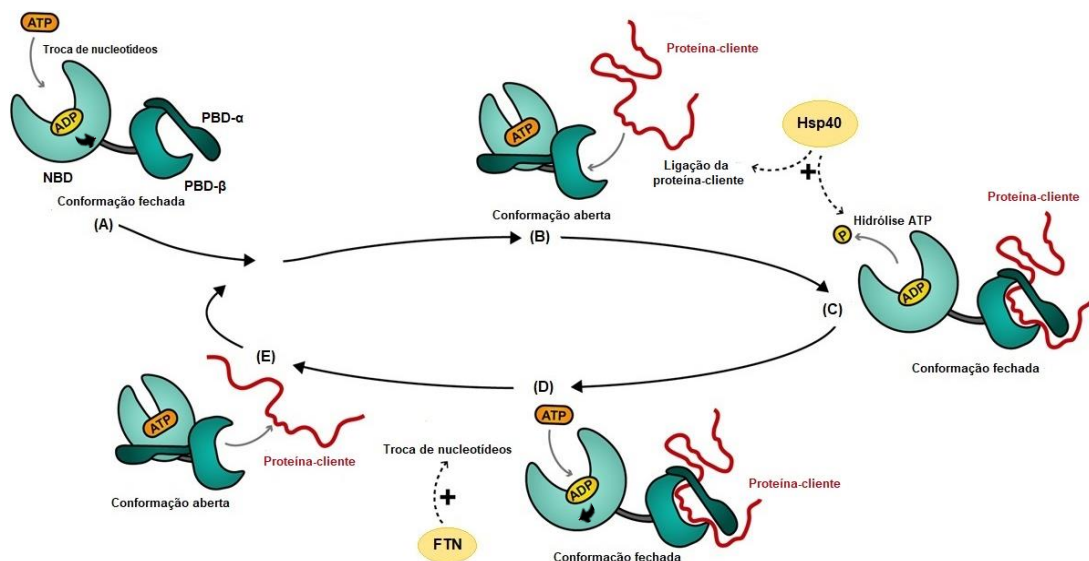
**Figura 1. Representação esquemática da estrutura atômica da Hsp70 de *Escherichia coli*, com ênfase nos domínios PBD e NBD.** Estruturalmente, as Hsp70 são compostas por dois domínios: o Domínio de Ligação ao Nucleotídeo (NBD), localizado na região N-Terminal, responsável pela atividade ATPásica. O outro domínio é o Domínio de Ligação ao Peptídeo (PBD), composto também por dois subdomínios, o PBD- $\beta$  e o PBD- $\alpha$ , presente na região C-Terminal, contendo o sítio de ligação à proteína-cliente. Esses domínios são conectados por um interdomínio flexível denominado linker. O NBD se apresenta no estado ADP-ligado, logo, a proteína está em conformação aberta. (PDB:2KHO).



Fonte: Adaptado de ENGLISH *et al.*, 2017.

A capacidade de associação e dissociação à proteínas-cliente, depende de um mecanismo alostérico, de forma que a atividade do NBD controla o acoplamento e a liberação da proteína-cliente no PBD (KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). Desta forma, a Hsp70 apresenta um ciclo funcional guiado por sua ligação a proteínas clientes e aos nucleotídeos adenosina ATP e ADP (MULTHOFF, G., SHEVTSOV, M., HUILE, G., 2017). Além dos nucleotídeos adenosina, direcionando o ciclo funcional das Hsp70, estas funcionam, em cooperação, com as denominadas co-chaperonas, que atuam no direcionando à ligação específica das chaperonas às proteínas-cliente (RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E., 2014; TIROLI-CEPEDA *et al.*, 2019). As co-chaperonas das Hsp70 atuam de diferentes formas, como a Hsp40, que auxilia na catálise da hidrólise de ATP. As Hsp110, GrpE, Bag1 e Fes1, também denominadas como fatores de troca de nucleotídeos (FTN), atuam na estabilização do estado ligado das Hsp70 ao ADP. Já as co-chaperonas HOP, SGT e CHIP, funcionam como “pontes” para a conexão da Hsp70 com a chaperona Hsp90, entre outras (RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E., 2014; MAYER, M. P., GIERASCH, L. M., 2019; BALCHIN, D., HAYER-HARTL, M., HARTL, F. U., 2020; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). A Figura 2 representa o ciclo funcional alostérico das Hsp70.

**Figura 2. O ciclo alostérico das Hsp70 acoplado a ligação dos nucleotídeos adenosina e a hidrólise do ATP aos processos de ligação e liberação de substrato.** O NBD e PBD se apresentam como domínios isolados, logo, sem contato e intermediados pela região do linker (A). O ciclo alostérico das Hsp70 é regulado pela presença dos nucleotídeos adenosina ATP e ADP no NBD, de forma que, a ligação ao nucleotídeo ADP induz um rearranjo conformacional proteico (B). Ocorre a ligação da proteína cliente ao PBD e a hidrólise do ATP em ADP e Pi pelo NBD (C). A tampa do PBD-  $\alpha$  se fecha sobre a proteína cliente resultando no aumento da afinidade da chaperona por sua proteína desenovelada (D). Mediante ao estímulo de co-chaperonas que atuam como FTN, é desencadeada a abertura do PBD e a liberação da proteína-cliente e o ciclo da chaperona se reinicia (E).



Fonte: Adaptado de KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020.

Na conformação ligada ao ADP apresentada na Figura 2 (A), o NBD e o PBD se apresentam desacoplados, logo, sem contato e unidos pelo *linker*. O PBD se encontra em uma conformação fechada, de forma que a tampa do PBD- $\alpha$  está sobre o PBD- $\beta$ . Isso resulta em uma alta afinidade por peptídeos e proteínas-cliente e baixas taxas de troca de proteínas clientes, que culminariam na liberação desses.

A ligação do nucleotídeo ADP ao NBD induz um rearranjo conformacional (Figura 2 (B)), de forma o PBD- $\alpha$  se dissocia do subdomínio PBD- $\beta$ , e ambos os domínios e o *linker* se acoplam ao NBD. Esse rearranjo deixa o NBD em uma conformação inadequada para a hidrólise de ATP, enquanto o PBD adota uma conformação aberta com altas taxas de troca de substrato com baixa afinidade por esses.

Após a ligação da proteína-cliente ao PBD (Figura 2 (C)), o PBD- $\beta$  e a tampa do PBD- $\alpha$  são liberados do NBD, novamente adotando uma conformação fechada. Ocorre então a hidrólise do ATP em ADP e Pi pelo NBD com o auxílio das Hsp40 (RADONS, J., 2016). Após tal hidrólise, a Hsp70 assume uma conformação fechada de forma que o PBD- $\alpha$  se fecha sobre a proteína-cliente resultando no aumento da afinidade da chaperona por essa, facilitando o enovelamento e impedindo sua dissociação (Figura 2 (D)).

Finalmente, mediante ao estímulo de co-chaperonas que atuam como FTN (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., VALPUESTA, J. M., 2018), é desencadeada uma série de eventos conformacionais que culminam na abertura do PBD e na liberação da proteína-cliente (Figura 2 (E)) que estava mobilizada pela tampa do PBD- $\alpha$  e o ciclo da chaperona pode recomeçar (KOHLENER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). Nesse mecanismo funcional, a afinidade aparente para proteínas-cliente em diversas ordens de magnitude e permite que as Hsp70 evitem, de forma eficiente, a agregação (MAYER, M. P., 2013; BALCHIN, D., HAYER-HARTL, M., HARTL, F. U., 2020).

#### 1.4 AS HSP70 HUMANAS

A família das Hsp70 humanas (*Homo sapiens*) é composta por 13 isoformas gênicas, (Tabela 1), dos quais diferem entre si pela sequência de aminoácidos, grau de expressão e localização sub-celular, indicando funcionalidades divergentes, porém com funções pleonásticas (DAUGAARD, M., ROHDE, M., JÄÄTTELÄ, M., 2007; KAMPINGA, H. H., CRAIG, E. A., 2010; RADONS, J., 2016; VOSTAKOLAEI *et al.*, 2020). As Hsp70 humanas apresentam alto grau de conservação sequencial nos resíduos de aminoácidos e na constituição, de modo geral, de seus domínios estruturais, no caso, o NBD e PBD (KOHLENER, V.,

ANDRÉASSON, C., 2020). As Hsp70 humanas podem seguir a padronização de HspA como adoção de nomenclatura sistemática (KAMPINGA *et al.*, 2008).

**Tabela 1. Proteínas da família das Hsp70 humanas e seus respectivos nomes alternativos, localizações celulares, quantidade de aminoácidos, genes e se são induzíveis por estresse ou não.**

Proteína	Nomes Alternativos	Localização Celular	Tamanho (Aminoácidos)	Gene	Induzível por estresse
<b>HspA1A</b>	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	Citosol, núcleo, membrana celular, exossomos extracelulares	641	HSPA1A	Sim
<b>HspA1B</b>	Hsp70-2, Hsp70-1B	Citosol, núcleo, exossomos extracelulares	641	HSPA1B	Sim
<b>HspA1L</b>	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	Citosol, núcleo	641	HSPA1L	Não
<b>HspA2</b>	Heat shock 70kD protein 2, Hsp70.2	Citosol, núcleo, membrana celular, exossomos extracelulares	639	HSPA2	Não
<b>HspA5</b>	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	Retículo Endoplasmático, Exossomos extracelulares	654	HSPA5	Não
<b>HspA6</b>	Hsp70-6, Hsp70B'	Citosol, exossomos extracelulares	643	HSPA6	Sim
<b>HspA7</b>	Hsp70-7, Hsp70B	Micropartículas sanguíneas, exossomos extracelulares	367	HSPA7	Sim
<b>HspA8</b>	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	Citosol, núcleo, membrana celular, exossomos extracelulares	646	HSPA8	Não
<b>HspA9</b>	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalina	Mitocôndria, Retículo Endoplasmático, citosol	679	HSPA9	Não
<b>HspA12A</b>	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	Intracelular, exossomos extracelulares	675	HSPA12	Não
<b>HspA12B</b>	Hsp70-12B	Células Endoteliais, intracelular, plasma sanguíneo	685	HSPA12B	Não
<b>HspA13</b>	Hsp70-13	Retículo Endoplasmático, exossomos extracelulares, microsossomos	471	HSPA13	Não
<b>HspA14</b>	Hsp70-14, Hsp70L1	Citosol, membrana celular	509	HSPA14	Sim

Fonte: Adaptado de RADONS, J., 2016.

Dentre as 13 isoformas, citadas na Tabela 1, as 4 homólogas mais comumente estudadas são a HspA1A, principal proteína citosólica, a HspA5, presente principalmente no retículo

endoplasmático, apresentando importante função na progressão tumoral de células cancerígenas, a HspA8, que desempenha importante papel na manutenção celular e a HspA9, geralmente mitocondrial, diretamente envolvida em vários processos celulares, tais como senescência e morte celular programada (SÕTI *et al.*, 2005; BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; WALERYCH *et al.*, 2009; RADONS, J., 2016; ALBAKOVA *et al.*, 2020). Logo, as Hsp70 humanas compõem uma família proteica essencial para a viabilidade celular de vários organismos, portando funções que apresentam grande interesse biotecnológico e farmacêutico (DE MARCO *et al.*, 2007; ŻWIROWSKI *et al.*, 2017; ALBAKOVA *et al.*, 2020).

### 1.5 HSPA1A

Dentre os diferentes membros pertencentes à família das Hsp70 humanas, uma das isoformas mais comumente estudada é a HspA1A (DAUGAARD, M., ROHDE, M., JÄÄTTELÄ, M., 2007; RADONS, J., 2016). Esta atua como um importante constituinte da rede celular das chaperonas moleculares e provedoras de *foldin* dentro das células (KIM *et al.*, 2015), além de corresponder a principal proteína citosólica estudada com importante papel em doenças neurodegenerativas, bem como alta expressão sob condições de estresse térmico (SÕTI *et al.*, 2005; BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; KASIOUMI *et al.*, 2019; SULZBACHER *et al.*, 2020; NONG *et al.*, 2022; SMULDERS *et al.*, 2022).

A superexpressão da HspA1A está correlacionada com o mau prognóstico e a resistência à quimioterapia (TUKAJ, S., 2020; SAPOZHNIKOV *et al.*, 2020; SMULDERS *et al.*, 2022). Adicionalmente, a HspA1A também já foi relatada na inibição da agregação da amilina ou IAPP, associada a diabetes melito tipo 2, reduzindo a resistência à insulina e melhorando os parâmetros clínicos (NARGESI *et al.*, 2016; ROSAS *et al.*, 2016) e no aumento da degradação da proteína TAU, relatado em estudo provavelmente pelo Sistema Ubiquitina Proteassoma e/ou por autofagia, na Doença de Alzheimer (SHAO *et al.*, 2021).

A investigação da função, dinâmica, estrutura e estabilidade do PBD e NBD individualizados da HspA1A, pode auxiliar na elucidação do papel dessa no desenvolvimento de algumas patologias degenerativas e cânceres (FORGET, K. J., TREMBLAY, G., ROUCOU, X., 2013; SMITH, H. L., LI, W., CHEETHAM, M. E., 2015; ALBAKOVA *et al.*, 2020). A ação das Hsp70s está diretamente relacionada a diferença de conformação (aberta e fechada) entre os domínios e a dinâmica e características específicas de cada um deles (KOHLE, V., ANDRÉASSON, C., 2020).

## 1.6 PROBLEMATIZAÇÃO

Logo, no presente estudo, propõe-se realizar a caracterização dos supracitados domínios e evidenciar suas características estruturais, hidrodinâmicas e funcionais. Os resultados obtidos podem apresentar grande importância científica, visto que, a natureza dinâmica da Hsp70 é um parâmetro-chave em sua função de chaperona e os mecanismos e características individuais dos domínios contribuem para essas ações (ANGELIDIS, C. E., LAZARIDIS, I., PAGOULATOS, G. N., 1999; MAYER, M. P., 2013; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020; ALBAKOVA *et al.*, 2020). Ou seja, a investigação da função, dinâmica, estrutura e estabilidade do NBD e PBD individualizados da HspA1A, podem auxiliar na elucidação do papel dessa proteína no desenvolvimento de algumas patologias degenerativas e cânceres.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho de mestrado consistiu avaliar algumas propriedades estruturais e funcionais do NBD e PBD da proteína HspA1A, evidenciando suas características estruturais, hidrodinâmicas e de estabilidade, individuais, em relação à canônica.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A. Identificação e análise comparativa da sequência de aminoácidos dos domínios proteicos de Hsp70 humanas;
- B. Produção e purificação das construções proteicas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD recombinantes;
- C. Caracterização biofísica, em solução e individualizada, das proteínas recombinantes quanto a:
  - i. Avaliação do conteúdo de estrutura secundária;
  - ii. Avaliação da estrutura terciária local;
  - iii. Determinação do estado oligomérico e parâmetros hidrodinâmicos dos domínios da HspA1A;
  - iv. Caracterização da estabilidade térmica e química das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD;
  - v. Análise da atividade ATPásica da HspA1A\_NBD e da canônica nas mesmas condições experimentais.

### 3. METODOLOGIA E ANÁLISE

#### 3.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO NBD E PBD DE HSP70 HUMANAS

O alinhamento global das sequências de aminoácidos do NBD e PBD das proteínas homólogas humanas HspA9, HspA5, HspA1A e HspA8, foram realizados por meio das sequências completas referentes a essas, mediante a identificação à partir do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), NCBI Gene Bank ID, HspA9: NP\_004125.3, HspA5: NP\_005338.1, HspA1A : NP\_005337.2 e HspA8: NP\_006588.1, através do *Software Clustal Omega* (Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS *et. al*, 2011; SIEVERS, F., HIGGINS, D. G., 2018). As porcentagens de identidade sequenciais, entre os domínios das proteínas humanas homólogas dispostas, foram calculadas utilizando o *Software Emboss Needle* (Disponível em: [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) (ANDRADE *et. al*, 2014). Alguns parâmetros físico-químicos (Tabela 2) dos NBD e PBD da proteína HspA1A, foram obtidos por meio da sequência de aminoácidos dessas, confirmadas após o sequenciamento, utilizando o *Software Protparam* (Disponível em: <http://web.expasy.org/protparam/>) (GARG *et. al*, 2016).

**Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos NBD e PBD da HspA1A.** Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácidos pelo Software Protparam.

Proteínas	$\epsilon_{280nm}$ ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) Edelhoc <sup>b</sup>	MM (kDa)	pI teórico	Nº de Resíduos de AA	F / Y / W <sup>#</sup>
HspA1A_NBD*	18490	43,7	7,48	407	19 / 10 / 1
HspA1A_PBD*	12090	30,2	5,57	274	6 / 5 / 1

\* Propriedades previstas pela sequência de aminoácidos das proteínas com a His-tag (20 aa  $\cong$  2,2 kDa), inserida pelo vetor de expressão pET28a;

<sup>#</sup> Referente ao número de resíduos de Fenilalanina (F), Tirosina (Y) e o Triptofano (W).

**Fonte:** Autoria própria.



### 3.2 SOLUÇÕES-TAMPÃO

As soluções-tampões a serem utilizadas para a obtenção e caracterização das proteínas recombinantes correspondentes às construções HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD foram identificadas e organizadas em composição e propósito de uso na Tabela 3.

**Tabela 3. Identificação das soluções-tampões a serem utilizadas nos procedimentos experimentais.**

<b>Solução-Tampão</b>	<b>Composição</b>	<b>Propósito de Uso</b>
<b>A</b>	Tris-HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), KCl 100 mmol.L <sup>-1</sup>	Lise bacteriana
<b>B</b>	Tri-HCl 20 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), NaCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> , Imidazol 20 mmol.L <sup>-1</sup>	Lavagem da coluna na cromatografia de afinidade
<b>C</b>	Tri-HCl 20 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), NaCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> , Imidazol 500 mmol.L <sup>-1</sup>	Eluição das proteínas na cromatografia de afinidade
<b>D</b>	Tris-HCl 25 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), NaCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mmol.L <sup>-1</sup> , KCl 5 mmol.L <sup>-1</sup> , β-mercaptoetanol 2 mmol.L <sup>-1</sup>	Cromatografia preparativa de exclusão por tamanho e ensaios para caracterização biofísica
<b>E</b>	Tris-HCl 25 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), NaCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mmol.L <sup>-1</sup> , KCl 5 mmol.L <sup>-1</sup>	Ensaio de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)
<b>F</b>	Tris-HCl 25 mmol.L <sup>-1</sup> (pH = 8,0), NaCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> , KCl 5 mmol.L <sup>-1</sup> , β-mercaptoetanol 2 mmol.L <sup>-1</sup>	Ensaio de Atividade ATPásica

**Fonte:** Autoria própria.

### 3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES RECOMBINANTES NBD E PBD DA HSPA1A

Os domínios da HspA1A recombinantes foram produzidos e purificados de acordo com o protocolo, este otimizado, utilizado para a canônica HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006).

Em resumo, os vetores pET28::HspA1A\_NBD e pET28::HspA1A\_PBD, adquiridos comercialmente junto à empresa estadunidense *Epoch LifeSciences*, foram utilizados para produzir as respectivas construções proteicas em *Escherichia coli*, cepa de BL21(DE3), via transformação. Uma colônia das células transformadas foi pré-inoculada em 50 mL de meio de

cultura *Lysogeny Broth* (LB) (10 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 10 g.L<sup>-1</sup> Peptona e 5 g.L<sup>-1</sup> de Extrato de Levedura, pH = 7,0) contendo 5 µg.mL<sup>-1</sup> do antibiótico canamicina, e incubada à 37 °C, 200 rpm por 16-18 horas. Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído considerando 5% (v/v) em 500 mL de meio LB, contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina, e incubado à 37 °C, 200 rpm, até o crescimento bacteriano atingir a Densidade Óptica entre 0,6 a 0,8 nm (DO<sub>600nm</sub> ≈ 0,6-0,8). A indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada a partir da adição de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> de isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG) e a temperatura de incubação foi reduzida para 30 °C, 200 rpm por 6h. Ao fim do período de indução, as células foram colhidas por centrifugação (13600 x g, 4 °C, 20 min) e posteriormente ressuspensas em Tampão A, com adição de 0,01 mgmL<sup>-1</sup> de Lisozima (Sigma) e 5 unidades de DNase (Sigma) e incubadas por 30 min em banho de gelo. A lise mecânica, também em banho de gelo, foi realizada por meio de sonicação utilizando um sonicador *Ultrasonic Homogeneizador Sonicator Celular Processor Disruptor Mixer 900* (amplitude de 30% com pulsos de 6s e intervalos de 1min) para obtenção do lisado celular. Este, foi centrifugado (43200 x g, 4 °C, 40 min) e o sobrenadante filtrado utilizando uma membrana hidrofílica de 0,45 µm de *cutoff* de 47 mm de diâmetro (Durapore).

A purificação das proteínas ocorreu em duas etapas. Na primeira, foi empregada a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, visto que, o DNA codante se encontra clonado no vetor pET28a, que permite a expressão de um peptídeo de fusão de poli histidina, localizado na extremidade N-terminal da proteína recombinante (SKERRA, A., PFITZINGER, I., PLUCKTHUN, A., 1991). Este passo foi realizado por meio de uma coluna *HiTrap Chelating HP 5mL* (GE Healthcare LifeSciences), imobilizada com íons Ni<sup>2+</sup>, equilibrada em Tampão B. A proteína foi eluída utilizando-se Tampão C.

Na segunda etapa de purificação, foi realizada uma cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, de forma que, a solução proteica foi aplicada em uma coluna cromatográfica constituída por uma resina polimérica, desta forma, as proteínas migram pelos poros e a eluição ocorre de acordo com o tamanho destas (BARTH, H. G., JACKSON, C., BOYES, B. E., 1994). Foi utilizada uma coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 Prep Grade* (GE Healthcare LifeSciences), acoplada ao equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences) e a um banho térmico de circulação, equilibrada em Tampão D. Todo o processo foi realizado com controle de temperatura (4 °C).

A eficácia e o grau de pureza das amostras proteica obtidas foram determinadas por meio de análises eletroforéticas em condições desnaturantes por meio de SDS-PAGE, técnica esta fundamentada na força do campo elétrico que influencia diretamente na velocidade e no

deslocamento da molécula por esse campo. O SDS é um detergente característico pela ligação numa razão constante, de maneira que todos os polipeptídios presentes permaneçam com a mesma proporção carga/massa, de forma que a separação pelo campo elétrico ocorra apenas por suas massas moleculares (LAEMMLI, U. K., 1970). O gel de poliacrilamida 12%, foi utilizado para a proteína de massa 43,7 kDa, no caso, a HspA1A\_NBD, conforme descrito por Laemmli (1970), e o gel Tris-Tricina 12% para a proteína HspA1A\_PBD (30,2 kDa), visto que proteínas de menores massas moleculares são mais facilmente separadas em géis com a alteração nos agentes tamponantes (SCHÄGGER, H., 2006). As proteínas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R (Sigma).

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DO NBD E PBD DA HSPA1A RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes foram quantificadas por espectroscopia de absorção molecular usando um Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, visto que, proteínas apresentam absorção na região de 280 nm devido a presença de resíduos de triptofano (W) (ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J., 1998). As proteínas foram diluídas 5 vezes em solução de Cloridrato de Guanidina 7,5 mol.L<sup>-1</sup> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> (pH = 6,5), e incubadas durante 30 min antes da leitura, em temperatura ambiente (EDELHOCH, H., 1967; PACE *et. al.*, 1995). A condição desnaturante foi utilizada visando a exposição dos resíduos de W do cerne hidrofóbico na presença de β-mercaptoetanol a fim de reduzir as ligações entre resíduos de cistina da proteína, eliminando as interferências na absorção de luz (NOBLE, J. E, 2014).

Os espectros de absorbância das proteínas foram coletados entre comprimentos de onda de 320 a 250 nm e a lei de Beer-Lambert (Equação 1) foi empregada para cálculo da concentração molar.

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

Na equação acima,  $A$  é a absorbância em unidades arbitrárias,  $C$  é a concentração molar (mol.L<sup>-1</sup>),  $l$  é o caminho óptico da cubeta em centímetros, e  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar em mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>, previamente obtido conforme apresentado na Tabela 2.

## 3.5 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA

### 3.5.1 ESPECTROPOLARIMETRIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

Nos experimentos de dicroísmo circular (CD), a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita incidem sobre a amostra e a medida a diferença de absorção em decorrência da presença de cromóforos quirais é mensurada, resultando em uma luz elipticamente polarizada e seu ângulo ( $\Theta$ ). Desta forma, torna-se possível o monitoramento da composição estrutural secundária da proteína, informações sobre a estrutura terciária e a avaliação da estabilidade proteica (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005; CORREA, D. H. A., RAMOS, C. H. I., 2009).

Os ensaios de CD foram realizados utilizando um espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.) acoplado a um sistema peltier (PFD 425S) para controle da temperatura. Foi avaliado o conteúdo de estrutura secundária das proteínas em sua forma apo e na presença de nucleotídeos adenosina ADP e ATP ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) para a HspA1A\_NBD. Na presença dos nucleotídeos, a proteína foi previamente incubada por 1h, em temperatura ambiente. As proteínas foram preparadas em concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , as diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 0,1 cm. O branco dos ensaios foi o tampão E, este, na ausência e presença dos nucleotídeos ATP e ADP e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$ .

Nos experimentos de CD, na região do UV-próximo (260 – 320 nm), foi avaliada a estrutura terciária local das proteínas, em sua forma apo, na presença de nucleotídeos adenosina ADP e ATP ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) para a HspA1A\_NBD, e em condições desnaturantes, na presença de  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  de GndHCl. Na presença dos nucleotídeos e do agente desnaturante, as proteínas foram previamente incubadas por 1 h em temperatura ambiente. As proteínas foram preparadas em concentração de  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , visto que, concentrações maiores se fazem necessárias para a melhor visualização das ligações duplas conjugadas entre os aminoácidos aromáticos submetidas à um ambiente quiral (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005). As diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 1 cm. O branco dos ensaios foi o tampão D, este, na ausência e presença nucleotídeos ATP e ADP e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$ , e também, na presença e na ausência de  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  de GndHCl.

Para as análises, os dados de CD foram normalizados para elipticidade molar residual ( $[\theta]_{\text{EMR}}$ ) (CORREA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I., 2009) e segundo a Equação 2:

$$[\theta]_{EMR} = \frac{\theta(\lambda)}{10 \cdot [c] \cdot l \cdot nR} \quad \text{Equação 2}$$

de forma que,  $\theta(\lambda)$  é o sinal de CD em elipicidade,  $nR$  é o número de resíduos de aminoácidos da proteína,  $l$  é o caminho óptico da cubeta em cm, e  $[c]$  é a concentração da proteína em mol.L<sup>-1</sup>.

Posteriormente, foi realizada a deconvolução dos espectros normalizados para  $[\theta]_{EMR}$  por meio do *Software CDNN Deconvolution* (Disponível em: <http://gerald-boehm.de/download/cdnn>), como via de estimar a porcentagem relativa do conteúdo de estruturas secundárias presente nas proteínas recombinantes, no caso, para a HspA1A\_NBD, também na presença dos nucleotídeos adenosina e do cofator Mg<sup>2+</sup>, e avaliar a estrutura terciária local, na forma apo e em condições desnaturantes (BÖHM, G., MUHR, R., JAENICKE, R., 1992; CORREA, D. H. A., RAMOS, C. H. I., 2009).

Foi utilizado o *Software 2StrucCompare* (Disponível em: <https://2struccompare.cryst.bbk.ac.uk/index.php>), como via de validar a porcentagem relativa do conteúdo de estruturas secundárias presente nas proteínas a partir dos PDB depositados para o PBD e NBD da HspA1A, respectivamente, PDB ID: 4PO2 e 1S3X.

### 3.5.2 FLUORESCÊNCIA INTRÍSECA DO TRIPTOFANO

Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência, os resíduos de W foram utilizados, para monitoramento, como sondas intrínsecas, visto que, apresentam diferentes características de fluorescência conforme a polaridade do ambiente em que estão localizados na proteína. Quando o resíduo de W se encontra no cerne hidrofóbico da proteína enovelada, ou seja, não exposto ao solvente, a emissão de fluorescência ocorrerá em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) menores. Porém, quando se encontra na superfície proteica, em um ambiente polar, o resíduo emitirá fluorescência em  $\lambda$  maiores. A adição de agentes desnaturantes, como Cloridrato de Guanidina (GndHCl), resulta na exposição dos resíduos de aminoácidos ao solvente polar, fluorescendo em  $\lambda$  maiores (EFTINK, M. R., 1994; LAKOWICS, J. R., 2006).

Os espectros de fluorescência foram coletados de 310 a 420 nm, com intervalos de 1 em 1 nm, empregando o  $\lambda$  de excitação 295 nm, região de excitação apenas do resíduo de W (MISRA, P. P., KISHORE, N., 2011). O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi) acoplado a um banho térmico para controle de temperatura. Foi avaliada a estrutura terciária local das proteínas, por meio do ambiente em que o resíduo de W

se encontra, em sua forma apo e na presença de nucleotídeos adenosina ADP e ATP (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$  (2  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) para a HspA1A\_NBD. A fim de avaliar o comportamento das proteínas recombinantes em condições desnaturantes, os ensaios também foram conduzidos na presença de 6  $\text{mol.L}^{-1}$  de GndHCl. Na presença do agente desnaturante e dos nucleotídeos, as proteínas foram previamente incubadas por 1h antes das análises espectroscópicas, em temperatura ambiente. As proteínas foram preparadas em concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , as diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 0,5 cm. O branco dos ensaios é o tampão E, este, na ausência e presença de GndHCl e dos nucleotídeos ATP e ADP e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$ . A partir dos dados obtidos, foram calculados o centro de massa espectral ( $\langle \lambda \rangle$ ) e o  $\lambda$  máximo de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{max}}$ ) (LAKOWICS, J. R., 2006; BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006), conforme a Equação 3:

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

de forma que,  $\lambda_i$  são os respectivos comprimentos de onda medidos e  $F_i$  são as intensidades de fluorescência de  $\lambda_i$

### 3.5.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO ANALÍTICA

A cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC, do inglês *analytical Size Exclusion Chromatography*) é uma técnica que realiza a separação das proteínas de acordo com seu tamanho molecular, de forma que a migração pelos poros da resina polimérica e o posterior volume de eluição da coluna são diretamente influenciados de acordo com o tamanho da proteína (BURGESS, R. R., 2018). Esta foi realizada a fim de determinar as propriedades hidrodinâmicas e o possível estado oligomérico das proteínas recombinantes. Os ensaios foram conduzidos em coluna uma *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare Lifesciences), acoplada ao o equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences) e equilibrada previamente com tampão D (Tabela 3). Os volumes de eluição foram monitorados por absorvância a 280 nm.

As construções proteicas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD foram injetadas individualmente em concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Foi empregada, como padrão, uma mistura de proteínas padrão monoméricas e globulares na concentração de, aproximadamente, 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ , de massa molecular (MM) e Raio de Stokes ( $R_s$ ) conhecidos, visando abranger toda a faixa de resolução cromatográfica da coluna utilizada. As proteínas padrão utilizadas foram: Apoferritina (480 kDa e  $R_s = 67,1 \text{ \AA}$ ),  $\gamma$ -Globulina (160 kDa e  $R_s = 48 \text{ \AA}$ ), BSA (67 kDa e  $R_s =$

36 Å), Anidrase Carbônica (30 kDa e  $R_s = 24$  Å) e Citocromo c (12,3 kDa e  $R_s = 14$  Å), todas as proteínas adquiridas na Sigma. O volume morto ( $V_0$ ) da coluna foi determinado utilizando-se *blue dextran* 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma). Os respectivos volumes de eluição das proteínas supracitadas, juntamente com o volume de eluição das proteínas padrão e do *blue dextran*, foram utilizados para os cálculos dos respectivos coeficientes de partição ( $K_{av}$ ), segundo a Equação 4 (IRVINE, G. B., 2001):

$$K_{av} = \frac{(V_t - V_e)}{(V_t - V_0)} \quad \text{Equação 4}$$

de forma que,  $V_t$  é o volume total da coluna,  $V_e$  é o volume de eluição de cada proteína e  $V_0$  é o volume morto da coluna, todos em mL. A determinação da massa molecular aparente ( $MM_{app}$ ) é resultante do gráfico  $K_{av}$  versus  $\log(MM_{app})$  e o valor de  $R_s$  é determinado a partir do gráfico  $R_s$  versus  $-\log K_{av}^{1/2}$ , obtido através da equação da reta e dos coeficientes angular e linear resultantes do ajuste linear das proteínas padrão, realizado pelo *Software OriginLab* (Disponível em: <https://www.originlab.com/>). A razão friccional ( $f/f_0$ ) das proteínas pode ser determinada por meio da Equação 5 (IRVINE, G. B., 2001), utilizando o raio de Stokes teórico ( $R_0$ ) obtido pelo *Software Sedenterp*:

$$\frac{f}{f_0} = \frac{R_s}{R_0} \quad \text{Equação 5.}$$

### 3.5.4 DESENOVELAMENTO TÉRMICO

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados objetivando a compreensão da estrutura e organização dos domínios, individualmente. O calor estimula o aumento da entropia vibracional da estrutura proteica, favorecendo a quebra das ligações não covalentes que estabilizam a estrutura 3D da proteína, provocando a desnaturação (FONSECA *et. al.*, 2006).

Foram realizados experimentos de desenovelamento térmico monitorados por CD a fim de avaliar a estabilidade térmica das proteínas. Os ensaios, sob monitoramento em 222 nm ( $CD_{222nm}$ ), realizaram-se no intuito de observar e compreender as transições conformacionais sofridas pelas proteínas recombinantes seguindo o conteúdo de suas estruturas secundárias (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005). Logo, foram realizados utilizando o equipamento descrito no Item 3.5.1 dos Materiais e Métodos. Desta forma, as proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD foram submetidas a desnaturação térmica monitorada por CD, de 15 °C a 90 °C (ida) e de 90 °C a 15 °C (volta), a fim de avaliar a possível reversibilidade

frente ao processo de desnaturação. A taxa de aquecimento utilizada foi de 1 °C/min e o sinal de CD, em 222 nm, foi monitorado a cada 0,5 °C. As proteínas foram preparadas em concentração de 5 µmol.L<sup>-1</sup>, as diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 0,1 cm. Para as análises, os dados de CD foram normalizados para  $[\theta]_{EMR}$  conforme descrito no Item 3.5.1 dos Materiais e Métodos. Os dados obtidos foram ajustados por meio da função sigmoideal de Boltzmann das transições de desenovelamento, utilizando o *Software OriginLab* (Disponível em: <https://www.originlab.com/>). Desta forma, os valores de temperatura do ponto médio de transição (T<sub>m</sub>) foram determinados.

Os ensaios de DSC foram realizados a fim de estimar as transições conformacionais por meio do comportamento da capacidade térmica de um material e sua variação com a temperatura, utilizando como sonda a estrutura terciária das proteínas (GILL, P., MOGHADAM, T. T., RANJBAR, B., 2010). Esses foram realizados utilizando o calorímetro Nano DSC (*TA Instruments*). As proteínas foram exaustivamente dialisadas em Tampão E, e as concentrações utilizadas para a HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD foi de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. O intervalo térmico de coleta foi de 15 °C a 90 °C, a 3 atm. e a taxa de aquecimento utilizada foi de 1 °C/min. Na presença dos nucleotídeos, essa foi previamente incubada por 1h em temperatura ambiente. Os experimentos foram realizados em duas etapas, o aquecimento e, após o resfriamento, as proteínas foram novamente submetidas a aquecimento, a fim de avaliar a possível reversibilidade frente ao processo de desnaturação. O branco dos ensaios foram o tampão E utilizado na diálise, este, na ausência e presença dos nucleotídeos ATP e ADP e do cofator Mg<sup>2+</sup>, estes também preparados no tampão E pós diálise a fim de minimizar a interferência de contra íons. Os termogramas foram coletados por meio do *Software DSC Run (TA Instruments)* e o tratamento de dados foi realizado no *Software Launch Nanoanalyze (TA Instruments)* (Disponível em: <https://www.tainstruments.com/support/software-downloads-support/downloads/>). Os dados obtidos foram ajustados por meio do pacote *Two-State Model*, e os principais parâmetros, como T<sub>m</sub>, variação da entalpia de desnaturação (ΔH) e variação da capacidade calorífica (ΔC<sub>p</sub>) foram estimados.

### 3.5.5 DESENOVELAMENTO QUÍMICO

A estabilidade e desenovelamento proteico são de insigne interesse fisiológico, terapêutico e biotecnológico, visando o controle desses em benefício da manutenção da atividade biológica das proteínas (FONSECA *et. al.*, 2006; HAMBORG *et al.*, 2020). Foram



realizados experimentos de desnoveamento químico monitorados por CD e espectroscopia de fluorescência, utilizando os resíduos W como sondas intrínsecas de monitoramento, objetivando compreender a estabilidade química comparativa do PBD e NBD da proteína recombinante HspA1A, individualmente.

Os ensaios de desnoveamento químico foram realizados utilizando diferentes concentrações do agente desnaturante ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>), de forma que a ação da ureia é decorrente do aumento da solubilidade da estrutura proteica na solução aquosa do agente caotrópico, logo, como o estado desnoveado da proteína apresenta maior exposição dos sítios, esta exibe maior afinidade a ureia. O principal efeito dos agentes caotrópicos é sobre as moléculas de água, requisitando-as, de forma que se não há moléculas de água disponíveis para solvatar compostos hidrofóbicos, não há custo entrópico, logo, o custo da cadeia polipeptídica em se manter organizada não se paga e a proteína se desnovea (FONSECA *et. al.*, 2006; HAMBORG *et al.*, 2020). A ureia foi preparada em tampão D (Tabela 3). Foi determinada a concentração do agente desnaturante por meio de refratometria. As fórmulas utilizadas para o cálculo estão dispostas nas Equações 6 e 7:

$$\Delta N = \Delta Nu - \Delta Nt \quad \text{Equação 6}$$

$$[Ureia] = 117,66 (\Delta N) + 29,753 (\Delta N^2) + 185,56 (\Delta N^3) \quad \text{Equação 7}$$

de forma que, na Equação 6:  $\Delta Nu$  é o índice de refração do agente desnaturante, no caso, a ureia,  $\Delta Nt$  é o índice de refração do tampão utilizado e o  $\Delta N$  é a diferença entre os índices anteriores descritos. A Equação 7 apresenta a equação polinomial utilizada para o cálculo da concentração final de ureia em solução (Thomson, J. A., Shirley, B. A., Pace, C. N., 1989).

Os ensaios de CD foram realizados utilizando o equipamento descrito no Item 3.5.1 dos Materiais e Métodos. Na presença do agente desnaturante, as proteínas foram previamente incubadas *overnight*, em temperatura ambiente, no intuito do equilíbrio químico. As proteínas foram utilizadas em concentração de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , as diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 0,1 cm. O branco dos ensaios foi o tampão E, este, na ausência e presença das diferentes concentrações do agente desnaturante ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>) utilizadas. Para as análises dos resultados, os dados de CD foram normalizados  $[\theta]_{\text{EMR}}$ .

Os ensaios foram realizados utilizando o equipamento descrito no Item 3.5.2 dos Materiais e Métodos. Na presença do agente desnaturante, as proteínas foram previamente incubadas *overnight*, em temperatura ambiente. Essas, foram utilizadas em concentração de 10

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ , as diluições realizadas utilizando o tampão D (Tabela 3) e as leituras em cubeta com caminho óptico de 0,5 cm. O branco dos ensaios foi o tampão E, este, na ausência e presença das diferentes concentrações do agente desnaturante ureia ( $0 - 8 \text{ mol.L}^{-1}$ ) utilizadas. A partir dos dados obtidos, foram calculados o centro de massa espectral ( $\langle\lambda\rangle$ ), conforme descrito no Item 3.5.2 dos Materiais e Métodos.

Os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais e repetidos para replicatas biológicas. As concentrações do agente desnaturante utilizadas foram de 0,25 a 0,25  $\text{mol.L}^{-1}$ . As dados obtidos foram plotados e ajustados por meio do ajuste sigmoidal BiDose Resposta, utilizando o *Software OriginLab* (Disponível em: <https://www.originlab.com/>). Desta forma, os valores das concentrações médias de desnaturação ( $C_m$ ) para as proteínas foram obtidos.

### 3.5.6 ATIVIDADE ATPÁSICA

Os ensaios de atividade ATPásica do NBD da HspA1A foram realizados a fim de analisar a atividade enzimática da mesma sob a hidrólise do nucleotídeo ATP (Mitra *et al.*, 2022). A fim comparativo, o ensaio também foi realizado com a proteína canônica sob as mesmas condições. O experimento é realizado avaliando a quantidade de Pi liberado mediante a quebra da molécula de ATP pela proteína recombinante, utilizado o kit colorimétrico *PiColorLock™ Gold Phosphate Detection System* (Innova Biosciences).

O supracitado kit colorimétrico baseia-se na alteração da absorbância em 590 nm do corante verde malaquita na presença de moléculas de Pi, resultante da formação de fosfomolibdatos, de forma que o Pi liberado é proporcional à taxa de hidrólise de nucleotídeos ATP pelas proteínas (SILVA *et al.*, 2021).

Foi utilizada uma microplaca de 96 poços (*Greiner UV-Star*), as proteínas em concentração de  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Mg}^{2+}$ . Mediante a incubação de 40min, por  $30^\circ\text{C}$ , com concentrações crescentes de nucleotídeo ATP ( $0$  a  $1750 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 590nm. Amostras preparadas em Tampão E. Os dados obtidos foram normalizados a partir de uma curva padrão de Pi em concentrações crescentes realizada. Os ensaios foram realizados utilizando leitor de microplaca Varioskan™ LUX 3020-197 (*Thermo Fisher Scientific*).

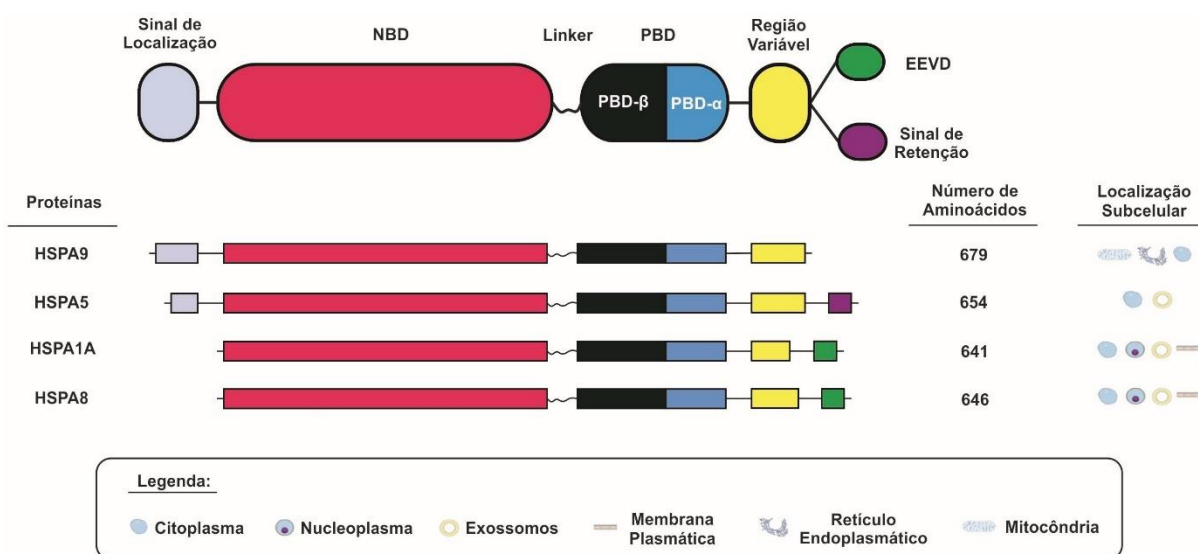
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DOS NBD E PBD DE HSP70 HUMANAS

As proteínas da família das Hsp70 humanas (também denominadas como HspA), em sua forma canônica, são organizadas em dois domínios, conforme descrito no item 1.3 da Introdução. A Figura 3 apresenta um desenho esquemático comparativo das regiões presentes nas proteínas HspA9, HspA5, HspA1A e HspA8.

A Figura 4 representa o alinhamento das sequências de aminoácidos do NBD e a Figura 5 do PBD dessas homólogas, realizados utilizando o *Software Clustal Omega*. Os aminoácidos aromáticos F, Y e W se encontram em destaque em caixas amarelas e, além delas, um sublinhado vermelho nos resíduos de triptofano. A caixa azul destaca o sinal de localização presente nas HspA9 e HspA5 humanas. O linker hidrofóbico, presente no PDB das proteínas, encontra-se destacado pela caixa rosa. E, nos destaques em roxo e verde, estão presentes, respectivamente, a sequência do sinal de retenção (KDEL) geralmente presente nas proteínas de retículo endoplasmático, no caso a HspA5, e o motivo EEVD, presente na HspA1A e HspA8, este responsável pela interação entre as Hsp70 e suas co-chaperonas e, também, outras proteínas da família das Hsps (VOSTAKOLAEI *et. al*, 2020).

**Figura 3. Desenho esquemático comparativo das regiões presentes nas HspA.** Comparativo realizado entre as proteínas HspA9, HspA5, HspA1A e HspA8 completas. Apresenta o número de aminoácidos totais de cada homóloga, considerando o peptídeo sinal de localização presente nas proteínas HspA9 e HspA5, o sinal de retenção presente na HspA5 e o motivo EEVD presente na HspA1A e HspA8. Indicativo também das localizações subcelulares das proteínas humanas.



Fonte: Adaptado de RADONS, J., 2016.

**Figura 4. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos NBDs de HspA.** Os símbolos destacados como (\*), (-), (:), e (.) representam os aminoácidos idênticos, ausentes, estruturalmente similares e pouco similares, respectivamente, em todas as sequências primárias. Em caixas amarelas foram destacados os aminoácidos aromáticos F, Y e o W e, além delas, um sublinhado vermelho nos resíduos de W. A caixa em lilás, sobre a nomenclatura, destaca o domínio alvo do presente trabalho. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos NBDs das HspA. A caixa azul indica o peptídeo sinal de localização, considerado no alinhamento, presente nas proteínas HspA9 e HspA5. A faixa em rosa indica a região correspondente a sequência do NBD.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 5. Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos PBDs de HspA.** Os símbolos destacados como (\*), (-), (:), e (.) representam os aminoácidos idênticos, ausentes, estruturalmente similares e pouco similares, respectivamente, em todas as seqüências primárias. Em caixas amarelas foram destacados os aminoácidos aromáticos F, Y e o W e, além delas, um sublinhado vermelho nos resíduos de W. A caixa em lilás, sobre a nomenclatura, destaca o domínio alvo do presente trabalho. Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos PBDs das HspA. Em destaque, na caixa rosa, encontra-se o linker hidrofóbico. A faixa em azul indica a região correspondente a seqüência do PBD (PBD- $\beta$  e o PBD- $\alpha$ ). A faixa em laranja destaca a seqüência da região variável presente nas HspA. E, nos destaques nas caixas em roxo e verde estão presentes, respectivamente, a seqüência do sinal de retenção (KDEL) geralmente presente nas proteínas de retículo endoplasmático e o motivo EEVD, responsável pela interação entre as Hsp70 e suas co-chaperonas e outras proteínas da família das Hsps.

```

HspA9_PBD      VTDVLLLDVTPLSLGIETLGGVFTKILNRNTTIPTKKSQVFSTAADGQTQVEIKVCQGER 490
HspA5_PDB      TGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLIPRNTVVPVKKSQIFSTASDNQPTVIKQVEGER 470
HspA1A_PBD     VQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQITTYSDNQPGVLIQVIEGER 447
HspA8_PBD      VQDLLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNSTIPTKQTQFTTYSNQPGVLIQVIEGER 447
. *::**** **:** ** **:* ** **:::**:* **:* :*. * **:* :***

HspA9_PBD      EMAGDNKLLGQFTLIGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGIVHVSADKGTGREQQIIVQS-S 549
HspA5_PDB      PLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPQIEVTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITITNDQ 530
HspA1A_PBD     AMTKDNLLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDK 507
HspA8_PBD      AMTKDNLLGKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSADKSTGKENKITITNDK 507
:: **:* ** * *****:**:**:* **:**: :*. * .

HspA9_PBD      GGLSKDDIENMVKNAEKYAEEDRRKKERVEAVNMAEGIIHDTETKMEE---FKDQLPADE 606
HspA5_PDB      NRLTPEEIERMVNDAAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSED 590
HspA1A_PBD     GRLSKEEIERMVQEAEKYKADEVRERVSADKNALESYAFNMKSAVED-EGLGKGISEAD 566
HspA8_PBD      GRLSKEDIERMVQEAEKYKADEKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVED-EKLQKINDED 566
. *: :**:**:**: ** * :::: * * . . : : : : :

HspA9_PBD      CNKLKEEISKMRELLARKDSETGENIRQAASSLQQASLKL FEMAYKKMASERE----- 659
HspA5_PDB      KETMEKAVEEKIEWLLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAE 650
HspA1A_PBD     KKKVLDCQEVISLDANTLAEKDEF EHKRKELEQVCNPIISGLYQAGGGPG---PGGFG 623
HspA8_PBD      KQKILDKCNEIINWLDKNQTAEEFEHQKLEKVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFP 626
:: . . : . * : ::: ..*:: : : * .

HspA9_PBD      -----GSGSSGTGEQKEDQKEEQ 679
HspA5_PDB      KDEL----- 654
HspA1A_PBD     --AQGPKGGSGSPTIEEVD--- 641
HspA8_PBD      GGGAPPSGGASSGPTIEEVD--- 646

```

Fonte: Autoria própria.

As porcentagens de identidade sequenciais entre elas foram obtidas pelo *Software Emboss Needle* (Tabelas 4).

**Tabela 4. Identidade percentual entre os NBD e PBD e as versões completas das HspA.** Valores comparativos realizado entre os dois domínios das proteínas HspA9, HspA5, HspA1A e HspA8. Foram destacados os percentuais de identidade entre a HspA1A e as homólogas humanas.

NBD				
Matriz de Identidade Percentual (%)*				
Proteínas	HspA9_NBD <sup>#</sup>	HspA5_NBD <sup>#</sup>	HspA8_NBD	HspA1A_NBD
HspA9_NBD <sup>#</sup>	100	—	—	—
HspA5_NBD <sup>#</sup>	51	100	—	—
HspA8_NBD	47	65	100	—
HspA1A_NBD	<b>46</b>	<b>63</b>	<b>87</b>	<b>100</b>
PBD				
Matriz de Identidade Percentual (%)*				
Proteínas	HspA9_PBD <sup>#</sup>	HspA5_PBD <sup>#</sup>	HspA8_PBD	HspA1A_PBD
HspA9_PBD <sup>#</sup>	100	—	—	—
HspA5_PBD <sup>#</sup>	45	100	—	—
HspA8_PBD	43	55	100	—
HspA1A_PBD	<b>44</b>	<b>55</b>	<b>81</b>	<b>100</b>
HSPA COMPLETAS				
Matriz de Identidade Percentual (%)*				
Proteínas	HspA9 <sup>#</sup>	HspA5 <sup>#</sup>	HspA8	HspA1A
HspA9 <sup>#</sup>	100	—	—	—
HspA5 <sup>#</sup>	52	100	—	—
HspA8	50	64	100	—
HspA1A	<b>50</b>	<b>66</b>	<b>86</b>	<b>100</b>

\* Valores obtidos por meio do programa *Emboss Needle*.

<sup>#</sup> Valores obtidos para as sequências sem o peptídeo sinal de encaminhamento.

**Fonte:** Autoria própria.

Conforme observado na Tabela 4, as proteínas HspA completas apresentam um moderado grau de identidade sequencial. Como observado, a maior quantidade percentual, de 86%, ocorre entre a HspA1A e HspA8, seguida pelos valores de, aproximadamente, 66% entre HspA5 e HspA8, 64% entre HspA1A e HspA5 e, por volta de 50% entre HspA9 e as demais supracitadas. As HspA apresentam elevado grau de conservação sequencial nos aminoácidos e na composição de seus domínios estruturais. A região correspondente ao PBD é a menos conservada entre as homólogas, elucidando as diversificadas funções apresentadas por essas (BROCCHIERI, L., MACARIO, E. C., MACARIO, A. J. L., 2008).

Os NBDs e PDBs das HspA homólogas dispostas apresentam um moderado grau de identidade na sequência de aminoácidos. A porcentagem de identidade observada entre a HspA1A e a HspA8 foi de 87% e 81%, respectivamente para o NBD e PDB, sendo o maior valor observado. Seguido de aproximadamente 65% entre as proteínas HspA5 e HspA8, e 63% entre HspA1A e a HspA5 com relação ao NBD. Quanto ao PDB, o segundo maior valor observado foi de 55% entre HspA1A e a HspA5.

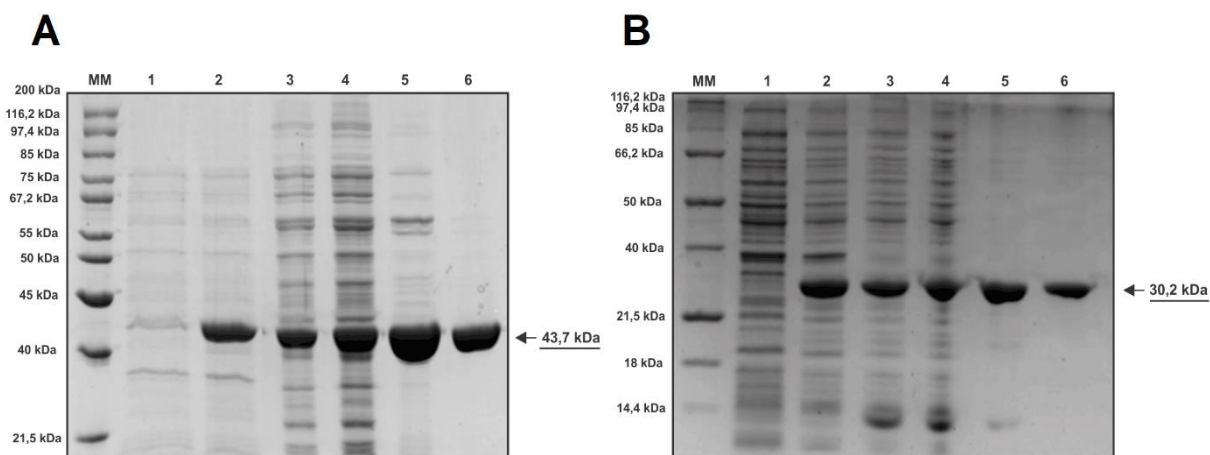
Os maiores valores obtidos de identidade sequencial, em ambos os domínios, para as proteínas dispostas, ocorre entre a HspA1A e a HspA8, visto que, ambas são proteínas citosólicas, divergem-se em cinco aminoácidos na região variável, apresentam o motivo EEVD e a mesma localização para os resíduos de W, no caso, posição W90 e W580 (Figuras 2 e 3), respectivamente, para o NBD e o PDB (BROCCHIERI, L., MACARIO, E. C., MACARIO, A. J. L., 2008; TAKAKUWA *et. al.*, 2019). Além disso, ligam motivos peptídicos semelhantes e, desta forma, são consideradas como funcionalmente intercambiáveis (SERLIDAKI *et. al.*, 2019). Já os menores valores encontrados ocorrem entre os domínios da HspA9 com os domínios das demais proteínas homólogas. Os moderados percentuais obtidos podem ter ocorrido devido a supracitada proteína ser mitocondrial, podendo ocasionar algumas diferenças entre elas (RADONS, J., 2016). Os NBD e PBD apresentam diversos aminoácidos conservados (BROCCHIERI, L., MACARIO, E. C., MACARIO, A. J. L., 2008). A região do linker, presente nos PBD, apresentam identidades entre 5 dos 9 aminoácidos correspondentes e, vale ressaltar, que a região variável, que também corresponde as regiões do sinal de retenção e motivo EEVD, é a região de menor percentual de identidade do domínio supracitado. Em suma, os dados apontam grande similaridade entre os NBD e PBD das homólogas humanas dispostas, tornando a investigação dos domínios independentes interessantes do ponto de vista estrutural e funcional em comparação aos estudos da proteína canônica.

## **4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO NBD E PBD DA HSPA1A**

As proteínas recombinantes correspondentes às construções HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD são referentes ao NBD e PBD da forma canônica da HspA1A, respectivamente (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006). Essas foram obtidas por meio de duas etapas cromatográficas. As proteínas foram obtidas fusionadas à His-tag e esta foi mantida nos testes subsequentes devido importante papel na instabilidade proteica. As etapas de purificação foram monitoradas por SDS-PAGE 12% para a proteína de massa 43,7 kDa, no caso, a HspA1A\_NBD

(Figura 6A) e a proteína HspA1A\_PBD, de 30,2 kDa (Figura 6B), foi monitorada por SDS-PAGE Tris-tricina 12%, visto que, a tricina apresenta uma elevada carga negativa e força iônica, permitindo que proteínas de menores massas moleculares sejam mais facilmente separadas (SCHÄGGER, H., 2006). As proteínas foram obtidas com grau de pureza superior a 95% (*Software ImageJ*) permitindo o uso para os ensaios subsequentes. O rendimento foi satisfatório com obtenção de, aproximadamente, 6 e 10 mg de proteína por litro de meio de cultura, respectivamente, para a HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD recombinantes.

**Figura 6. Monitoramento das etapas de expressão e purificação das proteínas HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD recombinantes por SDS-PAGE.** (MM) Padrão marcador de massa molecular pré-corado (kDa). As frações coletadas são referentes as amostras de: (1) fração de proteínas totais da cultura não induzidas; (2) proteínas totais da cultura induzidas por IPTG; (3) fração solúvel das proteínas totais da cultura induzidas; (4) proteína eluída após filtração utilizando uma Membrana Hidrofílica Durapore de 0.45  $\mu\text{m}$  cutoff e 47 mm de diâmetro; (5) proteína eluída após a cromatografia de afinidade ao  $\text{Ni}^{2+}$ ; (6) proteína eluída após a cromatografia de exclusão por tamanho preparativa. (A) SDS-PAGE 12% das frações coletadas da proteína HspA1A\_NBD. (B) SDS-PAGE Gel Tris-tricina 12% das frações coletadas da proteína HspA1A\_PBD.



**Fonte:** Autoria própria.

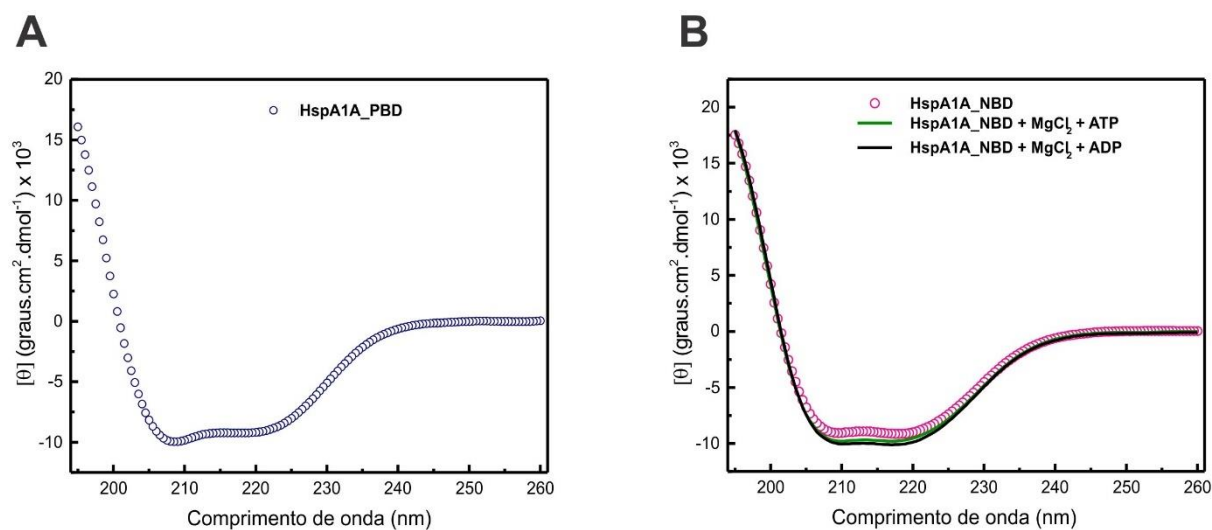
### 4.3 ESPECTROPOLARIMETRIA DE CD DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Com o intuito de verificar se as proteínas recombinantes foram obtidas enoveladas, foram realizados experimentos de CD, técnica que utiliza como sonda global a estrutura secundária (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005). Os espectros obtidos mostraram que as proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD apresentam elementos de estrutura secundária do tipo hélice- $\alpha$  e folha- $\beta$ , logo, foram produzidas em sua forma enovelada. A Figura 7 (A) apresenta o espectro, obtido no UV-distante (260nm – 195 nm), da proteína HspA1A\_PBD normalizado para  $[\theta]_{\text{EMR}}$  e (B) o espectro de CD, também obtido no UV-



distante, da proteína HspA1A\_NBD na presença e na ausência de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e íons  $Mg^{2+}$ . O cofator metálico é essencial no fortalecimento da formação do complexo entre proteína e nucleotídeo (MCLAUGHLIN *et al.*, 2004).

**Figura 7. Caracterização da estrutura secundária das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD por espectropolarimetria de CD.** As proteínas recombinantes foram obtidas com elementos de estrutura secundária do tipo hélice- $\alpha$  e folha- $\beta$ . (A) Espectro, em azul, obtido no UV-distante (260nm – 195 nm) da proteína HspA1A\_PBD, a  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . (B) Espectro, em rosa, obtido no UV-distante (260nm – 195 nm) da proteína HspA1A\_NBD,  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , na ausência e na presença de nucleotídeos adenosina ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e íons  $Mg^{2+}$  ( $2 \text{mmol.L}^{-1}$ ), respectivamente, espectros em verde e preto.



**Fonte:** Autoria própria.

A deconvolução dos espectros foi realizada utilizando os dados normalizados para elipticidade molar residual. Estes foram inseridos no software CDNN (versão 2.1) (BÖHM, G., MUHR, R., JAENICKE, R., 1992), a fim de determinar as quantidades percentuais de cada estrutura secundária presente nas supracitadas. Os dados foram organizados na Tabela 5.

**Tabela 5. Conteúdo de estrutura secundária das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD na presença e ausência de nucleotídeos adenosina e íons Mg<sup>2+</sup>. Deconvolução dos espectros utilizando os dados normalizados para elipticidade molar residual e inseridos no software CDNN (versão 2.1).**

Tipos de Estrutura Secundária	Proteínas			
	HspA1A_PBD	HspA1A_NBD	HspA1A_NBD + ATP + MgCl <sub>2</sub>	HspA1A_NBD + ADP + MgCl <sub>2</sub>
Hélice- $\alpha$ (%)	7	30	33	35
Folha- $\beta$ (%)	43	15	13	12
Voltas- $\beta$ (%)	18	21	22	21
Estruturas Randômicas (%)	32	33	32	32
Total (%)	100	99	100	100

**Fonte:** Autoria própria.

Ao compararmos os perfis espectrais das proteínas, a HspA1A\_PBD apresenta um mínimo em 218 nm, característicos de folhas- $\beta$ . Já a HspA1A\_NBD, na presença e ausência de nucleotídeos adenosina e íons Mg<sup>2+</sup>, apresenta mínimos característicos de hélices- $\alpha$ , em 222 e 208 nm (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005).

Observando os dados deconvoluídos dos espectros, a proteína recombinante correspondente à construção HspA1A\_PBD, apresenta como conteúdo de estrutura secundária majoritário folhas- $\beta$ . Já a construção HspA1A\_NBD, conteúdo de estrutura secundária majoritário de hélices- $\alpha$ . Ao compararmos os dados observados para a canônica HspA1A e as homólogas HspA8, HspA9 e os oligômeros de alta massa molecular da HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; DORES-SILVA *et al.*, 2015; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), estas apresentam conteúdo de estrutura secundária majoritário de hélices- $\alpha$ . O PBD é subdividido em dois subdomínios, o PBD- $\beta$  e PBD- $\alpha$ . O primeiro consiste em oito fitas  $\beta$  organizadas em duas folhas  $\beta$  e o segundo é um subdomínio totalmente  $\alpha$ -helicoidal (KOHLENER, V., ANDRÉASSON, C., 2020), justificando o conteúdo estrutural observado, visto que, na proteína completa, a configuração estrutural entre os domínios se apresenta predominante em hélices- $\alpha$  (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., VALPUESTA, J. M., 2018).

A proteína HspA1A\_NBD apresentou 30% de conteúdo estrutural hélices- $\alpha$  em sua forma apo e, quando ligada aos nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) apresentou 33% e 35%, respectivamente. Os dados observados sugerem que na presença de nucleotídeos ADP e íons Mg<sup>2+</sup>, a proteína apresenta um leve aumento estrutural correspondente a hélices- $\alpha$ , como foi

observado para a canônica HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006) e as homólogas HspA8 e HspA9 (DORES-SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021).

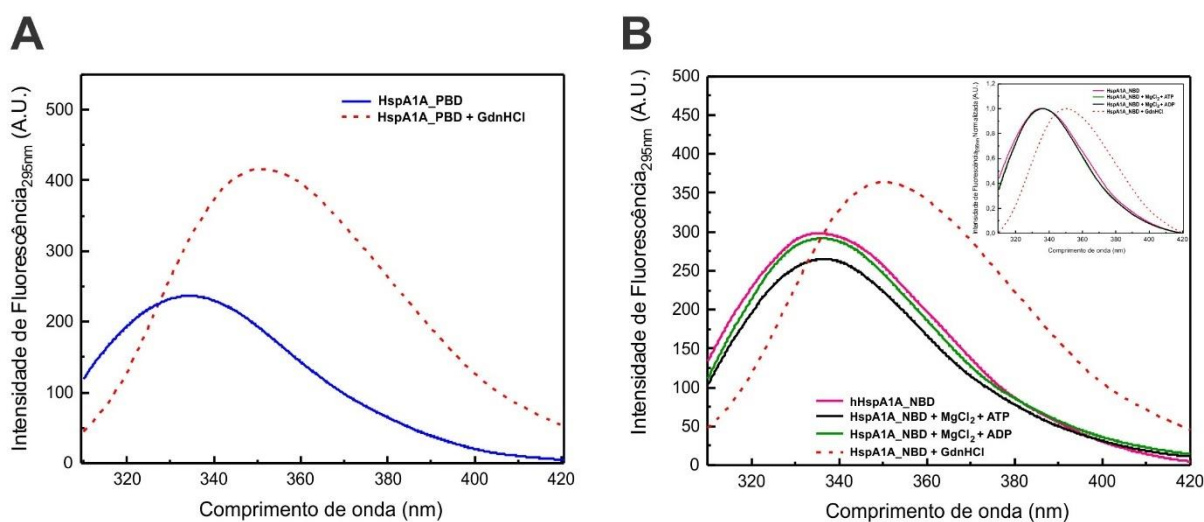
O PDB apresenta, aproximadamente, 42% Hélice- $\alpha$ , 25% de Folha- $\beta$  e 32% de outras estruturas, de acordo com o Software *2StrucCompare*. As diferenças nas porcentagens, em comparação aos dados obtidos experimentalmente, pode ser explicada devido ao feixe de 3 hélices que a estrutura apresenta (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006). O NDB apresenta, aproximadamente, 40% Hélice- $\alpha$ , 29% de Folha- $\beta$  e 30% de outras estruturas, de acordo com o Software supracitado. As porcentagens se aproximam, dentro do erro, desta forma, validando os dados obtidos experimentalmente.

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA**

##### **4.4.1 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO**

Com o intuito de investigar a estrutura terciária local e informações à cerca do enovelamento das proteínas recombinantes (EFTINK, M. R., 1994), foram realizados ensaios de fluorescência. Os ensaios foram realizados com excitação em 295 nm, visto que, nesse  $\lambda$  apenas os resíduos de W são excitados (EFTINK, M. R., 1994). Além do estado nativo (Figura 8A e B), ambas as proteínas foram submetidas a condições desnaturantes. (Figura 8A e B). A proteína HspA1A\_NBD também foi incubada com nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e íons  $Mg^{2+}$  (Figura 8B).

**Figura 8. Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano para as proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD, realizados na presença e ausência de GdnHCl e, a última, também na presença e ausência ATP e ADP e íons  $Mg^{2+}$ .** Os espectros na presença de  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  GdnHCl apresentam um deslocamento espectral para o vermelho, ou seja, para comprimentos de onda menos energéticos, e o aumento de fluorescência que pode ocorrer devido a maior exposição dos resíduos de W ao solvente hidrofílico, devido a desnaturação. (A) Espectros da HspA1A\_PBD, a  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , na presença, pontilhado em vermelho, e ausência, espectro em azul, do agente desnaturante, no caso,  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  GdnHCl. (B) Espectros da HspA1A\_NBD, a  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , na presença, pontilhado em vermelho, e ausência, em rosa, do agente desnaturante, no caso,  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  GdnHCl e na presença de ATP e ADP ( $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e íons  $Mg^{2+}$  ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), respectivamente, espectros em verde e preto. Quando incubada com nucleotídeos, a proteína não sofreu variações no  $\langle \lambda \rangle$  (evidenciada pela normalização dos espectros), apenas algumas variações energéticas espectrais (observada no gráfico inserto). Diferentemente da incubação com a GdnHCl, que apresentam o deslocamento espectral para o vermelho (gráfico inserto).

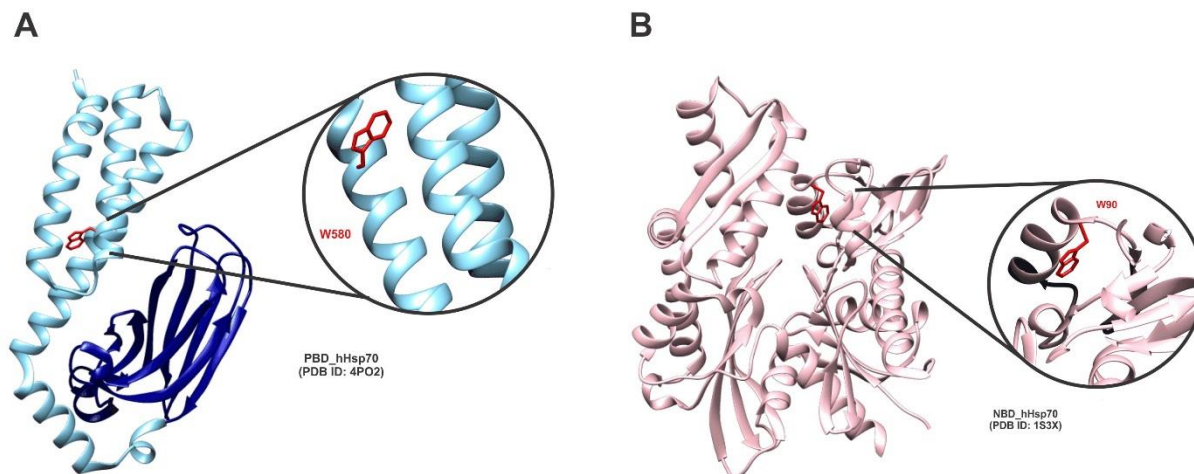


**Fonte:** Autoria própria.

A HspA1A\_NBD e o HspA1A\_PBD possuem apenas 1 resíduo de W cada, localizados nas posições W90 e W580, respectivamente (Figura 9A e B). Os espectros coletados para as proteínas na presença e ausência de  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  GdnHCl apresentam um aumento de fluorescência. Este aumento é indicativo de supressões, internas ou intrínsecas, presentes na estrutura, de forma que, essas deixam de ocorrer frente a desnaturação e o fluoróforo fluoresce mais intensamente, mesmo suprimido pela ação das moléculas do solvente (MISRA, P. P., KISHORE, N., 2011), sugerindo que as proteínas supracitadas apresentam perda de estrutura terciária local, o que também foi observado para a canônica HspA1A e as homólogas HspA8, HspA9 e os oligômeros de alta massa molecular da HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; DORES-SILVA *et al.*, 2015; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Quando a proteína está enovelada e detém estrutura terciária local, parte dos resíduos de W se encontram no ambiente hidrofóbico, entretanto, em condições desnaturantes, esses são expostos à água, de forma que, a polaridade do solvente implica diretamente no deslocamento do espectro de emissão para  $\lambda$  menos energéticos (LAKOWICS, J. R., 2006). Logo, na ausência do agente

desnaturante, as proteínas apresentaram valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  e  $\langle\lambda\rangle$  menores do que os observados em condições na presença de 6 mol.L<sup>-1</sup> GndHCl (Tabela 6), indicando que os resíduos de W se localizavam em ambientes parcialmente ou totalmente protegidos do solvente e que as proteínas foram obtidas em sua forma enovelada.

**Figura 9. Localização dos resíduos de triptofano presentes nas proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD.** São apresentadas e os resíduos de triptofano destacados em vermelho na (A) HspA1A\_PBD e na (B) HspA1A\_NBD.



**Fonte:** Autoria própria.

Os espectros coletados para a proteína HspA1A\_NBD, incubada com nucleotídeos adenosina e na presença de íons Mg<sup>2+</sup>, não apresentam grandes alterações conformacionais em suas estruturas terciárias locais, logo, não sofreu modificações no  $\langle\lambda\rangle$  (Tabela 6), apenas variações energéticas espectrais, provável indicativo da interação com os nucleotídeos, como foi observado para a canônica HspA1A e a homóloga HspA8 (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; SILVA *et al.*, 2021).

**Tabela 6. Parâmetros espectroscópicos de fluorescência intrínseca do triptofano obtidos para as proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD.** Ambas na presença e ausência de 6 mol.L<sup>-1</sup> GndHCl e, a última, também incubada com nucleotídeos ATP e ADP e na presença de íons Mg<sup>2+</sup>.

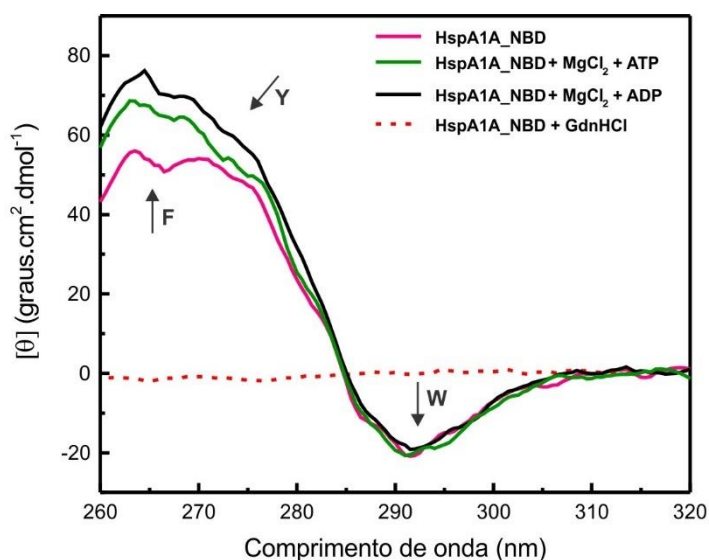
Proteínas	Parâmetros			
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ 6 mol.L <sup>-1</sup> GndHCl (nm)	$\langle\lambda\rangle$ (nm)	$\langle\lambda\rangle$ 6 mol.L <sup>-1</sup> GndHCl (nm)
HspA1A_PBD	337 ± 1	353 ± 1	344,9 ± 0,2	359,7 ± 0,2
HspA1A_NBD	337 ± 1	353 ± 1	346,6 ± 0,2	359,2 ± 0,2
HspA1A_NBD + ATP + MgCl <sub>2</sub>	338 ± 1	—	346,7 ± 0,2	—
HspA1A_NBD + ADP + MgCl <sub>2</sub>	337 ± 1	—	346,6 ± 0,2	—

Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.2 UV-PRÓXIMO DA PROTEÍNA HspA1A\_NBD RECOMBINANTE

Com o intuito de analisar a estrutura terciária da proteína recombinante HspA1A\_NBD foram realizados experimentos de CD na região do UV-próximo (260 – 320 nm). A Figura 9 apresenta o espectro, obtido na supracitada região, normalizado para  $[\theta]_{\text{EMR}}$ . Além do estado nativo, foram realizados ensaios na presença de nucleotídeos adenosina ADP e ATP e do cofator Mg<sup>2+</sup> para a HspA1A, e em condições desnaturantes, na presença de 6 mol.L<sup>-1</sup> de GndHCl.

**Figura 10. Caracterização da estrutura terciária da proteína HspA1A\_NBD por espectropolarimetria de CD na região do UV-Próximo.** Espectro obtido no UV-próximo (260nm – 320 nm) da proteína HspA1A\_NBD, a  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , espectro em rosa, apresentando sinais na faixa de mais alta energia representando as transições eletrônicas que ocorrem devido às absorções dos grupos aromáticos dos resíduos de F, Y e W. A proteína também foi incubada com  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  de GndHCl, pontilhado em vermelho, e o espectro apresentou mudanças estando relacionado à desnaturação sofrida, logo, a perda de estrutura terciária. Na presença de ATP e ADP ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), respectivamente em verde e preto, observa-se o aumento de sinal pronunciado nas regiões de absorção dos resíduos de F e Y.



**Fonte:** Autoria própria.

Na região do UV-Próximo, no espectro de CD, os sinais ocorrem devido às absorções dos grupos aromáticos dos resíduos de F, na região de 260 - 270nm, dos resíduos de Y, característico sinal que surge entre 272 – 285 nm e dos resíduos de W, na região de 285 – 300 nm (KARABENCHEVA-CHRISTOVA *et al.*, 2013). Logo, o espectro da HspA1A\_NBD apresenta os sinais característicos dos grupos aromáticos dos resíduos de F, Y e W, indicando que a proteína apresenta estrutura terciária local. Após incubação com  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  de GndHCl o espectro obtido não apresenta sinais característicos, indicando que a estrutura proteica sofreu mudanças conformacionais, indicando a perda de estrutura terciária. Na presença de ATP e ADP e do cofator  $\text{Mg}^{2+}$ , observa-se o aumento de sinal nas regiões de absorção dos resíduos de F e Y, indicando que, provavelmente, ocorre a interação com os nucleotídeos e esta, altera a conformação da construção HspA1A\_NBD, como observado nos dados apresentados anteriormente.

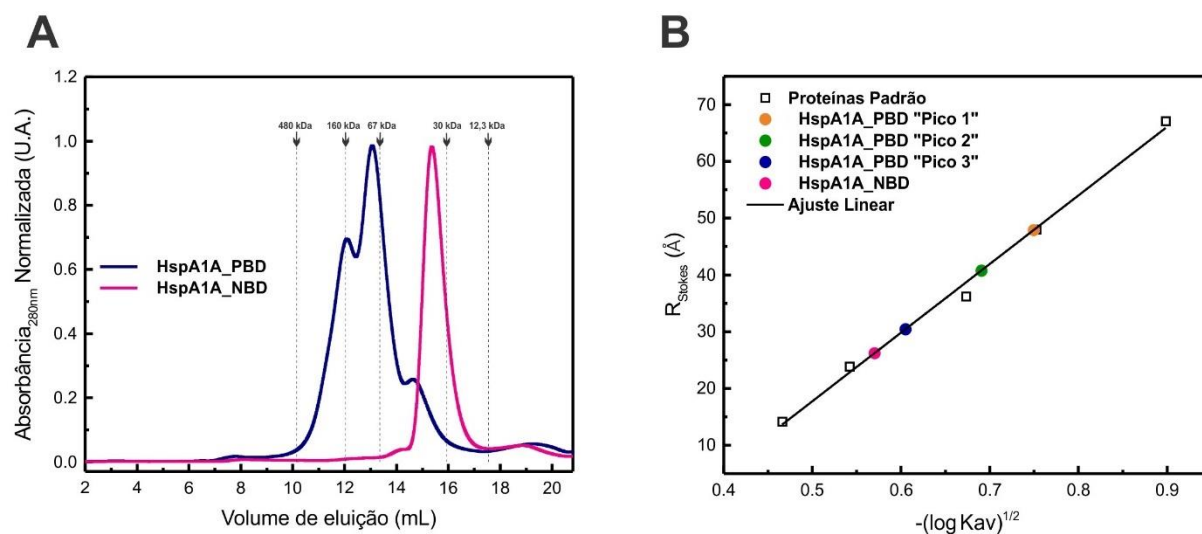
As Figuras 4 e 5, presente no item 4.1 dos Resultados e Discussão, apresenta, em caixas amarelas, os resíduos aromáticos supracitados em destaque. Os sinais característicos do UV-próximo estão diretamente relacionadas as representações das transições eletrônicas que ocorrem devido às absorções dos grupos aromáticos dos aminoácidos aromáticos

(KARABENCHEVA-CHRISTOVA *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2013). A proteína HspA1A\_NBD apresenta 19F / 10Y / 1W, enquanto, a proteína HspA1A\_PBD apresenta 6F / 5Y / 1W. A quantidade inferior de resíduos aromáticos, apesar da alta concentração utilizada, justifica o espectro ruidoso obtido para mesma (espectro não mostrado).

#### 4.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO ANALÍTICA

Como via de determinar se as proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD possuíam estrutura quaternária e analisar o estado oligomérico dessas, foi realizada aSEC. Nos experimentos, a HspA1A\_PBD eluiu em 3 picos, respectivamente com 12,1 mL, próxima a proteína padrão de 160 kDa ( $\gamma$ - Globulina), 13,1 mL, próxima a proteína padrão de 67 kDa (BSA) e com 14,6 mL. Enquanto a HspA1A\_NBD eluiu em 15,3 mL, próxima à proteína padrão de 30 kDa (Anidrase Carbônica). A partir dos volumes de eluição das proteínas supracitadas, juntamente com o volume de eluição das proteínas padrão e do *blue dextran*, foi possível determinar alguns parâmetros hidrodinâmicos. A Figura 10 (A) apresenta o perfil de eluição das proteínas supracitadas e (B) o raio de Stokes experimental ( $R_s$ ) obtido para elas.

**Figura 11. Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC) das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD.** (A) As amostras foram aplicadas em uma coluna Superdex 200 10/300 GL e detectadas por absorbância à 280 nm. Os perfis cromatográficos da HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD foram identificados, respectivamente, em azul e rosa no cromatograma, e as MM, referentes aos picos de eluição das proteínas padrão (Apoferitina,  $\gamma$ - Globulina, BSA, Anidrase Carbônica e Citocromo C, respectivamente), estão indicadas pelas linhas tracejadas. (B) Gráfico para determinação de  $R_s$  como uma função dos valores de  $-(\log Kav)^{1/2}$ . Foram determinados  $R_s = 48 \pm 2$  Å,  $R_s = 41 \pm 2$  e  $R_s = 30 \pm 2$ , respectivamente, para os 3 picos distintos de eluição da HspA1A\_PBD, e  $R_s = 28 \pm 2$  Å para a HspA1A\_NBD.



Fonte: Autoria própria.



A partir do ajuste linear se obteve o  $R_s$ . A  $f/f_0$  foi obtida através da razão entre o  $R_s$  e o  $R_0$  (LEBOWITZ, J., LEWIS, M. S., SCHUCK, P., 2002). Foi possível determinar a  $MM_{app}$ , outro parâmetro hidrodinâmico. As propriedades hidrodinâmicas calculadas pelos experimentos de aSEC estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7. Propriedades hidrodinâmicas das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD obtidas por aSEC.**

Proteínas	Parâmetros Hidrodinâmicos				
	$MM^a$ (kDa)	$MM_{app}^b$	$R_0^a$ (Å)	$R_s^b$ (Å)	$f/f_0^{a,b}$
HspA1A_PBD “Pico 1”	128,7 (Tetrâmero)	160 ± 15	32,7	48 ± 2	1,46 ± 0,02
HspA1A_PBD “Pico 2”	60,4 (Dímero)	100 ± 10	25,9	41 ± 2	1,57 ± 0,02
HspA1A_PBD “Pico 3”	30,2 (Monômero)	43 ± 4	20,6	30 ± 2	1,47 ± 0,02
HspA1A_NBD	43,7	38 ± 4	23,3	28 ± 2	1,23 ± 0,02

<sup>a</sup> Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD, como monômeros, pelo Software *Sednterp*;

<sup>b</sup> Valores obtidos usando o  $K_{av}$  obtido experimentalmente.

**Fonte:** Autoria própria.

Para cada pico de eluição equivalente a proteína recombinante que correspondente à construção HspA1A\_PBD, foram calculados os parâmetros hidrodinâmicos considerando as conformações estruturais 3D que esses poderiam estar admitindo. Os 3 picos distintos de eluição correspondendo a diferentes estados conformacionais, elucidam o comportamento oligomérico observado para o PBD. O dado obtido para  $f/f_0$ , em torno de 1,4 e 1,6, sugere que esse, apresenta-se, como um oligômero levemente alongado em solução. Já os valores obtidos para a proteína HspA1A\_NBD, sugere um monômero globular compacto, visto o valor de  $f/f_0$  em torno de 1,2 e sua  $MM_{app}$  ser menor que a massa molecular teórica. O NBD da proteína HspA5 apresenta as mesmas características (artigo em preparação pelo Grupo). Para as homólogas e ortólogas completas, foram observados o formato levemente alongado em solução (DORES-SILVA *et al.*, 2015; DORES-SILVA *et al.*, 2017; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Como já reportada a tendência à oligomerização para a família das Hsp70 (APRILE *et al.*, 2013; DORES-SILVA *et al.*, 2015; ZININGA *et al.*, 2015; TAKAKUWA *et al.*, 2019),

trabalhos publicados mostram que esta ocorre por meio de uma interação específica entre o linker e o PBD das Hsp70 gerando dímeros e oligômeros de ordem superior (APRILE *et al.*, 2013; TAKAKUWA *et al.*, 2019). Logo, os dados obtidos para HspA1A\_PBD, confirmam o papel do domínio na tendência reportada, já descrito pela literatura.

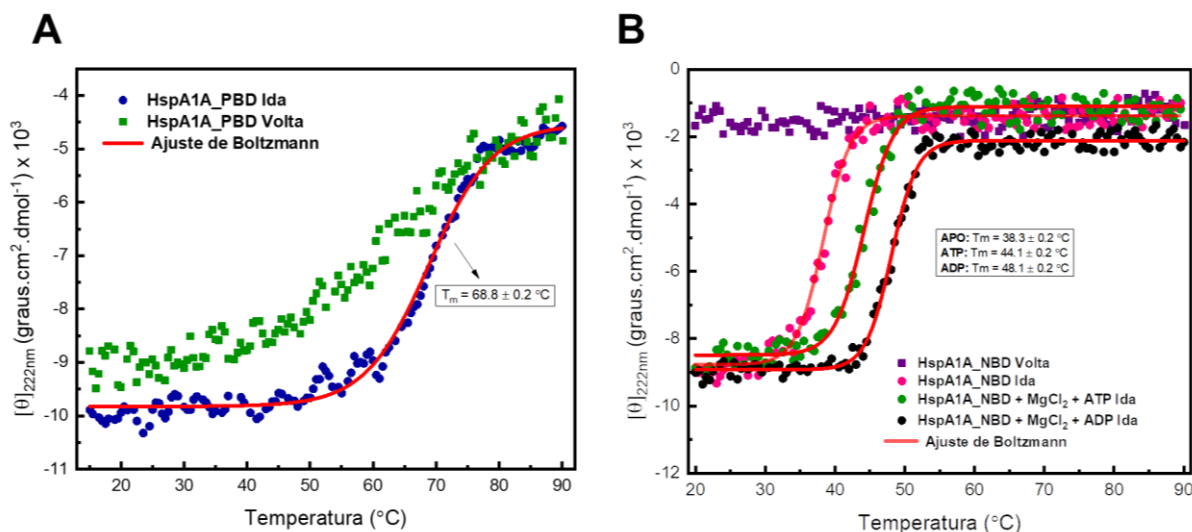
#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DAS PROTEÍNAS

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados com o objetivo de compreender a estrutura e organização dos domínios individualmente. Foram realizados experimentos de desenovelamento térmico monitorado por Espectropolarimetria de CD em 222 nm ( $CD_{222nm}$ ) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). Para a proteína HspA1A\_NBD, foram realizados na ausência e na presença de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e do cofator  $Mg^{2+}$ .

A proteína HspA1A\_PBD, submetida a desnaturação térmica monitorada por  $CD_{222nm}$ , 15 °C a 90 °C, desenovelou por meio de uma única transição no intervalo entre 65 °C e 75 °C, com temperatura do ponto médio de transição ( $T_m$ ) =  $69,3 \pm 0,2$  °C (Figura 11A).

Já a proteína HspA1A\_NBD, também monitorada por  $CD_{222nm}$ , em sua forma apo apresentou uma única transição no intervalo entre 35 °C e 45 °C, com  $T_m = 38,4 \pm 0,2$  °C. Quando incubada com ATP e ADP, na presença do cofator  $Mg^{2+}$ , apresentou aumento na estabilidade térmica, respectivamente, com  $T_m = 44,4 \pm 0,2$  °C e com  $T_m = 48,2 \pm 0,2$  °C (Figura 11B). No caso da primeira proteína supracitada, o desenovelamento térmico se mostrou parcialmente reversível para a primeira transição. Já a segunda, se mostrou irreversível na ausência e na presença de ATP e ADP e do cofator  $Mg^{2+}$ .

**Figura 12. Curvas de desenovelamento térmico das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD monitoradas por CD<sub>222nm</sub>.** (A) A proteína HspA1A\_PBD apresentou única transição no intervalo entre 65 °C e 75 °C, com  $T_m = 69,3 \pm 0,2$  °C, mostrando-se parcialmente reversível para esta transição. (B) A proteína HspA1A\_NBD apresentou única transição no intervalo entre 35 °C e 45 °C, com  $T_m = 38,4 \pm 0,2$  °C. Quando incubada com ATP e ADP, na presença do cofator  $Mg^{2+}$ , apresentou maior estabilidade térmica, respectivamente, com  $T_m = 44,4 \pm 0,2$  °C e com  $T_m = 48,2 \pm 0,2$  °C, mostrando-se irreversível para as três condições.

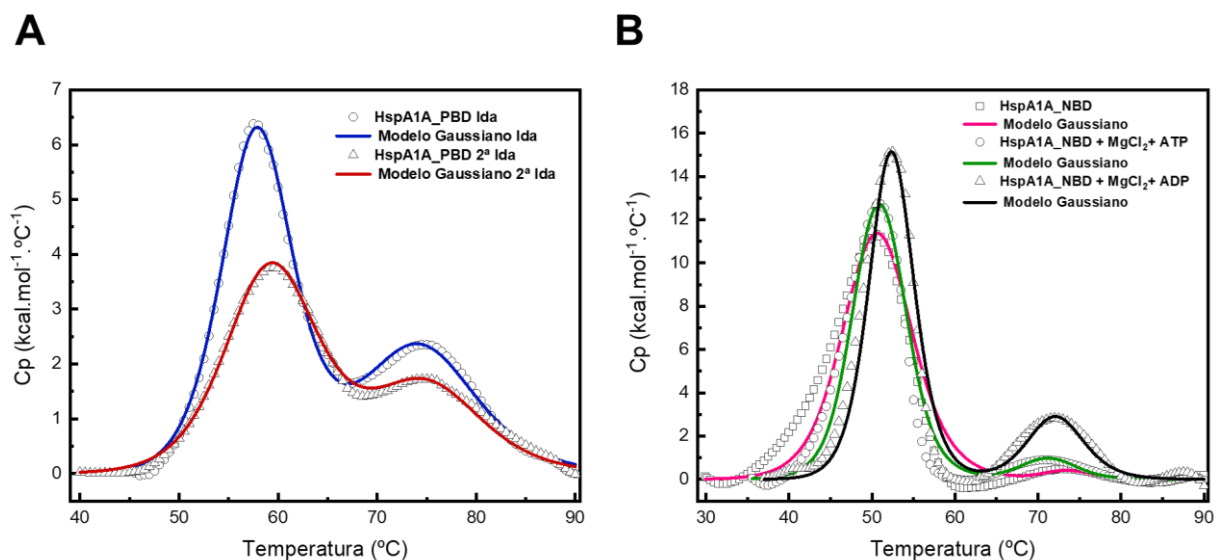


Fonte: Autoria própria.

As proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD, correspondentes ao PBD e NBD da canônica HspA1A, apresentam únicas transições de desenovelamento térmico, a primeira mostrando-se parcialmente reversível e a segunda, irreversível na ausência e na presença de ATP e ADP e do cofator  $Mg^{2+}$ . Foi observado para a canônica HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006) três transições de desenovelamento térmico, em aproximadamente,  $T_m = 46, 68$  e  $82$  °C, mostrando-se parcialmente irreversível. Além disso, como observado para a canônica HspA1A e as homólogas HspA8 e HspA9 (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; DORES-SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021), a presença de ATP e ADP e o cofator  $Mg^{2+}$ , aumenta a estabilidade térmica, relacionado ao NBD.

Como via de obter mais informações à cerca do desenovelamento térmico das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD, utilizando como sonda a estrutura terciária, foram realizados experimentos de DSC. A HspA1A\_PBD, após o termograma coletado, a proteína presente na cela foi novamente submetida ao desenovelamento térmico, a fim de avaliar a parcial reversibilidade observada (Figura 13A). Já para a proteína HspA1A\_NBD, também foram realizados na ausência e na presença de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e do cofator  $Mg^{2+}$  (Figura 13B).

**Figura 13. Termogramas das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD monitoradas por DSC.** (A) A proteína HspA1A\_PBD apresentou duas transições. A 2ª Ida correspondente a proteína presente na cela, novamente submetida ao desenovelamento térmico, indicando a parcial irreversibilidade da proteína. (B) A proteína HspA1A\_NBD apresentou duas transições. Quando incubada com ATP e ADP, na presença do cofator  $Mg^{2+}$ , apresentou maior estabilidade térmica, observada na segunda transição para ambos. Porém, na presença de ADP e  $Mg^{2+}$ , a estabilidade das transições são mais pronunciadas, indicando maior afinidade a esse nucleotídeo.



**Fonte:** Autoria própria.

O termograma da HspA1A\_PBD (A) apresenta duas transições, a  $T_{m1} = 57,9 \pm 0,3$  °C e a  $T_{m2} = 74,3 \pm 0,2$  °C. Após ser novamente submetida ao desenovelamento térmico, a proteína continua apresentando duas transições, sendo elas a  $T_{m1} = 59,5 \pm 0,2$  °C e a  $T_{m2} = 75,1 \pm 0,5$  °C. O termograma da 2ª Ida, indica a parcial irreversibilidade da proteína, apresentando uma pequena alteração na estabilidade térmica da 1ª transição, provável indicativo do arranjo estrutural oligomérico que a proteína admite após o reenovelamento, ao retomar à temperatura inicial. As áreas integrais dos picos também indicam que a irreversibilidade da proteína é parcial, visto que, a 1ª transição apresenta, na ida (primeira corrida) e na volta, respectivamente, áreas integrais de, aproximadamente, 43,7 e 11,5, enquanto para a 2ª transição, áreas integrais de 28,8 e 4,1.

O termograma da HspA1A\_NBD (B) na ausência e na presença de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e do cofator  $Mg^{2+}$ , apresenta duas transições de desenovelamento térmico e observa-se diferentes comportamentos na presença dos nucleotídeos. A  $T_{m1}$ , respectivamente, para as condições apo, na presença de ATP e ADP, é de  $50,7 \pm 0,5$  °C,  $50,9 \pm 0,4$  °C e  $52,4 \pm 0,4$  °C. O termograma e os parâmetros obtidos sugerem que na presença de ATP,

a proteína apresenta aumento na capacidade calorífica ( $C_p$ ), ou seja, a HspA1A\_NBD na presença de ATP e do cofator  $Mg^{2+}$ , apresenta maior quantidade de calor em relação a variação de temperatura sofrida (GILL, P., MOGHADAM, T. T., RANJBAR, B., 2010). Observa-se o mesmo para a proteína na presença de ADP do cofator  $Mg^{2+}$ . Além da alteração da  $C_p$ , na presença desses, a proteína torna-se, aproximadamente, 2 °C mais estável, em comparação as outras condições. A  $T_{m2}$ , respectivamente, para as condições apo, na presença de ATP e ADP, é de  $73,6 \pm 0,2$  °C,  $71,3 \pm 0,3$  °C e  $72,2 \pm 0,3$  °C. Observa-se, novamente, alterações na  $C_p$  nas condições na presença de ATP e ADP e as transições referentes a elas mostram-se menos estáveis quando comparadas à forma apo.

Os parâmetros obtidos por CD, normalizados para elipticidade molar residual e ajustados por Boltzmann e os por DSC, por meio do *Software NanoAnalyse* empregando o modelo gaussiano foram organizados na Tabela 8.

**Tabela 8. Parâmetros de estabilidade térmica das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD.** Valores de  $T_m$  obtidos pelas técnicas de  $CD_{222nm}$  e DSC e valores de  $\Delta H_{app}$  por DSC.

Proteínas	Dicroísmo Circular ( $CD_{222nm}$ )	Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)			
	$T_{m1}$ (°C)	$T_{m1}$ (°C)	$\Delta H_{app1}$ (kJ/mol)	$T_{m2}$ (°C)	$\Delta H_{app2}$ (kJ/mol)
HspA1A_PBD	$69,3 \pm 0,2$	$57,9 \pm 0,3$	$91 \pm 10$	$74,3 \pm 0,2$	$62 \pm 10$
HspA1A_PBD “Volta”	—	$59,5 \pm 0,2$	$105 \pm 10$	$75,1 \pm 0,5$	$70 \pm 10$
HspA1A_NBD	$38,4 \pm 0,2$	$50,7 \pm 0,5$	$76 \pm 10$	$73,6 \pm 0,2$	$135 \pm 10$
HspA1A_NBD + ATP + $MgCl_2$	$44,4 \pm 0,2$	$50,9 \pm 0,4$	$100 \pm 10$	$71,3 \pm 0,3$	$108 \pm 10$
HspA1A_NBD + ADP + $MgCl_2$	$48,2 \pm 0,2$	$52,4 \pm 0,4$	$116 \pm 10$	$72,2 \pm 0,3$	$104 \pm 10$

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios indicam que a proteína a HspA1A\_PBD é parcialmente reversível e apresenta duas transições (visto por DSC) que, provavelmente, corresponde aos subdomínios PBD- $\beta$  e o PBD- $\alpha$ . Já a HspA1A\_NBD, na presença dos nucleotídeos, por  $CD_{222nm}$ , tornou-se mais estável, como é reportado e atribuído ao NBD (DORES-SILVA *et al.*, 2015; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). Pela técnica de DSC foram observadas duas transições, sendo a  $T_{m2}$  menos estável na presença dos nucleotídeos. Vale ressaltar que as técnicas avaliam o desenovelamento térmico por diferentes condições estruturais. Os dados observados podem inferir que a parcial irreversibilidade e as transições observadas no intervalo entre 65 °C e

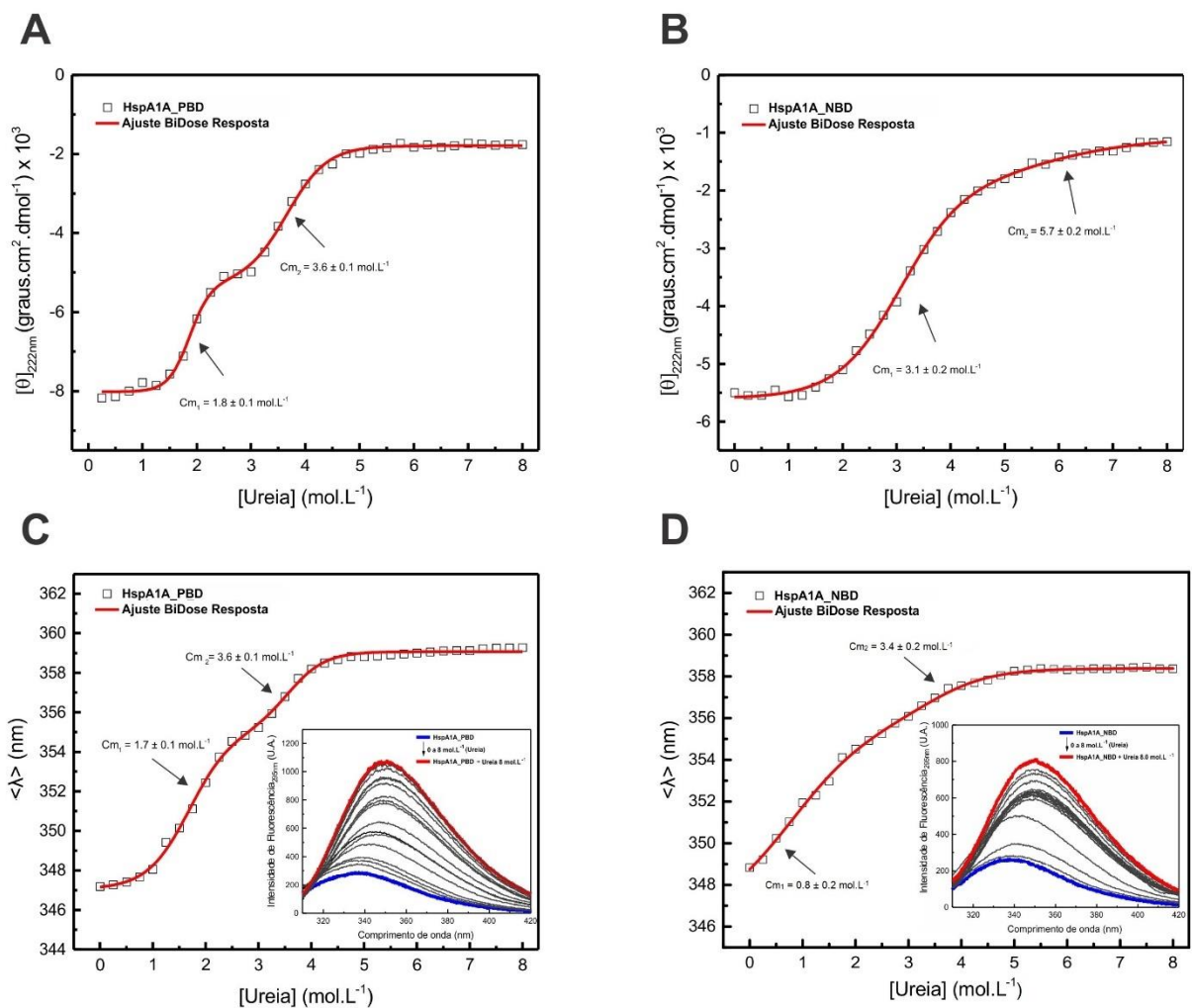
85 °C para a proteína completa (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), são referentes ao domínio PBD auxiliando na estabilização da estrutura terciária correspondente ao NBD.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DAS PROTEÍNAS

Com o objetivo de comparar a estabilidade química seguindo a estrutura secundária por CD<sub>222nm</sub> e a estrutura terciária pela emissão de Fluorescência Intrínseca do Triptofano (excitação 295 nm). Para os ensaios, a HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD foram incubadas overnight com diferentes concentrações de Ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>) e monitoradas pelas técnicas supracitadas, a fim de obter-se as C<sub>m</sub> para as proteínas. O uso do agente desnaturante ureia justifica-se devido seu caráter não-iônico, retirando as moléculas de água por meio de interações com os resíduos carregados das cadeias laterais das proteínas (HAMBORG *et al.*, 2020).

A Figura 14 (A e B) apresenta as curvas de desenovelamento monitoradas por CD<sub>222nm</sub>. A proteína HspA1A\_PBD apresenta duas transições proeminentes com C<sub>m</sub> = 1,8 ± 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e C<sub>m</sub> = 3,6 ± 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Já a proteína HspA1A\_NBD também apresenta duas transições, sendo a primeira mais acentuada, com C<sub>m</sub> = 3,1 ± 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e a segunda, com C<sub>m</sub> = 5,7 ± 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, mais discreta. Ao serem monitoradas por fluorescência, novamente, ambas as proteínas apresentaram duas transições (Figura 12C e D). A proteína recombinante correspondente à construção HspA1A\_PBD apresenta transições acentuadas, com C<sub>m1</sub> = 1,7 ± 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e C<sub>m2</sub> = 3,6 ± 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Já a construção HspA1A\_NBD, apresentando a primeira transição mais proeminente e a segunda mais sutil, com C<sub>m1</sub> = 0,8 ± 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e C<sub>m2</sub> = 3,4 ± 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Os dados sugerem que, seguindo o monitoramento por CD<sub>222nm</sub>, o NBD apresenta maior estabilidade química. E a partir do monitoramento pela fluorescência intrínseca do triptofano, o PBD apresenta maior estabilidade química.

**Figura 14. Estabilidade química das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD monitoradas por CD<sub>222nm</sub> e emissão de fluorescência intrínseca do triptofano.** Incubadas overnight com diferentes concentrações de Ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>) e realizado o ajuste BiDose Resposta. (A) Desenovelamento químico, monitorado por CD<sub>222nm</sub>, para a proteína HspA1A\_PBD, apresentando duas transições proeminentes com  $C_m = 1,8 \pm 0,1$  mol.L<sup>-1</sup> e  $C_m = 3,6 \pm 0,1$  mol.L<sup>-1</sup>. (B) Desenovelamento químico, monitorado por CD<sub>222nm</sub>, para a proteína HspA1A\_NBD, apresentando duas transições, sendo a primeira mais acentuada, com  $C_m = 3,1 \pm 0,2$  mol.L<sup>-1</sup> e a segunda, com  $C_m = 5,7 \pm 0,2$  mol.L<sup>-1</sup>, mais discreta. Os dados sugerem que, seguindo a estrutura secundária, o NBD apresenta maior estabilidade química. (C) Desenovelamento químico, monitorado por emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (295 nm), para a proteína HspA1A\_PBD, apresentando duas transições proeminentes com  $C_m = 1,7 \pm 0,1$  mol.L<sup>-1</sup> e  $C_m = 3,6 \pm 0,1$  mol.L<sup>-1</sup>. O gráfico incerto apresenta as curvas espectrais em diferentes concentrações de ureia a partir do qual foram calculados os  $\langle \lambda \rangle$ . (D) Desenovelamento químico, monitorado por emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (295 nm), para a proteína HspA1A\_NBD, apresentando duas transições duas transições, sendo a primeira mais acentuada, com  $C_m = 0,8 \pm 0,2$  mol.L<sup>-1</sup> e a segunda, com  $C_m = 3,4 \pm 0,2$  mol.L<sup>-1</sup>, mais discreta. O gráfico incerto apresenta as curvas espectrais em diferentes concentrações de ureia a partir do qual foram calculados os  $\langle \lambda \rangle$ . Os dados sugerem que os domínios apresentam estabilidade química parcialmente similares.



Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros de  $C_m$  obtidos pelas técnicas (ajustados por BiDose Resposta) foram organizados na Tabela 9.

**Tabela 9. Parâmetros de estabilidade química das proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD.** Valores de  $C_m$  obtidos pelas técnicas de CD e de Fluorescência Intrínseca do Triptofano (295nm) incubadas com diferentes concentrações de Ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>).

Proteínas	Fluorescência intrínseca do triptofano (295 nm)*		CD <sub>222nm</sub> *	
	$C_{m1}$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$C_{m2}$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$C_{m1}$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$C_{m2}$ (mol.L <sup>-1</sup> )
HspA1A_PBD	1,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1
HspA1A_NBD	3,1 ± 0,2	5,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	3,4 ± 0,2

\*Técnica realizada utilizando diferentes concentrações de ureia (0 – 8 mol.L<sup>-1</sup>).

**Fonte:** Autoria própria.

As proteínas que apresentam desenovelamento com intermediários, espera-se a perda da estrutura 3° antes da 2°. Vale ressaltar que a sonda utilizada em cada experimento é diferente. De forma que, na técnica de CD<sub>222nm</sub> a sonda utilizada é global, referente a estrutura secundária das proteínas. Já na técnica de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano, utiliza-se uma sonda local, referente ao ambiente químico que os resíduos de W se encontram. Logo, ao observarmos os parâmetros obtidos para a HspA1A\_PBD, estes, aproximadamente iguais, dentro do erro experimental, os dados sugerem que, em ambas as técnicas utilizadas, a primeira transição pode estar relacionada ao subdomínio PBD-β e o segunda ao subdomínio PBD-α, visto que, a segunda apresenta considerável quantidades de α-hélices e o único resíduo de W presente no PBD encontra-se na posição W580, nesse subdomínio, desenovelando-se em um mecanismo sequencial.

Segundo Hamborg e colaboradores (2014), as transições mais proeminentes são características de eventos cooperativos, ou seja, a perda de estrutura de uma região da proteína é responsável por desestabilizar as demais. Portanto, os dados sugerem que a HspA1A\_PBD apresenta desenovelamento químico cooperativo e a HspA1A\_NBD parcialmente cooperativo ou gradual. Os dados observados, mostrando que os domínios apresentam diferentes estabilidades químicas, corroboram com os dados obtidos para a canônica HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006) e as homólogas HspA8 e HspA9 (DORES-SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021), que apresentam diferentes estabilidades e estas estão relacionadas ao comportamento individual dos domínios.

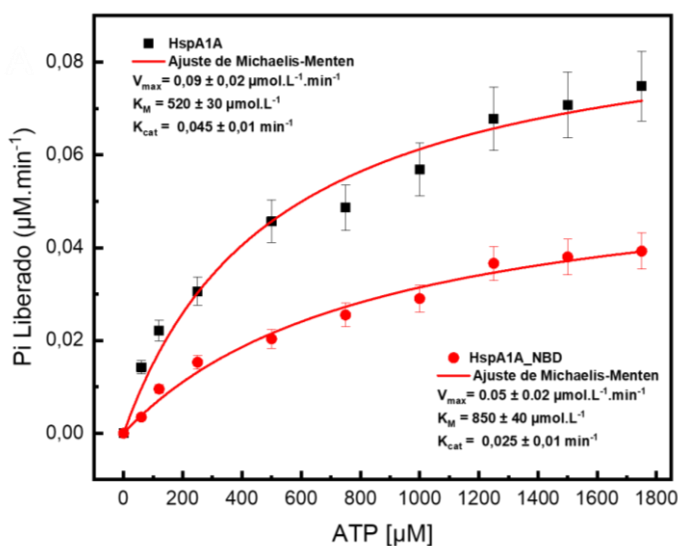


## 4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA DO NBD EM COMPARAÇÃO A CANÔNICA

Os experimentos de Atividade ATPásica foram realizados possibilitando a obtenção dos parâmetros cinéticos através do ajuste do modelo não linear de Michaelis-Menten e as curvas apresentadas na Figura 15. Vale ressaltar que, como comentado na Introdução, as Hsp70 hidrolisam ATP em ADP e Pi no direcionamento de ação durante o ciclo funcional.

Os dados cinéticos sugerem o NBD e a canônica HspA1A estavam funcionais e exibiram atividade enzimática, ou seja, ocorreu a hidrólise do ATP.

**Figura 15. Curvas de Atividade Enzimática da proteína humana HspA1A e seu NBD sob as mesmas condições experimentais.** As proteínas HspA1A (pH = 8,0) e HspA1A\_NBD ( $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram incubadas com moléculas de ATP por 40 min a  $30^\circ\text{C}$ , e a taxa de hidrólise do ATP foi monitorada pelo Pi liberado. As curvas obtidas foram ajustadas e obteve-se os parâmetros cinéticos apresentados na figura. Os valores sugerem que o domínio PBD é importante para o desempenho da função biológica da HspA1A e que as proteínas apresentam menor cinética enzimática quando comparadas a outras homólogas.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 10. Parâmetros Cinéticos obtidos da atividade ATPásica das proteínas HspA1A\_NBD, HspA1A (pH = 8,0) e outras proteínas da família das Hsp70, inclusive, a canônica HspA1A em outras condições experimentais.**

Proteínas	Parâmetros Cinéticos				
	$K_M$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol.min}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_M$ ( $\eta\text{M.min}^{-1}$ )	Referências
HspA1A_NBD	850 ± 40	0,05 ± 0,02	0,025 ± 0,01	0,03 ± 0,04	Este estudo.
HspA1A (pH = 8,0)	520 ± 30	0,09 ± 0,02	0,045 ± 0,01	0,08 ± 0,03	Este estudo.
HspA8	250 ± 20	0,88 ± 0,02	0,44 ± 0,01	1,8 ± 0,4	SILVA <i>et. al.</i> , 2021).
HspA9	190 ± 20	0,38 ± 0,01	0,151 ± 0,001	0,79 ± 0,05	DORES-SILVA <i>et. al.</i> , 2015).
HspA1A (pH = 7,5)	270 ± 40	0,21 ± 0,01	0,093 ± 0,004	0,34 ± 0,1	DORES-SILVA <i>et. al.</i> , 2015).
Oligômeros de alta massa molecular da HspA1A	120 ± 16	0,17 ± 0,01	0,085 ± 0,005	0,7 ± 0,1	KIRALY <i>et. al.</i> , 2020).

Fonte: Autoria própria.

Observando os valores obtidos de  $K_M$  para o NBD, os dados complementam a literatura, visto que o domínio PBD é importante para o desempenho da função biológica da HspA1A, de forma que ele é responsável pela ligação da proteína-cliente (TAKAKUWA *et al.*, 2019). Ao compararmos os dados observados para a canônica HspA1A (em outras condições experimentais, pH = 7,5), as homólogas HspA8 e HspA9 e os oligômeros de alta massa molecular da HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; DORES-SILVA *et al.*, 2015; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), os valores obtidos no presente estudo são maiores, indicando menor cinética enzimática.

Os valores de  $V_{\text{max}}$  obtidos em comparação a canônica HspA1A (pH = 7,5), as homólogas HspA8 e HspA9 e os oligômeros de alta massa molecular da HspA1A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; DORES-SILVA *et al.*, 2015; KIRALY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), estes maior que os obtidos no presente estudo, indicam que a HspA1A e o seu domínio, em condições de incubação a 30°C, apresentam uma menor constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) e, conseqüentemente, a uma menor eficiência enzimática ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ).

Como já reportado na literatura, a família das Hsp70 apresenta baixa taxa de hidrólise de ATP, visto a necessidade de auxílio de co-chaperonas e proteínas-clientes para estímulo dessas (SILVA *et al.*, 2021; MITRA *et al.*, 2022). Logo, justifica-se os valores obtidos e a baixa atividade enzimática. Os dados anteriores corroboram com os dados obtidos na Atividade ATPásica, visto a baixa interação e hidrólise do ATP.

## 5. CONCLUSÕES

A investigação dos domínios independentes é interessante, da perspectiva estrutural e funcional, em comparação aos estudos da proteína canônica. A análise comparativa desses domínios, oriundos de diferentes proteínas homólogas, pode auxiliar na compreensão das especificidades inerentes às Hsp70.

A identidade sequencial encontrada entre o PBD e o NBD das proteínas HspA9, HspA5, HspA1A é moderada. Entre as proteínas HspA1A e HspA8, ambas citosólicas, a identidade sequencial é alta.

As proteínas HspA1A\_PBD e HspA1A\_NBD recombinantes, foram expressas e obtidas com grau de pureza > 95%, solúveis e enovelados (estruturas secundária e terciária).

A proteína HspA1A\_PBD apresenta conteúdo de estrutura secundária majoritário folhas- $\beta$  e a HspA1A\_NBD majoritário em hélices- $\alpha$ .

O resíduo de triptofano, em ambas as proteínas, se localiza em ambientes parcialmente protegidos do solvente.

Os dados sugerem que as proteínas recombinantes correspondentes às construções HspA1A\_NBD e HspA1A\_PBD se apresentam, respectivamente, como um oligômero levemente alongado em solução e como um monômero globular compacto em solução.

Em termos de estabilidade térmica, foi possível notar que o PBD se mostra parcialmente reversível e o NBD demonstra afinidade por nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) na presença do cofator  $Mg^{2+}$ .

Os dados observados podem indicar que o PBD auxilia na estabilização da estrutura terciária correspondente ao NBD na proteína completa.

Os domínios apresentam diferentes estabilidade químicas, corroborando com os dados obtidos para as proteínas completas homólogas, que apresenta diferentes estabilidades e estas estão relacionadas ao comportamento individual do PBD e do NBD.

Os domínios apresentam diferentes estabilidade químicas, corroborando com os dados obtidos para as proteínas completas homólogas, que apresenta diferentes estabilidades e estas estão relacionadas ao comportamento individual dos domínios PBD e NBD.

Em termos de estabilidade química, foram observados dois estágios de desenovelamento para ambas as proteínas. Os dados sugerem que a HspA1A\_PBD apresenta desenovelamento químico cooperativo e a HspA1A\_NBD parcialmente cooperativo ou sequencial.

O NBD foi obtido funcional e com baixa atividade ATPásica.

Os valores de  $K_M$  complementam a literatura, de forma que o domínio PBD é importante para o desempenho da função biológica da HspA1A sendo o responsável pela ligação da proteína-cliente.

As proteínas apresentam menor cinética enzimática quando comparadas a outras homólogas.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento: 88887.481208/2020-00”.

## REFERÊNCIAS

- ALBAKOVA, Z.; ARMEEV, G. A.; KANEVSKIY, L. M.; KOVALENKO, E. I.; SAPOZHNIKOV, A. M. HSP70 multi-functionality in Cancer. **Cells**, Basel, v. 9, n. 3, p. 587-613, 2020;
- ANDRADE, H.; AREA, I.; NIETO, J. J.; TORRES, A. The number of reduced alignments between two DNA sequences. **BMC Bioinformatics**, London, v. 15, n. 94, 2014;
- ANFENSEN, C. B.; HARRINGTON, W. F.; HVIDT, A.; LINDERSTRØM-LANG, K.; OTTESEN, M.; SCHELLMAN, J. Studies on the structural basis of ribonuclease activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 141-42, 1955;
- ANGELIDIS, C. E.; LAZARIDIS, I.; PAGOULATOS, G. N. Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 259, n. 1-2, p. 505-12, 1999;
- APRILE, F. A.; DHULESIA, A.; STENGEL, F.; ROODVELDT, C.; BENESCH, J. L. P.; 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, 2013;
- BALCHIN, D.; HAYER-HARTL, M.; HARTL, F. U. Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. **FEBS Letters**, Hoboken, v. 594, n. 17, p. 2770-2781, 2020;
- BARTH, H. G.; JACKSON, C.; BOYES, B. E. Size exclusion chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 12, p. 595-620, 1994;
- BATISTA, F. A. H.; GAVA, L. M.; PINHEIROS, G. M.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. From conformation to interaction: techniques to explore the Hsp70/Hsp90 network. **Current Protein & Peptide Science**, United Arab Emirates, v. 16, n. 8, p. 735-753, 2015;
- BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992;
- BORGES, J. C. **Estudos estruturais do sistema chaperone molecular Hsp70 humano**. 2004. 236p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. **BMB Reports**, Yeoksam-Dong, v. 42, n. 3, p. 166-171, 2009;
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein & Peptide Letters**, United Arab Emirates, v. 12, n. 3, p. 257-261, 2005;
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Washington, v. 452, n. 1, p. 46-54, 2006;

BROCCHIERI, L.; MACARIO, E. C.; MACARIO, A. J. L. Hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, n. 19, 2008;

BUCHNER, J. Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC reviews thematic series. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 294, n. 6, p. 2074-2075, 2019;

BUCHNER, J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. **The FASEB Journal**, Hoboken, v. 10, n. 1, p. 10-19, 1996;

BURGESS, R. R. A brief practical review of size exclusion chromatography: rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein Expression Purification**, San Diego, v. 150, p. 81-85, 2011;

CHAPLOT, K.; JARVELA, T. S.; LINDBERG, I. Secreted chaperones in neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, Lausanne, v. 12, n. 268, 2020;

CHAUDHURI, T. K.; PAUL, S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. **The FEBS Journal**, Hoboken, v. 273, n. 7, p. 1331-1349, 2006;

CORREA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, Nigeria v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009;

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein & Peptide Letters**, United Arab Emirates, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2011;

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

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 Biotechnology**, London, v. 7, p. 32-41, 2007;

DORES-SILVA, P. R.; BARBOSA, L. R. S.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-24, 2015;

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

DORES-SILVA, P. R.; NISHIMURA, L. S.; KIRALY, V. T. R.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* mitochondrial Hsp70: similarities and dissimilarities to human orthologues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Washington, v. 613, p. 43-52, 2017;

- EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967;
- EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophysical Journal**, Washington v. 66, n. 2 (pt. 1), p. 482-501, 1994;
- 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. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 292, n. 36, p. 14765-14774, 2017;
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R.; VALPUESTA, J. M. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. **F1000Research**, London, v. 7, p. 1497-1507, 2018;
- FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006;
- 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, 2013;
- GARG, V. K.; AVASHTHI, H.; TIWARI, A.; JAIN, P. A.; RAMKETE, P. W.; KAYASTHA, A. M.; SINGH, V. K. MFPI – multi FASTA protparam interface. **Bioinformatics**, India, v. 12, n. 2, p. 74-77, 2016;
- GHOSH, R. K.; KAR, T.; DUTTA, B.; PATHAK, A.; RAKSHIT, R.; BASAK, R.; DAS, A.; WAHEEDA, K.; BASAK, P.; BHATTACHARYYA, M. Aberration in the structural paradigm of lens protein a crystallin by UV-C irradiation. **Applied Biological Chemistry**, Republic of Korea, v. 61, n. 3, p. 281-287, 2018;
- GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, Dordrecht, n. 4, p. 167 - 193, 2010;
- HAMBORG, L.; HORSTED, E. W.; JOHANSSON, K. E.; WILLEMOËS, M.; LINDORFF-LARSEN, K.; TEILUM, K. Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 605, 2020;
- HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 421-438, 2020;
- IRVINE, G. B. Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration). **Current Protocols in Cell Biology**, Washington, v. 5, n. 5.5, p. 1-16, 2011;
- KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010;

KAMPINGA, H. H.; HAGEMAN, J.; VOS, M. J.; KUBOTA, H.; TANGUAY, R. M.; BRUDFORD, E. A.; CHEETHAM, M. E.; CHEN, B.; HIGHTOWER, L. E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 105-11, 2008;

KARABENCHEVA-CHRISTOVA, T. G.; CARLSSON, U.; BALALI-MOOD, K.; BLACK, G. W.; CHRISTOV, C. Z. Conformational effects on the circular dichroism of human carbonic anhydrase II: a multilevel computational study. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, 2013;

KARLIN, S.; BROCCHERI, L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 47, n. 5, p. 565-577, 1998;

KASIOUMI, P.; VRAZELI, P.; VEZYRAKI, P.; ZERIKIOTIS, S.; KATSOURAS, C.; DAMALAS, A.; ANGELIDIS, C. Hsp70 (HSP70A1A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 54, p. 821-832, 2019;

KELLY, J. W. Does protein aggregation drive postmitotic tissue degeneration? **Science Translational Medicine**, Washington, v. 13, n. 577, 2021;

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005;

KIM, E. Y.; HIPPEL, M. S.; HAYER-HARTL, A. B. M.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 82, p. 323-355, 2013;

KIM, T. K.; NA, H. J.; LEE, W. R.; JEOUNG, M. H.; LEE, S. Heat shock protein 70-1A is a novel angiogenic regulator. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 469, p. 222-228, 2016;

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. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 320-331, 2020;

KOHLER, V., ANDRÉASSON, C. Hsp70-mediated quality control: should i stay or should i go? **Biological Chemistry**, Berlin, v. 401, n. 11, p. 1233-1248, 2020;

KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 20, p. 681-697, 2019;

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

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Boston: Springer, 2006; 954p.



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

LUCAS, T. G.; HENRIQUES, B. J.; RODRIGUES, J. V.; BROSS, P.; GREGERSEN, N.; GOMES, C. M. Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1812, n. 12, p. 1658-1663, 2011;

MACARIO, A. J. L.; DE MACARIO, E. C. Chaperonins in cancer: expression, function, and migration in extracellular vesicles. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. S1044-579X, n. 21, p. 00159-00170, 2021;

MARGULIES, D. H.; TAYLOR, D. K.; JIANG, J.; BOYD, L. F.; AHMAD, J.; MAGE, M. G.; NATARAJAN, K. Chaperones and catalysts: how antigen presentation pathways cope with biological necessity. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 13, p. 859782, 2022;

MATHIEU, C.; PAPPU, R. V.; TAYLOR, J. P. Beyond aggregation: pathological phase transitions in neurodegenerative disease. **Science**, Washington, v. 370, n. 6512, p. 56-60, 2020;

MAYER, M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 38, n. 10, p. 507-514, 2013;

MAYER, M. P.; GIERASCH, L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 294, n. 6, p. 2085-2097, 2019;

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

MISRA, P. P.; KISHORE, N. Biophysical analysis of partially folded state of  $\alpha$ -lactalbumin in the presence of cationic and anionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, Washington, v. 354, n. 1, p. 234-247, 2011;

MITRA, R.; WU, K.; LEE, C.; BARDWELL, J. C. A. ATP-independent chaperones. **Annual Review of Biophysics**, Washington, v. 51, p. 409-429, 2022;

MULTHOFF, G.; SHEVTSOV, M.; HUILE, G. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 373, 2017;

NARGESI, A. A.; SHALCHI, M.; NARGESI, R. A.; SADEGHPOUR, N.; ZARIFKAR, M.; MOZAFFARI, M.; IMANI, M.; ESTEGHAMATI, A.; NAKHJAVANI, M. The lost correlation between heat shock protein 70 (HSPA1A) and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with type 2 diabetes and albuminuria. **Cell Stress Chaperones**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 361-375, 2016;

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger** – princípios de bioquímica. 4. ed.. São Paulo, Sarvier, 2006, 1202p.

- NOBLE, J. E. Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes. **Methods Enzymology**, Madison, v. 536, p. 17-26, 2014;
- NONG, W.; HUANG, F.; MAO, F.; LAO, D.; GONG, Z.; HUANG, W. DCAF12 and HSPA1A may serve as potential diagnostic biomarkers for myasthenia gravis. **BioMed Research International**, London, , v. 2022, p. 8587273, 2022;
- PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, Hoboken, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995;
- PENG, C.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Protein transmission in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, Berlin, v. 16, n. 4, p. 199-212, 2020;
- RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress Chaperones**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016;
- RAUCH, J. N.; GESTWICKI, J. E. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 289, n. 3, p. 1402-1414, 2014;
- ROSAS, P. C.; NAGARAJA, G. M.; KAUR, P.; PANOSSIAN, A.; WICKMAN, G.; GARCIA, L. R.; AL-KHAMIS, F. A.; ASEA, A. A. A. Hsp72 (HSPA1A) prevents human islet amyloid polypeptide aggregation and toxicity: a new approach for type 2 diabetes treatment. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0149409, 2016;
- SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 14, n. 10, p. 630-642, 2013;
- SCHAFFERT, L. N.; CARTER, W. G. Do post-translational modifications influence protein aggregation in neurodegenerative diseases: a systematic review. **Brain Sciences**, Basel, v. 10, n. 4, p. 232-262, 2020;
- SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, Berlin, v. 1, p. 16-22, 2006;
- SCHOPF, F. H.; BIELBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 18, n. 6, p. 345-360, 2017;
- SERAPHIM, T. V.; GAVA, L. M.; MOKRY, D. Z.; CAGLIARI, T. C.; BARBOSA, L. R. S.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Washington, v. 565, p. 57-67, Jan 2015;
- SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The Interaction networks of Hsp70 and Hsp90 in the plasmodium and leishmania parasites. In: HOURY, W. A., (ed) **The molecular chaperones interaction networks in protein folding and degradation** New York: Springer, 2014 p. 445-481;

SERLIDAKI, D.; WAARDE, M. A. W. H. V.; ROHLAND, L.; WENTINK, A. S.; DEKKER, S. L.; KAMPHUIS, M. J.; BOERTIEN, J. M.; BRUNSTING, J. F.; NILLEGODA, N. B.; BUKAU, B.; MAYER, M. P.; KAMPINGA, H. H.; BERGINK, S. Functional diversity between HSP70 paralogs caused by variable interactions with specific co-chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, , v. 295, n. 21, p. 7301-7316, 2020;

SHAO, H.; LI, X.; HAYASHI, S.; BERTRON, J. L.; SCHWARZ, D. M. C.; TANG, B. C.; GESTWICKI, J. E. Inhibitors of heat shock protein 70 (Hsp70) with enhanced metabolic stability reduce tau levels. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 1, n. 41, p. 128025, 2021;

SHARMA, D.; MASISON, D. C. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. **Protein & Peptide Letters**, United Arab Emirates, v. 16, n. 6, p. 571-581, 2009;

SHONHAI, A.; BOSHOFF, A.; BLATCH, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. **Protein Science**, Hoboken, v. 16, n. 9, p. 1803-1818, 2007;

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega for making accurate alignments of many protein sequences. **The Protein Society**, New York, v. 27, n. 1, p. 135-145, 2018;

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega. **Molecular Systems Biology**, Hoboken, v. 7, n. 539, 2011;

SILVA, N. S. M.; RODRIGUES, L. F. C.; DORES-SILVA, P. R.; MONTANARI, C. A.; RAMOS, C. H. I. R.; BARBOSA, L. R. S.; BORGES, J. C. Structural, thermodynamic and functional studies of human 71 kDa heat shock cognate protein (HSPA8/hHsc70). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - proteins and proteomics**, Amsterdam, v. 1869, n. 12, p. 140719, 2021;

SKERRA, A.; PFITZINGER, I.; PLUCKTHUN, A. The functional expression of antibody fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. **Bio-Technology**, New York, v. 9, n. 3, p. 273-278, 1991;

SMITH, H. L.; LI, W.; CHEETHAM, M. E. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 40, p. 142-52, 2015;

SMULDERS, L.; ALTMAN, R.; BRISENO, C.; SAATCHI, A.; WALLACE, L.; ALSEBAYE, M.; STAHELIN, R. V.; NIKOLAIDIS, N. Phosphatidylinositol monophosphates regulate the membrane localization of HSPA1A, a stress-inducible 70-kDa heat shock protein. **Biomolecules**, Basel, v. 12, n. 6, p. 856, 2022;

SŐTI, C.; NAGY, E.; GIRICZ, Z.; VÍGH, L.; CSERMELY, P.; FERDINANDY, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, Hoboken, v. 146, n. 6, p. 769-780, 2005;

STOTT, S. R.; WYSE, R. K.; BRUNDIN, P. Novel approaches to counter protein aggregation pathology in parkinson's disease. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 252, p. 451-492, 2020;

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. **Current Medicinal Chemistry**, United Arab Emirates, v. 14, n. 29, p. 3122-3138, 2007;

SULZBACHER, M. M.; SULZBACHER, L. M.; PASSOS, F. R.; BILIBIO, B. L. E.; ALTHAUS, W. F.; WEIZENMANN, L.; OLIVEIRA, K.; FRIZZO, M. N.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G. A single dose of eHSP72 attenuates sepsis severity in mice. **Scientific Reports**, Berlin, v. 10, n. 9198, 2020;

TAKAKUWA, J. E.; NIKITA; KNIGHTON, L. E.; TRUMAN, A. W. Oligomerization of Hsp70: current perspectives on regulation and function. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Lausanne, v. 6, n. 81, 2019;

THOMSON, J. A.; SHIRLEY, B. A.; PACE, C. N. Conformational stability and mechanism of folding of ribonuclease T1. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 264, n. 20, p. 11614-11620, 1989.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. I. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. **Protein & Peptide Letters**, United Arab Emirates, v. 18, n. 2, p. 101-109, 2011;

TIROLI-CEPEDA, A. O.; SERAPHIM, T. V.; PINHEIRO, G. M. S.; SOUTO, D. E. P.; KUBOTA, L. T.; BORGES, J. C.; BARBOSA, L. R. S.; RAMOS, C. H. I. Studies on the effect of the J-domain on the substrate binding domain (SBD) of Hsp70 using a chimeric human J-SBD polypeptide. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 111-120, 2019;

TITTELMEIER, J.; NACHMAN, E.; NUSSBAUM-KRAMMER, C. Molecular chaperones: A double-edged sword in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, Lausanne, v. 12, n. 581374, 2020;

TUKAJ, S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: insights into autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 5, p. 5298, 2020;

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. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, 2020;

WALERYCH, D.; OLSZEWSKI, M. B.; GUTKOWSKA, M.; HELWAK, A.; ZYLICZ, M.; ZYLICZ, A. Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. **Oncogene**, London, v. 28, n. 48, p. 4284-4294, 2009;

WALTER, S.; BUCHNER, J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. **Angewandte Chemie International Edition in English**, Weinheim, v. 41, n. 7, p. 1098-1113, 2002;

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 3RD, 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;

WU, S.; DU, L. Protein Aggregation in the pathogenesis of ischemic stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Poitiers , v. 41, n. 6, p. 1183-1194, 2020;

XU, H. Non-equilibrium protein folding and activation by ATP-driven chaperones. **Biomolecules**, Basel, v. 12, n. 6, p. 832, 2022;

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, , v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998;

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;

ZININGA, T.; ACHILONU, I.; HOPPE, H.; PRINSLOO, E.; DIRR, H. W.; SHONHAI, A. Overexpression, purification and characterization of the *Plasmodium falciparum* Hsp70-z (PfHsp70-z) protein. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, 2015;

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. **The EMBO Journal**, Hoboken, v. 36, n. 6, p. 783-796, 2017.