

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química de São Carlos

Vanessa Kiraly Thomaz Rodrigues

Caracterização estrutural e funcional dos complexos  
supramoleculares das proteínas humanas HSPA1A e HSPA9 e  
avaliação do efeito da co-chaperona hHep1

São Carlos

2021

Vanessa Kiraly Thomaz Rodrigues

Caracterização estrutural e funcional dos complexos  
supramoleculares das proteínas humanas HSPA1A e HSPA9 e  
avaliação do efeito da co-chaperona hHep1

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química  
de São Carlos da Universidade de São Paulo como  
parte dos requisitos para obtenção do título de doutora  
em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2021

## Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

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:** *Vanessa K. S. Rodrigues*  
**Data:** 29/10/2021

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

Rodrigues, Vanessa Kiraly Thomaz

Caracterização estrutural e funcional dos complexos supramoleculares das proteínas humanas HSPA1A e HSPA9 e avaliação do efeito da co-chaperona hHep1 / Vanessa Kiraly Thomaz Rodrigues. — São Carlos, 2021.  
83 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

1. HSPA1A. 2. HSPA9. 3. hHep1. 4. Complexos supramoleculares. 5. Remodelamento. I. Título.

Sônia Alves - CRB: 4280/8



Aos meus pais Sérgio e Raquel, que se comprometeram inteiramente a priorizar a educação durante minha formação. Investiram dinheiro e muitas horas de dedicação, na certeza de que o estudo faria toda a diferença.

Obrigada pelo apoio incondicional.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTO

Vivemos em um país que historicamente não investe em ciência e educação. Em um momento em que uma pandemia assola a humanidade, aqui a ciência é desacreditada e diariamente questionada, principalmente por uma liderança política que representa o retrocesso e a irresponsabilidade. Por isso meu agradecimento inicial é aos **cientistas** que muito contribuíram para minha formação e vêm demonstrando muita resiliência para desempenhar seu papel fundamental em nossa sociedade. Continuar na pesquisa e educação frente à todo esse cenário é um sinal de resistência. Em especial, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Borges, que foi de extrema importância para o meu desenvolvimento e aos colegas do LBBP, que estiveram ao meu lado durante esses anos. Ao Dr. Paulo Roberto das Dores da Silva um agradecimento em particular, por ter iniciado o trabalho que aqui desenvolvi, por ter transmitido tanto conhecimento e doado a mim tanto de si. Ao Msc. Sérgio Ramos, à Dra. Karine Minari, à Dra. Fernanda Batista, à Dra. Silvia Libardi e à Dra. Milene Nóbrega meu muito obrigada por terem sido companheiros incríveis.

Agradeço também aos meus familiares pelo suporte durante todos os dias da minha vida. Em especial aos meus pais Sérgio e Raquel, que me incentivaram a perseguir meus sonhos, acreditando em meu potencial antes mesmo de mim; à minha irmã Juliana, que foi e sempre será meu primeiro exemplo e ao meu cunhado Maurício à quem agradeço demais pelo companheirismo.

Os muitos anos em São Carlos foram extremamente generosos comigo, fui agraciada convivendo com pessoas maravilhosas que se tornaram minha segunda família. Agradeço ao Handebol CAASO por ajudar na manutenção de minha saúde mental, em muitos momentos de dificuldade, e por me apresentar a amizades vitalícias. À República Cilada que foi minha casa por maravilhosos anos e onde convivi com os melhores companheiros. Cada um de vocês deixa muita saudade. Em especial gostaria de agradecer ao meu melhor amigo e companheiro Igor, pelos anos de suporte e por estar presente, sempre.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade de São Paulo agradeço pela estrutura e suporte acadêmico essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Apesar de você, amanhã há de ser outro dia”

(Chico Buarque)

## RESUMO

As chaperonas moleculares, também chamadas *Heat Shock Proteins* (Hsps), são importantes componentes da maquinaria celular, atuando no auxílio do enovelamento proteico, na estabilização de intermediários parcialmente enovelados, na maturação de proteínas, no transporte de proteínas por membranas, na marcação de proteínas para degradação, entre outras. Ainda as Hsps atuam evitando a formação de agregados que podem ser tóxicos ao meio celular, além de estarem associadas à algumas doenças como Alzheimer, Parkinson, doença de Creutzfeld-Jacob (príon), fibrose cística, e alguns tipos de câncer. Dentre as seis grandes famílias de chaperonas moleculares, se destaca a superfamília das Hsp70 que apresentam cerca de 40-60% de identidade entre seus membros eucariotos e procariotos, sendo requeridas em todos os organismos e compartimentos celulares. Em particular, a Hsp70 mitocondrial humana (HSPA9) está associada a funções como geração de energia, translocação de proteínas codificadas pelo DNA nuclear, resposta ao estresse, carcinogênese e envolvimento com doenças relacionadas ao envelhecimento. Já a Hsp70A humana induzível (HSPA1A) é uma proteína presente no citosol e núcleo que tem sua expressão aumentada durante eventos de estresse, restaurando e mantendo processos celulares. A propensão das Hsp70 a sofrer processos de oligomerização é bem estabelecida e esses complexos formados têm sido objeto de estudos, na busca de compreender o porquê se formam e como atuam. Nesse estudo foi revelado que os complexos supramoleculares das HSPA9 e HSPA1A apresentam estrutura organizada, com atividade ATPásica parcial. Ainda, a importância da co-chaperona hHep1 é evidenciada já que se mostrou ser capaz de interagir com as proteínas HSPA9 e HSPA1A em seus estados monoméricos e também com seus complexos supramoleculares, estimulando sua atividade ATPásica e remodelando os complexos. Foi observada a presença da co-chaperona em estruturas subnucleares, além de estar presente na mitocôndria, o que originou a hipótese de que a mesma pode atuar como co-chaperona para outras Hsp70, além da HSPA9. Finalmente, sugeriu-se que os complexos supramoleculares estudados podem atuar se auto protegendo, bem como as proteínas cliente, durante eventos de estresse e que a hHep1 modula a ação desses complexos, podendo aumentar a chance de superação do desafio imposto pelo estresse celular e evitando ou adiando a apoptose.

## ABSTRACT

Molecular chaperones, also named Heat Shock Proteins (Hsps), are an important component of the cellular machinery, acting to aid protein folding, stabilization of partially folded intermediates, protein maturation, protein transport across membranes, protein labeling for degradation, among others. Moreover, Hsps act by preventing the formation of aggregates that can be toxic to the cell environment, in addition to being associated with some diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Creutzfeld-Jacob (prion), cystic fibrosis, and some types of cancer. Among the six large families of molecular chaperones, the superfamily of Hsp70 stands out, presenting about 40-60% identity between its eukaryotic and prokaryotic members, being required in all organisms and cellular compartments. In particular, mitochondrial Hsp70 (HSPA9) is associated with functions such as energy generation, translocation of proteins encoded by nuclear DNA, stress response, carcinogenesis and involvement with age-related diseases. The inducible human Hsp70-1A (HSPA1A) is a protein present in the cytosol and nucleus and has its expression increased during stress events, restoring and maintaining cellular processes. The Hsp70's propensity to undergo oligomerization processes is well established and these complexes have been studied to understand why they form and how they act. In this study, it was revealed that the supramolecular complexes of HSPA9 and HSPA1A have an organized structure, with partial ATPase activity. Furthermore, the importance of the co-chaperone hHep1 is evidenced as it has been shown to be able to interact with HSPA9 and HSPA1A proteins in their monomeric states and also with their supramolecular complexes, stimulating their ATPase activity and remodeling the complexes. The presence of the co-chaperone in subnuclear structures was observed, in addition to being present in the mitochondria, which led to the hypothesis that it can act as a co-chaperone for other Hsp70, in addition to HSPA9. Finally, it was suggested that the studied supramolecular complexes can act by self-protection, as well as to client proteins, during stress events and that hHep1 modulates the action of these complexes, increasing the chance of overcoming the challenge imposed by cellular stress and avoiding or postponing apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de enovelamento proteico.....	- 16 -
Figura 2 - Representantes das seis famílias de Hsps. ....	- 17 -
Figura 3 – Esquema do ciclo de ação das Hsp70. ....	- 19 -
Figura 4 – Esquema representativo da estrutura da HSPA1A.....	- 21 -
Figura 5 - Esquema representativo da estrutura da HSPA9. ....	- 22 -
Figura 6- Estrutura da região central da proteína Tim15 de levedura (yHep1).....	- 26 -
Figura 7 - Esquema representando a estratégia para preparo do experimento de imunocitoquímica. ....	- 40 -
Figura 8 - Cinética de formação dos CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A. ....	- 41 -
Figura 9 - Purificação dos CSMs das HSPA1A e HSPA9. ....	- 42 -
Figura 10 - Avaliação da estrutura secundária dos monômeros e CSM das Hsp70 estudadas por CD.....	- 43 -
Figura 11 - Avaliação da estrutura terciária dos monômeros e CSMs das Hsp70 estudadas.....	- 45 -
Figura 12 - Ensaio de fluorescência com a sonda extrínseca ANS.. ....	- 46 -
Figura 13 – Experimento controle com tioflavina-T (Th-T). ....	- 47 -
Figura 14 - Cromatografia de exclusão por tamanho analítica.....	- 48 -
Figura 15 - Desenovelamento térmico acompanhado pelo DSC.....	- 50 -
Figura 16 – Gráfico representativo da alteração da Tm com relação à Hsp70 monomérica .....	- 51 -
Figura 17 – Interação da co-chaperona hHep1 com as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSM. ....	- 54 -
Figura 18 – Gráfico de assinatura termodinâmica obtida a partir dos experimentos de ITC.....	- 55 -
Figura 19 - Atividade ATPásica das Hsp70 e seus CSMs na ausência e presença da hHep1.....	- 57 -
Figura 20 – Visualização por negative stain da influência da hHep1 sobre os CSMs estudados. ....	- 60 -
Figura 21 - hHep1 reduz o tamanho dos CSMs de HSPA9 e HSPA1A de maneira dependente da concentração. ....	- 62 -
Figura 22 – Experimentos de filtração controle adicionais. ....	- 63 -

Figura 23 - Localização da chaperona HSPA9 endogéna e transfectada em células U2OS .....	- 64 -
Figura 24 – Localização da co-chaperona hHep1 endogéna e transfectada em células U2OS .....	- 65 -
Figura 25 - Localização da co-chaperona hHep1 total (endogéna e transfectada) em células U2OS.....	- 66 -
Figura 26 – Avaliação do comportamento das proteínas hHep1 total e HSPA9 transfectadas em células U2OS durante choque térmico, com e sem tempo de recuperação.. .....	- 67 -
Figura 27 - Esquema representativo da atuação da co-chaperona hHep1 sobre os CSM das HSPA9 e HSPA1A propostas neste trabalho. ....	- 70 -

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Relação de vetores de clonagem utilizados neste projeto.. .....	- 29 -
Tabela 2 - Proteínas utilizadas na mistura do padrão para aSEC. ....	- 34 -
Tabela 3 - Esquema do experimento indicando as transfecções, anticorpos usados, temperaturas e diferentes tempos de recuperação .....	- 40 -
Tabela 4 – Porcentagem de estrutura secundária de cada uma das proteínas, obtidas através do software CDNN.....	- 44 -
Tabela 5 - Dados resultantes do experimento de DSC. ....	- 52 -
Tabela 6 - Parâmetros experimentais obtidos por ITC. ....	- 56 -
Tabela 7 – Constantes catalíticas obtidas a partir dos experimentos de atividade ATPásica.....	- 58 -

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANS - 8-anilino-1-naftaleno ácido sulfônico
- aSEC – Cromatografia de exclusão molecular analítica (do inglês, *analytical size-exclusion chromatography*)
- BSA - do inglês, *Bovin Serum Albumin*
- CD – Espectropolarimetria de dicroísmo circular (do inglês, *circular dichroism*)
- CHIP – Co-chaperona que interage com o C-terminal da Hsp70 (do inglês, *carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*)
- CSM – Complexo supramolecular
- DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol, marcador fluorescente que se liga a regiões adenina-timina do DNA
- DLN - Domínio de ligação de nucleotídeo
- DLP - Domínio de ligação à proteína cliente
- DnaJ – Hsp40 de *Escherichia coli*
- DnaK – Hsp70 de *Escherichia coli*
- DSC – Calorimetria de varredura diferencial (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*)
- $f/f_0$  - coeficiente friccional
- FTNs - Fatores de troca de nucleotídeos
- GrpE – Co-chaperona das Hsp70 (do inglês, *groP-like gene E*)
- hHep1 – Co-chaperona da Hsp70 (do inglês, *human Hsp70 escort protein 1*)
- HOP – Co-chaperona das Hsp70 e Hsp90 (do inglês, *Hsp70-Hsp90 organizing protein*)
- HRP – Enzima *Horseradish Peroxidase*
- Hsc70 – do inglês, *Heat Shock Cognate 71 kDa Protein*
- HSPA1A – do inglês, *Heat Shock 70 kDa Protein Family A Member 1A*
- HSPA5 (BiP) – do inglês, *Heat Shock 70 kDa Protein Family A Member 5 (Binding-Immunoglobulin Protein)*
- HSPA9 – do inglês, *Heat Shock 70 kDa Protein Family A Member 9*
- Hsps – Proteínas de choque térmico (do inglês, *Heat Shock Proteins*)
- ITC – Calorimetria de titulação isotérmica (do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*)
- $K_a$  - Constante de associação
- $K_{av}$  - Coeficiente de partição
- $K_D$  - constante de dissociação
- LB - do inglês, *Lysogeny Broth*

$MM_{app}$  - massa molecular aparente

nR - número de resíduos de aminoácidos da proteína

$OD_{600nm}$  - densidade óptica medida no comprimento de onda de 600 nm

PACs – Centros de agregados proteico (do inglês, *Protein Aggregate Center*)

PBS - do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PDB – Banco de dados de proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*)

PQC - Controle de qualidade de proteínas (do inglês, *Protein Quality Control*)

$R_0$  - Raio de Stokes teórico obtido pelo software Sednterp

$R_s$  - Raio de Stokes experimental

SGs - Grânulos de estresse (do inglês, *Stress Granules*)

sHsp – do inglês, *small Hsp*

Tag-FLAG - sequência utilizada para marcar HSPA9 transfectada

Tag-HA - sequência utilizada para marcar hHep1 transfectada

Tag-Myc - sequência utilizada para marcar a Myc-Luciferase em experimento de Dot-Blot

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

Th-T - Tioflavina-T

TPR - Domínio *tetratricopeptide repeat*

U2OS - Células epiteliais de osteossarcoma ósseo humano

$V_0$  - *void* da coluna de gel filtração

$V_e$  - Volume de eluição da proteína

$V_{máx}$  – Velocidade máxima

$V_t$  - Volume total da coluna cromatográfica

$\theta_{EMR}$  - Elipticidade molar residual

$\theta_\lambda$  - Elipticidade

$\lambda_{máx}$  - Comprimento de onda da máxima emissão de fluorescência

$\langle\lambda\rangle$  - Centro de massa espectral

$\Delta G_{app}$  - Mudanças na energia livre de Gibbs aparente

$\Delta H_{app}$  - Mudanças na entalpia aparente

$\Delta S_{app}$  - Mudanças na entropia aparente

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	- 15 -
1.1 Chaperonas Moleculares .....	- 15 -
1.2 A família das Hsp70.....	- 18 -
1.2.1 HSPA1A .....	- 20 -
1.2.2 HSPA9.....	- 21 -
1.3 Propensão das Hsp70 à formação de complexos supramoleculares.....	- 23 -
1.4 Co-chaperonas.....	- 25 -
1.4.1 Hsp70 escort protein 1 (Hep1).....	- 26 -
2. OBJETIVOS .....	- 28 -
2.1 Objetivos específicos.....	- 28 -
3. METODOLOGIA .....	- 29 -
3.1 Construções e Clonagens.....	- 29 -
3.2 Obtenção das proteínas recombinantes .....	- 30 -
3.3 Estudo da cinética de agregação para preparo e isolamento de complexos supramoleculares .....	- 31 -
3.4 Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular.....	- 31 -
3.5 Avaliação da estrutura terciária local utilizando técnica de fluorescência intrínseca do triptofano .....	- 32 -
3.6 Caracterização hidrodinâmica das proteínas através de cromatografia de exclusão por tamanho analítica.....	- 33 -
3.7 Determinação da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial ..	- 34 -
3.8 Análise de interação entre a hHep1 e as chaperonas estudadas através de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica.....	- 35 -
3.9 Avaliação da atividade ATPásica das Hsp70 estudadas e influência da co-chaperona hHep1 .....	- 35 -
3.10 Visualização do efeito da hHep1 sobre as Hsp70 estudadas e seus CSM utilizando microscopia eletrônica de transmissão .....	- 36 -

3.11 Avaliação do efeito da hHep1 sobre as proteínas HSPA9 e HSPA1A e seus CSM através de ensaio de filtração (dot blot) .....	- 37 -
3.12 Estudos preliminares a partir de ensaios celulares.....	- 38 -
3.12.1 Observação da localização e comportamento sobre estresse da hHep1 e da HSPA9 utilizando a técnica de imunofluorescência .....	- 39 -
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	- 41 -
4.1 Estudos de caracterização biofísica.....	- 41 -
4.1.1 Cinética de formação de complexos supramoleculares.....	- 41 -
4.1.2 Experimentos de dicroísmo circular indicaram a manutenção das estruturas secundárias dos CSMs estudados.....	- 42 -
4.1.3 Estudo da estrutura terciária local das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs utilizando fluorescência intrínseca do triptofano indicam que os CSMs estudados possuem estrutura terciária local .....	- 44 -
4.1.4 Determinação de parâmetros hidrodinâmicos a partir de cromatografia de exclusão por tamanho analítica .....	- 48 -
4.1.5 O estudo da estabilidade térmica das proteínas estudadas revelou a presença de duas transições e diferentes estabilidades, com o envolvimento do DLN na formação dos CSMs -	49
-	
4.1.6 Estudos de interação entre a hHep1 com as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs revelaram que a co-chaperona foi capaz de interagir com os CSMs de maneira independente da adição de nucleotídeos .....	- 53 -
4.1.7 Estudos de atividade das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs, indicaram que os CSMs detêm atividade ATPásica e que a hHep1 foi capaz de estimulá-la.....	- 56 -
4.1.8 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão indicam que a hHep1 é capaz de remodelar os CSMs estudados .....	- 59 -
4.1.9 Ensaio de filtração em membrana (dot blot) confirmam que a hHep1 foi capaz de remodelar os CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A em partículas menores.....	- 61 -
4.2 Estudos preliminares a partir de ensaios celulares.....	- 64 -

<i>4.2.1 Experimentos de imunofluorescência com células transfectadas e não-transfectadas detectou a presença mitocondrial e nuclear da co-chaperona hHep1 e confirmou a localização da HSPA9 na mitocôndria</i> .....	- 64 -
5. <i>CONCLUSÕES</i> .....	- 69 -
6. <i>CONCLUSÕES GERAIS</i> .....	- 71 -
7. <i>PUBLICAÇÕES REFERENTES AO DOUTORADO:</i> .....	- 72 -
8. <i>PUBLICAÇÕES ADICIONAIS</i> .....	- 73 -
9. <i>REFERÊNCIAS</i> .....	- 74 -

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Chaperonas Moleculares*

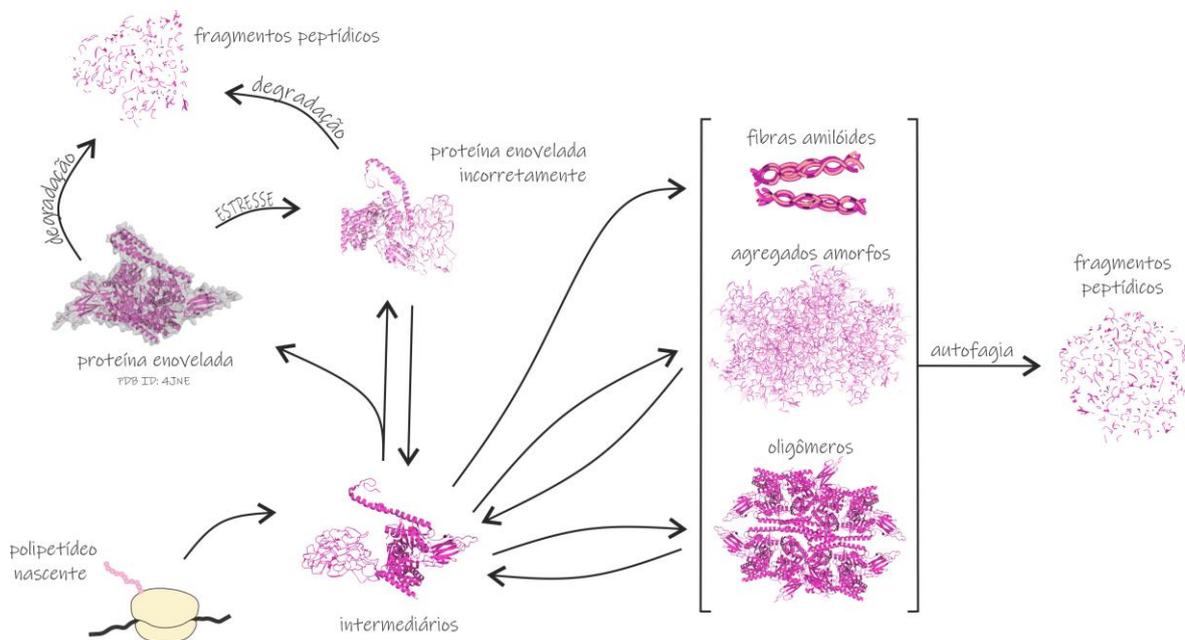
Proteínas representam o maior grupo de macromoléculas presentes em seres vivos, desempenhando as mais diversas funções tais como transporte de oxigênio, manutenção da estrutura celular e de tecidos, constituição de membranas, defesa e catálise de reações, entre outras. As funções desempenhadas por essas macromoléculas estão intrinsicamente relacionadas à sua estrutura tridimensional e, portanto, é extremamente importante garantir que as mesmas estejam corretamente enoveladas. O processo de enovelamento proteico envolve diversos fatores como energia livre, força iônica do meio, interações hidrofóbicas, presença de pontes de dissulfeto, dentre outras (SHRIVASTAVA, 2017; ZHOU; PANG, 2018). De maneira geral, esse processo se inicia a partir da cadeia polipeptídica formada no ribossomo, que passa por diversas conformações tridimensionais intermediárias, por meio de vias de enovelamento, até que consiga atingir seu estado de mínima energia e, portanto, propriamente enovelada. Ainda, em alguns casos, proteínas podem adotar uma estrutura quaternária, apresentando diferentes estados oligoméricos.

Alguns fatores e eventos podem levar ao mau enovelamento das proteínas ou até mesmo causar o desenovelamento. Assim, conformações intermediárias e proteínas parcialmente desenoveladas têm suas superfícies hidrofóbicas expostas, favorecendo processos de agregação ou aglomeração proteica e impedindo que as mesmas estejam disponíveis para executar suas funções (Figura 1) (DOBSON, 2003). Esses aglomerados podem formar fibras amilóides, agregados que retêm estruturas proteicas organizadas altamente estáveis e tóxicas à célula, podendo precipitar ou formar depósitos que são intrinsicamente relacionados com algumas doenças chamadas genericamente de amiloidoses: Alzheimer, Parkinson, Creutzfeld-Jacob (príon), fibrose cística, alguns tipos de câncer, entre outras (BEISSINGER; BUCHNER, 1998; HARTL; HAYER-HARTL, 2002; RUDDON; BEDOWS, 1997; WIDODO; DEOCARIS; KAUR; HASAN *et al.*, 2007).

No entanto, os aglomerados de proteínas podem gerar agregados amorfos, desprovidos de organização estrutural, ou formar complexos proteicos solúveis e reversíveis, como oligômeros de alta massa molecular ou complexos supramoleculares (CSM), que podem atuar como um mecanismo de proteção celular durante eventos extremos que prejudicam a homeostase celular (SAAD; CEREGHETTI; FENG; PICOTTI *et al.*, 2017; WALLACE; KEAR-SCOTT; PILIPENKO; SCHWARTZ *et al.*, 2015). Dessa maneira, a

formação de CSM evita que a degradação das proteínas ocorra, contribuindo para a viabilidade da célula. Afim de que as mesmas recuperem sua estrutura e, conseqüentemente, sua função, é necessário que haja uma rápida resposta celular que permita o resgate dessas proteínas após os eventos de estresse (CHEN; RETZLAFF; ROOS; FRYDMAN, 2011).

**Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de enovelamento proteico.** Em condições normais o polipeptídeo nascente é enovelado, passando por conformações intermediárias, até que atinja sua conformação estrutural correta, resultando na proteína enovelada. Fatores de estresse acarretam em problemas no processo de enovelamento podendo ocasionar a automontagem das proteínas, gerando complexos supramoleculares (CSMs), agregados amorfos ou fibras amilóides. O processo de formação de agregados amorfos e CSMs pode ser revertido dando à proteína uma nova oportunidade de alcançar seu estado enovelado corretamente.



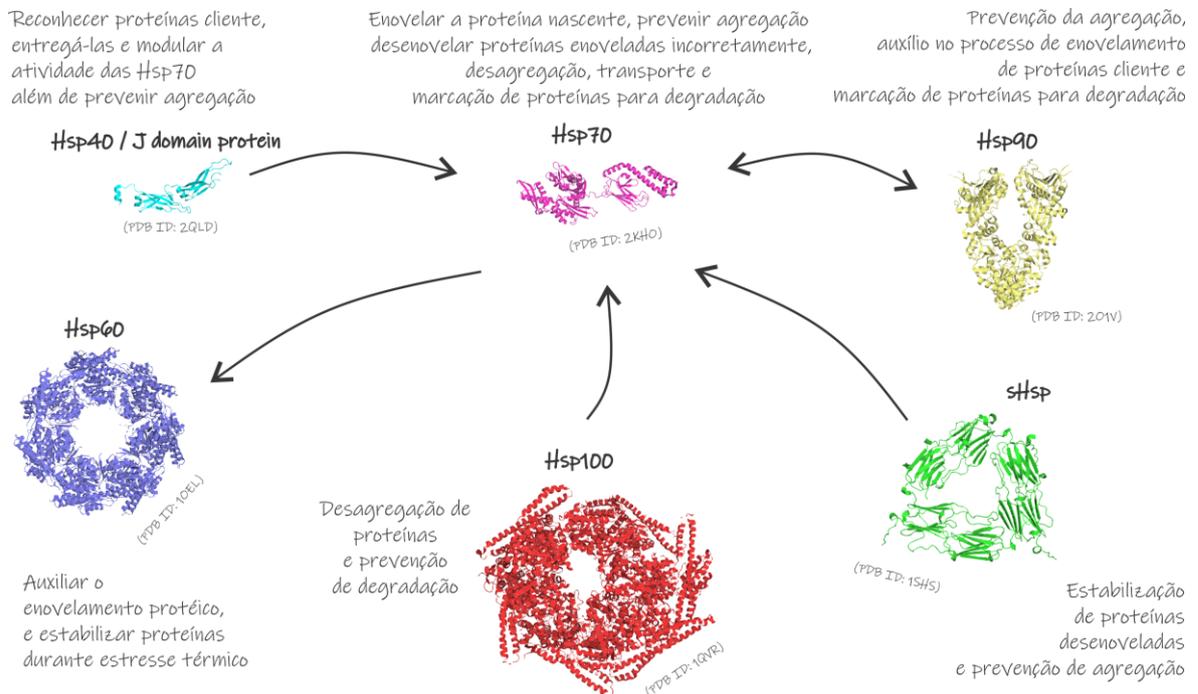
FONTE: Adaptado de (BHATWA; WANG; HASSAN; ABRAHAM *et al.*, 2021).

Na busca de evitar a formação de agregados, auxiliar o melhor enovelamento proteico e promover processos de desagregação e renovelamento, a evolução promoveu o surgimento e manutenção das chaperonas moleculares, que também podem ser identificadas como Heat Shock Proteins (Hsps). Importantes membros do sistema de controle de qualidade de proteínas (PQC), esta complexa maquinaria auxilia e promove a reação espontânea de enovelamento (BUCHNER, 1996; BUKAU; HORWICH, 1998; ELLIS; HARTL, 1999; WALTER; BUCHNER, 2002), o que favorece a manutenção da homeostase celular (KANG; PLESCIA; DOHI; ROSA *et al.*, 2007). Vários estudos indicam que durante processos estressantes como aumento de temperatura e estresse oxidativo, a indução de Hsps aumenta consideravelmente com o intuito de evitar danos à célula, procurando re-enovelar proteínas e, quando necessário, promovendo a apoptose (KREGEL, 2002; MOSSER; CARON; BOURGET; DENIS-LAROSE *et al.*, 1997; SREEDHAR; CSERMELY, 2004;

WANG; VINOCUR; SHOSEYOV; ALTMAN, 2004; WHITLEY; GOLDBERG; JORDAN, 1999). As chaperonas moleculares têm sido alvo de diversas revisões (DAHIYA; BUCHNER, 2019; DUBREZ; CAUSSE; BORGES BONAN; DUMÉTIER *et al.*, 2020; REBEAUD; MALLIK; GOLOUBINOFF; TAWFIK, 2021) e os seus mecanismos de regulação surgem como ótimos alvos terapêuticos para tratamentos de doenças.

Existem 6 grandes famílias de chaperonas moleculares, as quais são auxiliadas e moduladas por diversas co-chaperonas. Essas chaperonas, representadas na Figura 2, são classificadas de acordo com sua massa molecular, podendo pertencer à família das Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ou sHsp (do inglês *small Hsp*). As mesmas podem ser encontradas em distintos compartimentos celulares desempenhando diversas funções interconectadas (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011; JEE, 2016).

**Figura 2 - Representantes das seis famílias de Hsps.** Em vermelho a Hsp100 de *Thermus thermophilus* (PDB ID: 1QVR), em amarelo a Hsp90 de *Canis lupus familiaris* (PDB ID: 2O1V), em rosa a Hsp70 de *Escherichia coli* (PDB ID: 2KHO), em azul a Hsp60 de *Escherichia coli* (PDB ID: 1OEL), em azul ciano a Hsp40 de humanos (PDB ID: 2QLP) e em verde a *small Hsp* (sHsp) de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB ID: 1SHS). Ao lado de cada uma das estruturas representativas são descritas as funções desempenhadas pelas respectivas Hsp e as setas indicam a relação entre as mesmas. De maneira breve, as Hsp70 recebem substratos das Hsp40, Hsp90, Hsp100 e sHsp, e libera os mesmos para as Hsp90 e Hsp60.



FONTE: Adaptado de (BORGES; RAMOS, 2005).

## 1.2 A família das Hsp70

Dentre as famílias de chaperonas moleculares existentes, uma das principais é composta pelas Hsp70 que apresentam cerca de 40%-60% de identidade entre seus membros eucariotos e procariotos e, portanto, são altamente conservadas biologicamente (DA SILVA; BORGES, 2011; HUNT; MORIMOTO, 1985; KARLIN; BROCCHERI, 1998). Além disso, são proteínas ubíquas por serem requeridas em todos os organismos (DA SILVA; BORGES, 2011) e presentes em todos compartimentos intracelulares eucarióticos que contenham moléculas de ATP (RADONS, 2016).

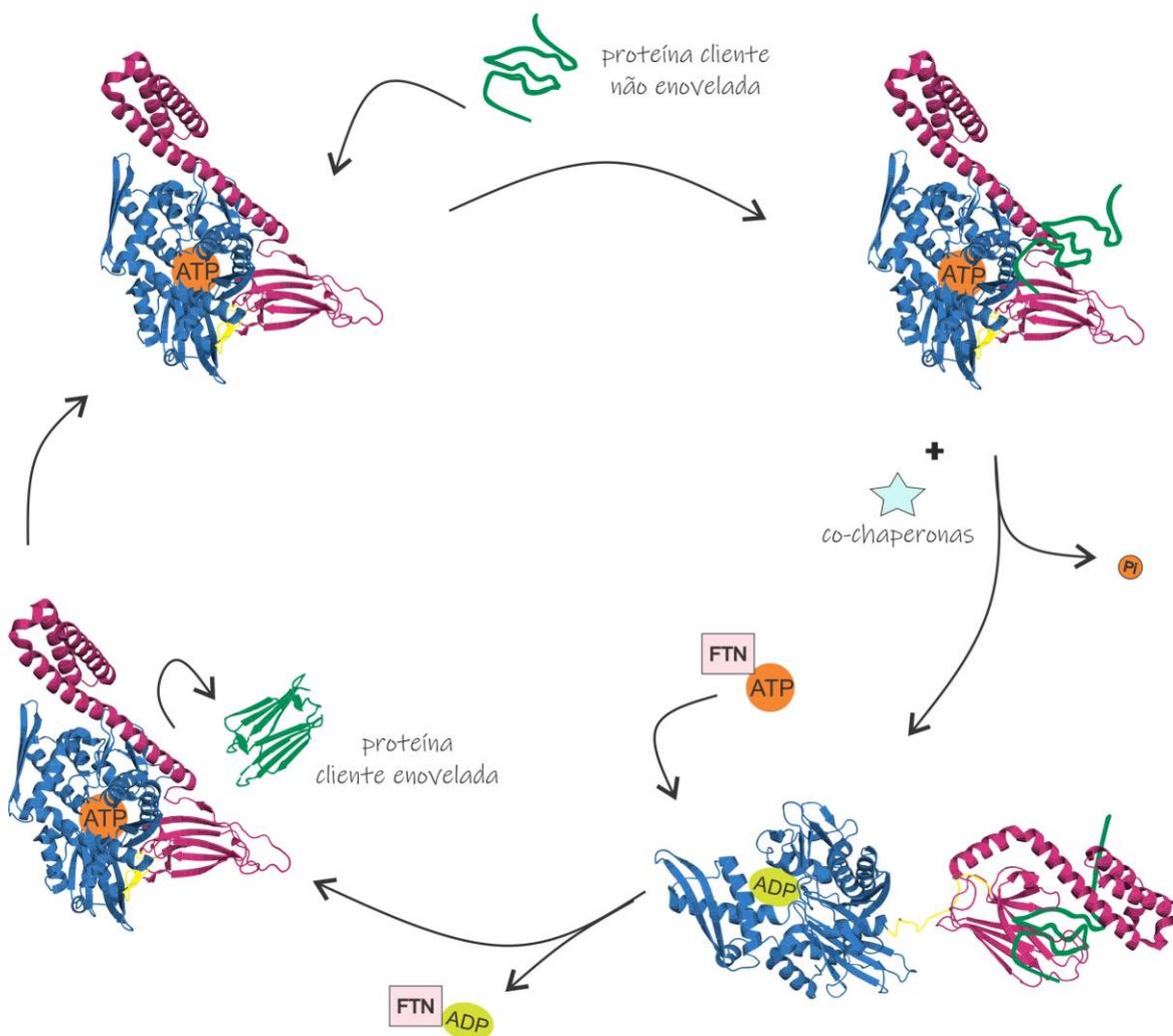
As Hsp70 funcionam como pivô, mediando a recepção e a entrega de proteínas-cliente com outras chaperonas moleculares (BORGES; RAMOS, 2005; DA SILVA; BORGES, 2011) e, juntamente com suas co-chaperonas e fatores de troca de nucleotídeos (FTNs), estão envolvidas em funções essenciais para a manutenção da proteostase como enovelamento de proteínas, prevenção de agregação, transporte de proteínas por membranas, marcação para degradação proteica, estabilização de fatores de transcrição celular, desagregação de proteínas, etc. (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018; HARTL; HAYER-HARTL, 2002; MAYER; BREHMER; GÄSSLER; BUKAU, 2001; WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004).

A estrutura das Hsp70 é caracterizada por dois domínios, o N-terminal (em azul) ligado por um *linker* flexível (em amarelo) ao C-terminal (em rosa), indicados na Figura 3. O N-terminal tem massa molecular aproximada de 45 kDa e é chamado de domínio de ligação de nucleotídeos (DLN), apresentando estrutura em forma de V, com dois subdomínios que compõem o sítio de ligação ao nucleotídeo adenosina dispostos de maneira a formar uma fenda. O C-terminal é chamado de domínio de ligação de proteínas clientes (DLP), apresenta cerca de 25 kDa e também possui dois subdomínios, um majoritariamente estruturado em folhas- $\beta$  e o outro em  $\alpha$ -hélice.

Esses domínios são regulados por um mecanismo alostérico heterotrópico bidirecional, no qual há a dependência da presença de nucleotídeo no DLN e de uma proteína cliente no DLP (DA SILVA; BORGES, 2011). Quando o ATP está ligado ao DLN o DLP apresenta baixa afinidade pelas proteínas cliente. A partir da hidrólise de ATP ocorre um aumento na afinidade da Hsp70 por proteínas cliente e, com o auxílio de fatores de troca de nucleotídeos (FTN), o ADP é liberado e o ATP volta a se ligar ao DLN, reduzindo a afinidade das Hsp70 pela proteína cliente que é liberada. Esse mecanismo implica em

mudanças conformacionais, principalmente com relação ao subdomínio  $\alpha$ -hélice do DLP, que se dobra sobre o DLN quando este está ligado à uma molécula de ATP.

**Figura 3 – Esquema do ciclo de ação das Hsp70.** O DLN está representado em azul, o DLP em rosa e o *linker*, que conecta ambos, em amarelo. O que regula o ciclo das Hsp70 é a presença de nucleotídeos no domínio DLN e de proteína cliente (em verde) no domínio DLP. A Hsp70 com ATP no DLN apresenta conformação aberta (PDB ID: 4JNE), com baixa afinidade à proteína cliente pelo DLP. A ligação da proteína cliente no DLP junto da hidrólise do ATP, que ocorre com o auxílio de co-chaperonas (representadas pela estrela), promove mudanças conformacionais que levam ao fechamento da subunidade  $\alpha$  do DLP (PDB ID: 2KHO) e acarreta no aumento da afinidade pela proteína cliente. Os FTN (representados por retângulos) fazem com que o ADP seja substituído por ATP, ocasionando o aumento na taxa de liberação da proteína cliente e disponibilizando as Hsp70 para reiniciar o ciclo.



FONTE: Adaptado de (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018).

Nessa conformação o *linker* flexível fica escondido em uma cavidade do DLN e o acoplamento do subdomínio de folhas- $\beta$  do DLP ao DLN acarreta no enrijecimento do mesmo, de maneira a dificultar a ação de seus resíduos catalíticos, o que justifica o fato de as Hsp70 apresentarem baixa atividade ATPásica. A partir da ligação da proteína cliente no

DLP o subdomínio de folhas- $\beta$  é desacoplado do NBD, a hidrólise do ATP ocorre e o subdomínio  $\alpha$ -hélice do DLP se fecha sobre a proteína cliente. Esse processo ocorre na presença de co-chaperonas que promovem o aumento na taxa de hidrólise de ATP (Figura 3) (DA SILVA; BORGES, 2011; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018; MAYER; BREHMER; GÄSSLER; BUKAU, 2001; ROSENZWEIG; NILLEGODA; MAYER; BUKAU, 2019).

Como já mencionado anteriormente, as Hsp70 estão presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos em diversos compartimentos celulares que contém ATP, e são diferenciadas pela sua constituição, nível de expressão e localização (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). São encontradas no citosol, núcleo, membrana celular, retículo endoplasmático entre outros. Em humanos, existem treze membros representantes da família das Hsp70, podendo ser expressos constitutivamente ou ter sua expressão induzida por fatores de estresse, tais como aumento de temperatura e estresse oxidativo (RADONS, 2016).

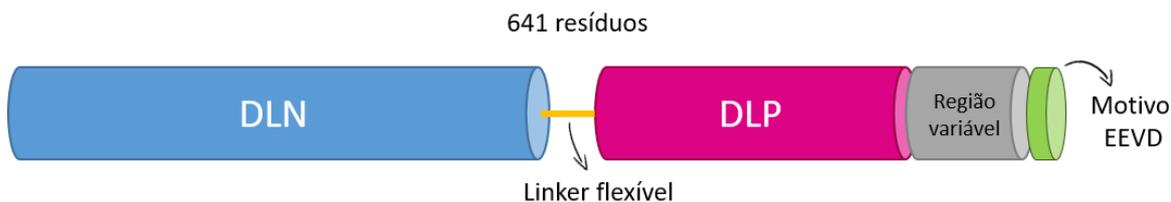
### ***1.2.1HSPA1A***

A maioria dos membros das Hsp70 se encontra no citoplasma e no núcleo, apresentando estrutura conservada característica dessa família, com destaque para a HSPA1A (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; RADONS, 2016). Essa Hsp70 humana possui o motivo EEVD na região C-terminal (Figura 4), responsável pela ligação desta proteína com co-chaperonas que possuem domínio TPR (do inglês, *tetratricopeptide repeat*), tais como a CHIP (do inglês, *carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*), envolvida no processo de ubiquitinação da proteína cliente ligada à Hsp70, para posterior degradação pelo proteassomo, e a HOP (do inglês, *Hsp70-Hsp90 organizing protein*), envolvida na entrega de proteínas cliente das Hsp70 para as Hsp90 (ALLAN; RATAJCZAK, 2011).

A HSPA1A é pouco expressa em células saudáveis mantidas em condições normais. No entanto, durante processos de estresse celular, observa-se o aumento na sua expressão, compreendendo cerca de 2% do total de proteínas solúveis na célula, sendo uma das responsáveis pela sobrevivência da mesma, restaurando e mantendo processos celulares (BALOGI; MULTHOFF; JENSEN; LLOYD-EVANS *et al.*, 2019; MURPHY, 2013; RADONS, 2016). Em condições normais, se encontra majoritariamente no citoplasma celular mas estudos mostram que, sob estresse, ocorre uma translocação da mesma para o

núcleo e nucléolo, possivelmente atuando no reparo de danos que possam ocorrer à célula (NOLLEN; SALOMONS; BRUNSTING; VAN DER WANT *et al.*, 2001).

**Figura 4 – Esquema representativo da estrutura da HSPA1A.** Essa Hsp70 possui 641 resíduos de aminoácidos, com domínio de ligação ao nucleotídeo (DLN) em azul e o domínio de ligação de proteínas clientes (DLP) em rosa, ligados pelo *linker* flexível em amarelo. Em cinza é representada a região variável das Hsp70 e em verde o motivo EEVD, localizado no C-terminal.



FONTE: Autoria própria.

Além disso, estudos indicam o envolvimento da HSPA1A em doenças neurodegenerativas e diversos tipos de cânceres, o que justifica o interesse em elucidar detalhes sobre seu comportamento (ANGELIDIS; LAZARIDIS; PAGOULATOS, 1999; HWANG; RYU; YOON; LEE *et al.*, 2005; JUHASZ; LIPP; NIMMERVOLL; SONNLEITNER *et al.*, 2013; KIM; NA; LEE; JEOUNG *et al.*, 2016; LEE; KIM; YOON; KIM *et al.*, 2001). Por exemplo, um estudo recente de Zhang e colaboradores investigou o aumento da expressão dessa e de outras proteínas, em diversos tipos de câncer, indicando o envolvimento da HSPA1A na proliferação de células tumorais e na ocorrência de radio resistência em câncer de mama (ZHANG; WANG; XIAO; DONG *et al.*, 2020).

### 1.2.2 HSPA9

A HSPA9 localiza-se majoritariamente na mitocôndria, mas pode também ser encontrada em outros compartimentos celulares, como no citoplasma. De maneira similar aos seus homólogos, a HSPA9 é composta pelos domínios DLN e DLP, apresentando também um peptídeo sinal de encaminhamento para a mitocôndria na extremidade N-terminal, que é clivado após a entrada da proteína na mitocôndria (MOSENG; NIX; PAGE, 2019; RAN; WADHWA; KAWAI; KAUL *et al.*, 2000). Um esquema representativo da estrutura da HSPA9 é apresentado na Figura 5.

A Hsp70 mitocondrial foi originalmente descoberta em fibroblastos de ratos, onde duas isoformas de Hsp70 foram isoladas e denominadas de mot-1 e mot-2, diferindo entre si somente por dois resíduos de aminoácidos no DLP, e também demonstrado que a mot-2 estava associada com a imortalidade celular (WADHWA; KAUL; IKAWA; SUGIMOTO, 1993). Em mamíferos, a Hsp70 mitocondrial também recebe o nome de mortalina, devido

ao seu envolvimento na senescência e na morte celular. (DEOCARIS; LU; KAUL; WADHWA, 2013; KAUL; DEOCARIS; WADHWA, 2007; WADHWA; KAUL; IKAWA; SUGIMOTO, 1993). Humanos possuem somente uma ortóloga das Hsp70 mitocondriais, denominada HSPA9 (RADONS, 2016).

Grande importância tem sido atribuída à esta Hsp70, pelo fato de se observar um aumento significativo de sua expressão em tumores humanos, sendo detectada em câncer de fígado, ovário, mama e colorretal, entre outros, o que indica que a mesma desempenha papel fundamental na manutenção de tumores (DEOCARIS; WIDODO; ISHII; KAUL *et al.*, 2007; LU; LEE; KAUL; LAN *et al.*, 2011b; NA; KAUL; RYU; LEE *et al.*, 2016; WADHWA; TAKANO; KAUR; DEOCARIS *et al.*, 2006). Estudos mostraram que a super expressão da HSPA9 e sua interação com a proteína p53, que atua como supressor tumoral, forma um complexo reversível causando a ancoragem da p53 no citoplasma, impedindo que seja translocada para o núcleo ou para a mitocôndria e inibindo sua ativação transcricional (ANDO; OKI; ZHAO; IKAWA-YOSHIDA *et al.*, 2014; KLAUS; KAEMMERER; REINARTZ; SCHNEIDER *et al.*, 2014; LU; LEE; KAUL; LAN *et al.*, 2011a; PHAM; TRAN; PHAM; GAIRIN, 2019). Um estudo recente identificou uma molécula potencialmente capaz de impedir essa interação entre a HSPA9 e a p53 (Mortaparib<sup>Plus</sup>), que pode vir a ser um importante fármaco anticâncer, salientando a importância da HSPA9 e estudos que a envolvam (SARI; ELWAKEEL; DHANJAL; KUMAR *et al.*, 2021).

**Figura 5 - Esquema representativo da estrutura da HSPA9.** Essa Hsp70 possui 679 resíduos de aminoácidos, com domínio de ligação ao nucleotídeo (DLN) em azul e o domínio de ligação de proteínas clientes (DLP) em rosa, ligados pelo *linker* flexível em amarelo. Em cinza é representada a região variável das Hsp70 e em verde o peptídeo sinal de encaminhamento da proteína para a mitocôndria, composto de 46 resíduos e localizado no N-terminal.



FONTE: Autoria própria.

Além disso, a HSPA9 está associada ao surgimento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como Alzheimer e Parkinson (JIN; HULETTE; WANG; ZHANG *et al.*, 2006). De maneira contrária àquele comportamento observado em células tumorais, estudos indicam que neurônios apresentam diminuição nos níveis de expressão de HSPA9, quando envolvidos em doenças neurodegenerativas como as mencionadas (ABYADEH; GUPTA;

CHITRANSHI; WU *et al.*, 2021; LONDONO; OSORIO; GAMA; ALZATE, 2012; PARK; SHIN; JEONG; SONG *et al.*, 2014). Sabe-se que as mitocôndrias são organelas essenciais para a estabilidade e função dos neurônios, células com alta taxa metabólica (KANN; KOVÁCS, 2007), e a redução da expressão da HSPA9 nessas organelas altera sua dinâmica, causando disfunções sinápticas.

Apesar de ser conhecida desde 1993 e de existirem muitos estudos que a envolvam, em nível funcional, os mesmos são limitados pela dificuldade em se obter essa proteína de maneira recombinante e propriamente enovelada. É relatado que a mesma, assim como Hsp70 mitocondriais de outros organismos, é propensa a formar agregados durante sua produção heteróloga, sendo obtida na fração insolúvel, indisponível para ensaios *in vitro* (DORES-SILVA; BELOTI; MINARI; SILVA *et al.*, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; DORES-SILVA; NISHIMURA; KIRALY; BORGES, 2017). É também reportada a obtenção da HSPA9 por reenovelamento químico a partir dos corpos de inclusão (LUO; DIZIN; YOON; COWAN, 2010), contudo os dados estruturais sugerem que a mesma não estava em sua forma nativa. Por fim, não foram reportados estudos que caracterizem a estrutura e função dos complexos supramoleculares purificados nesse trabalho e dessa forma, apesar de avanços registrados recentemente por nosso grupo (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013), muitas das características estruturais e funcionais dessa proteína multifuncional ainda necessitam de atenção.

### **1.3 Propensão das Hsp70 à formação de complexos supramoleculares**

Vários trabalhos indicam que as Hsp70 possuem propensão em sofrer processos de oligomerização, aglomeração ou auto agregação, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ANGELIDIS; LAZARIDIS; PAGOULATOS, 1999; BENAROUDJ; BATELIER; TRINOLLES; LADJIMI, 1995; DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015; KING; EISENBERG; GREENE, 1995; PALLEROS; WELCH; FINK, 1991; STEEL; CROSS; ELLIS; ANDERSON, 2012; THOMPSON; BERNARD; SKINIOTIS; GESTWICKI, 2012). O estudo de Angelidis e colaboradores (1999), demonstra que as proteínas citosólicas de mamífero constitutivamente expressa (Hsc70) e induzida por estresse térmico (Hsp70), agregam de maneira dependente de temperatura e que a presença de nucleotídeos adenosina influencia esse processo de oligomerização. A ausência de ATP levou à agregação das Hsp70 estudadas e, em contrapartida, a adição de ATP ocasionou a dissociação dos mesmos. Os dados apontam que as Hsp70 e Hsc70 agregadas são incapazes de exercer atividade

chaperona sobre as proteínas clientes estudadas, e que a monomerização das Hsp70 presentes nos agregados é necessária para que a atividade chaperona seja reestabelecida. Além disso, de acordo com Angelidis, o agregado da Hsp70 não interage com co-chaperonas *J-proteins*, sendo requerida a monomerização do mesmo para que complexos Hsp70 e *J-proteins* sejam formados (ANGELIDIS; LAZARIDIS; PAGOULATOS, 1999). O estudo de Araújo e colaboradores (2014) relata a existência de um oligômero da HSPA1A formado por aumento da pressão (chamado de oligômero hidrostático) que detém a atividade ATPásica preservada (ARAUJO; BORGES; RAMOS; MEYER-FERNANDES *et al.*, 2014).

O estudo de Thompson e colaboradores (2012) reporta que a DnaK de *Escherichia coli* (Hsp70 bacteriana) possui a tendência de formar múltiplos oligômeros *in vitro*. Os dados sugerem que a DnaK oligomerizada retém atividade ATPásica e atividade *holder* (segura a proteína cliente desenovelada, mantendo-a em um estado conformacional adequado para que a mesma possa ser reenovelada) sobre a luciferase, protegendo-a da desnaturação quando exposta à altas temperaturas, indicando que tais oligômeros podem desempenhar função *in vivo*. Os autores também mostram que a DnaK oligomerizada perde a habilidade de interagir com a DnaJ e não é capaz de re-enovelar a luciferase desenovelada. Porém, na presença de ATP, GrpE, *J-proteins* e proteínas cliente, a DnaK tende a monomerizar novamente e recupera sua ação *holder*. Portanto, a oligomerização temperatura dependente observada seria uma forma de proteger proteínas clientes durante o estresse térmico e/ou uma forma de se auto proteger da degradação (THOMPSON; BERNARD; SKINIOTIS; GESTWICKI, 2012).

Mais recentemente, Cabrera e colaboradores indicaram que, em leveduras, a Hsp70 Ssa2 é essencial para o surgimento estratégico de centros de agregados proteicos ou PACs (do inglês, *protein aggregate centers*), formados com o intuito de evitar a degradação proteica (CABRERA; BORONAT; MARTE; VEGA *et al.*, 2020). Ademais, uma revisão publicada no início de 2021 mostra que as Hsp70 têm papel importante na montagem e desmontagem de grânulos de estresse (SG, do inglês *stress granules*), estruturas sem membrana compostas por proteínas e mRNA, que surgem em condições de estresse como uma resposta protetora (VERMA; SUMI; SEERVI, 2021).

Apesar de eventos de agregação serem comumente associados à fatores negativos, faz-se necessário considerar que o processo evolutivo manteve essa estratégia e que a mesma desempenha papel importante (SANCHEZ DE GROOT; TORRENT; VILLAR-PIQUÉ; LANG *et al.*, 2012). Dessa forma, investigar a formação dos complexos supramoleculares (CSM) das Hsp70 estudadas, bem como sua função e estrutura, contribui para o

entendimento do papel dessas proteínas no desenvolvimento de cânceres e outras doenças degenerativas, compreendendo seu impacto na manutenção da homeostase celular.

#### **1.4 Co-chaperonas**

Como descrito anteriormente, o mecanismo alostérico heterotrópico bidirecional conta com a participação de proteínas conhecidas como co-chaperonas (DA SILVA; BORGES, 2011), que auxiliam as Hsp70 de diversas maneiras, regulando e mediando seu ciclo funcional. Podem atuar no recrutamento de proteínas clientes, auxiliar no processo de hidrólise do ATP estimulando ou inibindo-o, estabilizar etapas do ciclo funcional, auxiliar na troca de nucleotídeos, entre outros (CAPLAN, 2003). Existe uma grande quantidade de co-chaperonas conhecidas que podem ser, em sua maioria, separadas em duas classes, as que possuem domínio J (do inglês, *J-domain protein*) e as que possuem domínio TPR (do inglês, *tetratricopeptide-repeat*).

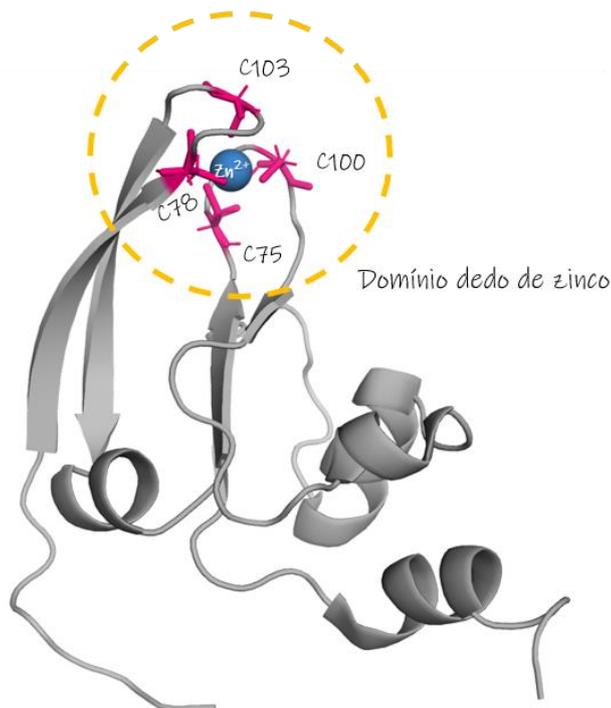
As co-chaperonas com domínio J estimulam a hidrólise das Hsp70 e também estabilizam a ligação entre a co-chaperona e a proteína cliente. Este domínio é altamente conservado, composto por quatro hélices alfa, responsável pela interação dessas proteínas com as Hsp70 (KAMPINGA; ANDREASSON; BARDUCCI; CHEETHAM *et al.*, 2019). Já as co-chaperonas que possuem domínio TPR podem interagir tanto com Hsp90 quanto Hsp70, auxiliando-as nas mais diversas funções, como enovelamento de proteínas cliente e encaminhamento para degradação. Este domínio é composto de 34 aminoácidos pouco conservados formando uma estrutura de hélice-volta-hélice, capaz de interagir com o motivo EEVD presente na porção C-terminal das chaperonas (PEREZ-RIBA; ITZHAKI, 2019).

Interessantemente, um estudo sobre a evolução do sistema chaperona foi publicado em maio de 2021, relatando que o processo evolutivo resultou no aumento da variedade de proteínas em eucariotos, inclusive aquelas com tendência à processos de agregação, fato que acentua a importância do sistema chaperona. No entanto, não é observado o surgimento de novas famílias de chaperonas em eucariotos, havendo somente a duplicação de genes ou aumento em sua expressão. Em contrapartida, ocorreu o surgimento de novas co-chaperonas, além do aumento de seus níveis de expressão, de modo a potencializar as funções das chaperonas existentes, destacando portanto a importância dessas proteínas (REBEAUD; MALLIK; GOLOUBINOFF; TAWFIK, 2021).

### 1.4.1 Hsp70 escort protein 1 (Hep1)

Uma das co-chaperonas que auxiliam a atividade das Hsp70 é a Hep1 (do inglês, *Hsp70 escort protein 1*), conservada em eucariotos e ausente em procariotos (SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005). Um estudo de Burri e colaboradores divulgado em 2004 hipotetizou que o surgimento dessa proteína seja resultado da fragmentação de proteínas *J-domain* que possuem um domínio dedo de zinco, no intuito de auxiliar a Hsp70 mitocondrial durante o processo de importação de proteínas para a mitocôndria, o que sugere que a Hep1 seja resultado de um processo evolutivo (BURRI; VASCOTTO; FREDERSDORF; TIEDT *et al.*, 2004). Essa co-chaperona é uma proteína pequena com formato em L e possui um domínio dedo de zinco, essencial para que a mesma interaja com a Hsp70 mitocondrial. A Figura 6 mostra a única estrutura depositada no PDB para esta proteína (PDB ID: 2E2Z), contendo os resíduos de aminoácidos 64-159 da Tim15 de levedura ( $\gamma$ Hep1), com destaque para o motivo dedo de zinco e as quatro cisteínas que coordenam o mesmo. (MOMOSE; OHSHIMA; MAEDA; ENDO, 2007).

**Figura 6- Estrutura da região central da proteína Tim15 de levedura ( $\gamma$ Hep1).** A imagem compreende os resíduos 64-159, obtida por RMN (PDB ID: 2E2Z). Em rosa estão destacados os quatro resíduos de cisteína que compõem o motivo dedo de zinco, circulado em amarelo. O círculo azul representa o íon zinco.



FONTE: Autoria própria.

A Hep1 de humanos (hHep1) está majoritariamente localizada na mitocôndria, sendo encontrada também no núcleo e citosol (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021; NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019), e é responsável pela manutenção da Hsp70 mitocondrial (HSPA9) em sua conformação nativa, enovelada, evitando sua agregação, além de auxiliar a mesma durante o processo de importação de proteínas e em seu consecutivo enovelamento (SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005). Em leveduras, a deleção do gene da  $\gamma$ Hep1 levou à agregação da Hsp70 mitocondrial e à consequentes problemas nos processos mitocondriais que dependem diretamente dessa chaperona, sendo reportadas falhas na biogênese mitocondrial (SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005). Ainda, estudos mostram resultados semelhantes, indicando que as proteínas Hep1 de *Leishmania braziliensis* (LbHep1) e *Plasmodium falciparum* (PfHep1) são responsáveis por manter suas respectivas Hsp70 mitocondriais na forma solúvel, permitindo inclusive a produção dessas proteínas recombinantes (DORES-SILVA; BELOTI; MINARI; SILVA *et al.*, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013; NYAKUNDI; VUKO; BENTLEY; HOPPE *et al.*, 2016).

Vale a pena mencionar que, apesar de essas ortólogas apresentarem como característica comum a manutenção da estabilidade da Hsp70, existem diferenças significativas entre as mesmas, que compartilham baixa identidade na sequência de aminoácidos (~30%), sendo o domínio dedo de zinco a região com maior identidade (~50%). Por exemplo, é reportado que a  $\gamma$ Hep1 não foi capaz de estimular a atividade ATPásica de sua Hsp70 mitocondrial (SICHTING; MOKRANJAC; AZEM; NEUPERT *et al.*, 2005), enquanto a LbHep1 promoveu um estímulo de cerca de 300% na atividade da LbmtHsp70 (DORES-SILVA; NISHIMURA; KIRALY; BORGES, 2017).

Sabe-se que a hHep1 desempenha papel de grande notabilidade, auxiliando a HSPA9 em diversos processos e estabilizando-a durante seu ciclo, atuando como uma “chaperona para uma chaperona”(NYAKUNDI; BENTLEY; BOSHOF, 2019). No entanto, existem poucos estudos que relatem a interação entre a co-chaperona hHep1 e as Hsp70. Neste estudo, a atividade desta co-chaperona sobre as proteínas HSPA9 e HSPA1A é abordada, bem como sobre seus complexos supramoleculares, buscando melhor compreender a interação entre as mesmas.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho de doutoramento consistiu em investigar possíveis funções dos CSMs das proteínas HSPA1A e HSPA9, bem como avaliar a os efeitos da co-chaperona hHep1 sobre essas proteínas, tanto em sua forma monomérica, quanto na forma de CSM.

### 2.1 *Objetivos específicos*

- (i) Avaliar a influência da co-chaperona hHep1 sobre as proteínas HSPA1A e HSPA9;
- (ii) Caracterizar a estrutura dos CSMs das proteínas HSPA1A e HSPA9, e sua atividade ATPásica;
- (iii) Avaliar a influência da co-chaperona hHep1 sobre os CSMs das proteínas HSPA1A e HSPA9;
- (iv) Avaliar a localização da HSPA9 *in vivo*, bem como de seu CSM, sob condições de estresse térmico;
- (v) Avaliar a localização da hHep1 *in vivo*, e seu comportamento sob estresse térmico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Construções e Clonagens

Os DNAs codantes das proteínas, clonados em vetores de expressão tipo pET (pET28a e pET23a) ou pQE2 e disponíveis no laboratório foram utilizados nas subclonagens para as diversas construções necessárias para os ensaios *in vitro*. Protocolos padrão derivados da tecnologia do DNA recombinante foram utilizados. As construções desenhadas para HSPA9 com a *tag*-FLAG e hHep1 com a *tag*-HA no vetor pcDNA3.1 foram obtidas comercialmente, sintetizadas pela *Epoch Life Science* e utilizadas nos experimentos de biologia celular. Abaixo, a Tabela 1 apresenta as construções envolvidas neste projeto.

**Tabela 1 - Relação de vetores de clonagem utilizados neste projeto.** A tabela apresenta detalhes das construções e vetores e indica referências que relatam sua aplicação e objetivos para o uso de cada uma delas.

Proteína	Construções		Vetor	Referência	Objetivo
	N-term.	C-term.			
HSPA1A	His-tag	-----	pET28a	(BORGES; RAMOS, 2006)	Testes <i>in vitro</i> de interação com a co-chaperona hHep1
HSPA9	-----	FLAG	pcDNA3.1	-----	Utilizada em ensaios celulares, com objetivo de estudar co-localização
	Peptídeo sinal				
	His-tag,	-----	pET28a	(DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015)	Testes <i>in vitro</i> de interação com a co-chaperona hHep1
hHep1	-----	HA	pcDNA3.1	(DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO <i>et al.</i> , 2021)	Estudos a partir de ensaios celulares, para avaliar localização e comportamento sobre estresse térmico
	Peptídeo sinal				
	-----	-----	pET23	(DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015)	Co-expressão da HSPA9 humana
	His-tag	-----	pQE2	(DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA <i>et al.</i> , 2013)	Estudos <i>in vitro</i> de interação e efeito sobre as proteínas HSPA1A e HSPA9
Myc-Luciferase	-----	His-tag e Myc-tag	pET3a	(GONÇALVES; PINHEIRO; DAHLSTRÖM; SOUTO <i>et al.</i> , 2020)	Estudos <i>in vitro</i> , utilizados como controle para os experimentos de <i>dot blot</i> , para avaliar a especificidade da co-chaperona hHep1

FONTE: Autoria própria.

### 3.2 Obtenção das proteínas recombinantes

A HSPA9 recombinante foi co-expressa e purificada como descrito em (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015; DORES-SILVA; MINARI; RAMOS; BARBOSA *et al.*, 2013). De forma breve, os vetores pET28a::HSPA9 e pET23a::hHep1 foram utilizados para transformação em cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) e crescidas à 37 °C e 200 rpm em meio de cultura LB (*Lysogeny Broth*) contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina e canamicina até densidade óptica em 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) entre 0,6 e 0,8. Nesse momento foi adicionado 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> de isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG), com indução à 23 °C e 200 rpm por 18 h. Em seguida as células foram sedimentadas por centrifugação a 8.000 rpm (13.600 g) por 20 min a 4 °C e o sedimento ressuspensionado em tampão de lise contendo 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,0), 100 mmol.L<sup>-1</sup> KCl. A ressuspensão foi incubada com 5 U de DNase (Promega) e 30 µg.mL<sup>-1</sup> de lisozima (Sigma) por 30 min em banho de gelo. A lise mecânica se deu por meio do uso de sonicador e, posteriormente, realizou-se a centrifugação a 18.000 rpm (43.200 g) por 30 min com temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi filtrado utilizando membranas de 0,45 µm (Millipore).

A purificação da proteína recombinante foi feita por meio de 2 passos cromatográficos. O primeiro passo consistiu em uma afinidade em coluna de níquel *HiTrap Chelating HP* 5mL (GE Healthcare LifeSciences) equilibrada em tampão contendo 20 mmol.L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (pH 7,5), 100 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl e 20 mmol.L<sup>-1</sup> de imidazol. A proteína foi eluída com o mesmo tampão contendo 500 mmol.L<sup>-1</sup> de imidazol. O segundo passo cromatográfico tratou-se de uma cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, realizada em coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Healthcare LifeSciences) conectada ao equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences), equilibrada em tampão TKP contendo 25 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 5 mmol.L<sup>-1</sup> de fosfato de Sódio, 5 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl e 2 mmol.L<sup>-1</sup> de β-mercaptoetanol. Todo o processo foi realizado com controle de temperatura (4 °C), inclusive a cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, na qual foi utilizado um banho térmico de circulação.

A HSPA1A foi produzida de acordo com (BORGES; RAMOS, 2006), a partir do vetor pET28a::HSPA1A transformado em *E. coli* BL21(DE3), utilizando 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina. A indução foi feita a partir da adição de 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> de IPTG, à 30 °C e 200 rpm por 4 h. Todos os passos seguintes foram realizados da mesma maneira apresentada para a HSPA9.

A hHep1 foi obtida como descrito em Dores-Silva e colaboradores (2013) a partir do vetor pQE2::hHep1. O antibiótico utilizado foi ampicilina ( $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), além de  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de IPTG com indução a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 h. Os tampões foram os mesmos utilizados para a purificação da HSPA9 e HSPA1A.

O plasmídeo para produção da Myc-Luciferase foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (IQ-UNICAMP) e sua obtenção se deu como descrito em (GONÇALVES; PINHEIRO; DAHLSTRÖM; SOUTO *et al.*, 2020). O antibiótico utilizado foi ampicilina ( $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e a proteína foi induzida com  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de IPTG por 3 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os tampões para a purificação por afinidade e cromatografia de exclusão por tamanho preparativa foram mantidos.

### **3.3 *Estudo da cinética de agregação para preparo e isolamento de complexos supramoleculares***

O processo de formação dos CSMs das Hsp70 estudadas foi avaliado em função de diferentes temperaturas ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e concentrações (de 2 a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Para tanto, o espalhamento de luz das amostras em 340 nm foi monitorado por 80 min em um espectrofotômetro UV-Vis UV-2600 (Shimadzu), utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm. Os dados foram visualizados através do software OriginPro 2016.

Os CSMs foram produzidos por incubação de alíquota da HSPA9 ou HSPA1A previamente purificadas, em concentração de aproximadamente  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , durante 90 min à  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após esse período as amostras foram submetidas à cromatografia de exclusão de tamanho preparativa em coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Healthcare LifeSciences) conectada ao equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences), utilizando mesmo tampão TKP. As amostras dos CSMs foram coletadas no *void* da coluna ( $V_0$ ). Ainda, para produção do agregado térmico de Myc-Luciferase, uma alíquota em  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  foi submetida a  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  por 90 min.

### **3.4 *Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular***

Experimentos de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) foram realizados utilizando um espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.) e um sistema *Peltier* (PFD 425S) para controle da temperatura. HSPA9, HSPA1A e seus CSMs foram testados no tampão da cromatografia de exclusão por tamanho (em tampão TKP), utilizando uma cubeta circular de caminho óptico de 0,2 mm. As concentrações de proteínas utilizadas para a

realização das medidas estava entre 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Todos os resultados foram normalizados para elipticidade molar residual ( $[\theta]_{EMR}$ ), de acordo com a Equação 01, em que  $\theta_\lambda$  é o sinal de CD (elipticidade), nR o número de resíduos,  $c$  a concentração em  $\text{mol.L}^{-1}$  e  $l$  o caminho óptico em cm, relacionado ao tamanho da cubeta utilizada. Os mesmos foram visualizados por meio do software OriginPro 2016.

$$[\theta]_{EMR} = \frac{\theta(\lambda)}{10.[c].l.nR} \quad (\text{Equação 01})$$

Para estimar as quantidades de estrutura secundária presentes nas amostras e comparar as estruturas monoméricas e CSM de ambas as Hsp70 estudadas, os dados normalizados foram inseridos no programa CDNN *deconvolution* (versão 2.1) para o processo de deconvolução (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992).

### ***3.5 Avaliação da estrutura terciária local utilizando técnica de fluorescência intrínseca do triptofano***

Experimentos de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizados em um espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi), utilizando cubeta de quartzo de tamanho  $10 \times 2$  mm. Para tanto proteínas entre 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  preparadas em tampão TKP foram utilizadas. Após a excitação em 295 nm, o espectro de emissão foi registrado de 300 nm a 420 nm e a partir dos dados foram calculados o centro de massa espectral ( $\langle\lambda\rangle$ ) e comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{max}}$ ) (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015). Para os CSMs da HSPA9 e da HSPA1A foi conduzido também o experimento na presença de 8 M de ureia, para avaliar o comportamento em condição desnaturante.

Posteriormente, com o intuito de avaliar mudanças conformacionais entre as Hsp70 estudadas e seus CSM, foi realizado ensaio de fluorescência com a sonda extrínseca 1,8-ANS (8-anilino-1-naftaleno ácido sulfônico) dependente do tempo, em um espectrofluorímetro de microplacas Varioskan LUX 3020-197 (Thermo Fischer Scientific), usando uma microplaca microlon de 96 poços (Greiner). As proteínas HSPA9, HSPA1A e seus respectivos CSMs na concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , preparados em tampão TKP, na presença de 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de ANS foram testados. Os experimentos foram conduzidos a 20 °C, medindo a emissão de fluorescência de 400 a 600 nm, após excitação em 350 nm

(ALAM; SIDDIQI; MALIK; CHATURVEDI *et al.*, 2019; FURKAN; SIDDIQI; ZAKARIYA; KHAN *et al.*, 2019).

Experimentos de fluorescência extrínseca utilizando tioflavina-T (Th-T) como sonda foram realizados visando avaliar a formação de agregados do tipo fibras amilóides. Para isso, o mesmo leitor de placas foi utilizado. As proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSM, preparados em tampão TKP na concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , foram avaliadas na presença de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Th-T. Conhecida por formar fibras amilóides, a proteína SEPT6G (gentilmente cedida pelo grupo da Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, do Instituto de Física de São Carlos, da USP), foi utilizada como controle positivo, nas mesmas condições das proteínas recombinantes (KUMAGAI; MARTINS; SALES; ROSA *et al.*, 2019). As amostras na presença de Th-T foram mantidas à 20 °C e também à 40 °C, por 120 min, e em seguida os espectros de emissão de fluorescência foram medidos de 468 a 600 nm, após excitação a 450 nm (ALAM; SIDDIQI; MALIK; CHATURVEDI *et al.*, 2019; FURKAN; SIDDIQI; ZAKARIYA; KHAN *et al.*, 2019; MAJID; SIDDIQI; KHAN; SHABNAM *et al.*, 2019).

Todos os dados obtidos foram tratados e visualizados através do software OriginPro 2016.

### **3.6 Caracterização hidrodinâmica das proteínas através de cromatografia de exclusão por tamanho analítica**

A cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC, do *inglês analytical size exclusion chromatography*) nos oferece informações sobre o tamanho e possível estado oligomérico da proteína em questão, diretamente relacionado com o volume de eluição da mesma em comparação com proteínas padrão bem caracterizadas. A partir desta técnica é possível determinar o raio de Stokes ( $R_s$ ), a razão friccional ( $f/f_0$ ) e a massa molecular aparente ( $MM_{app}$ ) da proteína de interesse. O coeficiente de partição ( $K_{av}$ ) é obtido utilizando-se os volumes de eluição de cada proteína ( $V_e$ ), o volume total da coluna ( $V_t$ ) e o volume da fase móvel ( $V_0$ ), aplicados na Equação 02.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (\text{Equação 02})$$

O valor de  $R_s$  é determinado a partir do gráfico  $R_s$  versus  $-\log K_{av}^{1/2}$  e o  $f/f_0$  é dada pela Equação 03, onde  $R_0$  é o valor de  $R_s$  teórico obtido pelo programa Sednterp ([www.jphilo.mailway.com/download.htm](http://www.jphilo.mailway.com/download.htm)).

$$\frac{f}{f_0} = \frac{R_s}{R_0} \quad (\text{Equação 03})$$

Os experimentos foram conduzidos utilizando uma coluna *Superdex 200 GL 10/330* (GE Healthcare LifeSciences) equilibrada com tampão TKP. As proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs com concentração de até 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram injetados na coluna. O volume de separação da mesma foi determinado com a injeção de *blue dextran* (1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) com tamanho médio de aproximadamente 2000 kDa e o padrão de proteínas utilizado é uma mistura das proteínas listadas na Tabela 2.

**Tabela 2 - Proteínas utilizadas na mistura do padrão para aSEC.**

Proteína	MM (kDa)	Rs (Å)
Apoferritina	480	67
$\gamma$ -globulina	160	48
Albumina Sérica Bovina - BSA	67	36
Ovoalbumina	45	29
Anidrase Carbônica	30	24
Citocromo C	12,3	14

FONTE: Autoria própria.

### 3.7 Determinação da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial

As medidas de calorimetria de varredura diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) foram realizadas em um Nano-DSC (TA Instruments), com proteínas em concentração de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  preparadas em tampão TKP sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol. A taxa de escaneamento utilizada foi de 1  $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ , começando em 15  $^{\circ}\text{C}$  até 90  $^{\circ}\text{C}$ . Também foram realizadas medidas na presença de nucleotídeos ATP e ADP (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e  $\text{MgCl}_2$  (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), incubados com as proteínas de interesse por 1 h em temperatura ambiente, a fim de comparar o efeito dos mesmos na estabilidade térmica. O software utilizado na coleta dos dados foi o DSCrun (TA Instruments), os quais foram analisados com o auxílio do programa NanoAnalyze (TA Instruments). Ainda, os gráficos foram gerados utilizando o software OriginPro 2016.

### 3.8 *Análise de interação entre a hHep1 e as chaperonas estudadas através de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica*

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *isothermal titration calorimetry*) foram realizados em um equipamento iTC200 (GE Healthcare Life Sciences) visando investigar a interação da co-chaperona hHep1 com a proteína HSPA1A e seu respectivo CSM, à 30 °C, preparados em tampão TKP. Os experimentos foram conduzidos de maneira a comparar os resultados com aqueles obtidos anteriormente pelo Dr. Paulo Roberto Dores-Silva, realizados para observar a interação da hHep1 com a HSPA9 e seu CSM. Portanto, a co-chaperona hHep1 foi titulada em quatorze alíquotas de 2,8 µL (de 150-200 µmol.L<sup>-1</sup>) em amostras de 203,8 µL de HSPA1A ou CSM (de 10-15 µmol.L<sup>-1</sup>). Os dados foram analisados pelo software OriginLab, e foram calculadas mudanças na entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ), a estequiometria de ligação (n) e a constante de associação ( $K_A$ ), conforme descrito em (BATISTA; GAVA; PINHEIRO; RAMOS *et al.*, 2015; BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015). Além disso, a constante de dissociação ( $K_D$ ) foi calculada como  $1/K_A$  e mudanças na energia livre de Gibbs aparente ( $\Delta G_{app}$ ) foram calculadas usando a equação (04), onde R é a constante do gás e T é a temperatura absoluta. Mudanças na entropia aparente ( $\Delta S_{app}$ ) foram estimadas utilizando a equação (05).

$$\Delta G_{app} = -R \cdot T \cdot \ln K_A \quad (\text{Equação 04})$$

$$\Delta G_{app} = \Delta H_{app} - T \Delta S_{app} \quad (\text{Equação 05})$$

### 3.9 *Avaliação da atividade ATPásica das Hsp70 estudadas e influência da co-chaperona hHep1*

Os experimentos de atividade ATPásica foram realizados utilizando o kit colorimétrico PiColorLock™ (Innova Biosciences), que permite quantificar o fosfato inorgânico liberado devido à hidrólise de ATP pela proteína. Isso permite a formação de complexos fosfomolibdato, ocasionando uma cor esverdeada da solução e a absorbância da mesma é medida no comprimento de onda de 620 nm.

As proteínas monoméricas e o CSM da HSPA1A na concentração de 2 µmol.L<sup>-1</sup>, e o CSM da HSPA9 na concentração 2,5 µmol.L<sup>-1</sup> foram testados com variação na concentração de ATP de 0 a 2 mmol.L<sup>-1</sup>, sempre na presença de 1 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>. Os experimentos

foram realizados em microplaca de 96 poços (Greiner UV-Star, Sigma), com tempo de incubação de 30 min, a 37 °C e todos os controles (brancos) foram feitos na ausência de proteína. O padrão para calibração da curva de hidrólise de fosfato é fornecido pelo próprio kit e foi pipetado em cada uma das placas. Após o tempo de incubação, adicionou-se a mistura contendo verde malaquita (*Golden mix*) à reação e, passados 5 min, o estabilizador.

Além das condições citadas acima, o efeito da co-chaperona hHep1 sobre a atividade ATPásica das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus respectivos CSM foi avaliado. Para determinar as condições ideais de relação entre as concentrações de chaperona/co-chaperona, foi realizado o experimento mantendo fixas a concentração da chaperona (2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e ATP (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) e variando a concentração da co-chaperona hHep1 (0 - 80  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Inicialmente, a mistura de chaperona com crescentes concentrações de hHep1 foi mantida em bancada, por 10 min, para a seguinte adição de ATP e  $\text{MgCl}_2$ . Os passos experimentais seguiram como descrito acima.

O experimento final relacionado à atividade ATPásica foi realizado mantendo fixas as concentrações das proteínas na relação ideal obtida anteriormente, e variando a concentração de ATP, de 0 a 2  $\text{mmol.L}^{-1}$ . A aquisição dos dados foi realizada no equipamento Varioskan LUX 3020-197 (Thermo Fischer Scientific), posteriormente, foram tratados com o software OriginPro 2016, obtendo-se o estímulo de atividade ATPásica *versus* concentração de hHep1 e quantidade de fosfato liberado *versus* concentração de ATP.

### ***3.10 Visualização do efeito da hHep1 sobre as Hsp70 estudadas e seus CSM utilizando microscopia eletrônica de transmissão***

Os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) foram realizados utilizando o método de preparo em contraste negativo, ou do inglês, *negative-stain*. Amostras foram preparadas contendo HSPA9, HSPA1A e seus CSM na concentração de 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ , além da mistura CSM e hHep1 com concentração vinte vezes maior ( $\sim 10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) incubada por 10 min, e 3  $\mu\text{L}$  de amostra foram aplicadas em *grids* de carbono (*Ultrathin Carbon film 400 mesh*). Passados 30 seg da aplicação os *grids* foram lavados duas vezes com tampão 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  HEPES (pH 7,5) e o excesso de tampão foi removido cuidadosamente com papel filtro pela lateral do *grid*, sem encostar na amostra. Por fim, para conferir contraste às imagens, foi aplicado 3  $\mu\text{L}$  de acetato de uranila (2%) e aguardou-se 5 min para secagem do *grid*.

As imagens dos *grids* foram obtidas utilizando o microscópio JEOL 2100 LaB<sub>6</sub> operando a 200 kV e defoco 3,5 µm em magnificação 120 kx, com câmera TVIPS 16 Mpi, nas dependências do IQSC. Todo o processo experimental e processamento das imagens foi realizado em colaboração com o Dr. Vitor Hugo Balasco Serrão (Universidade da Califórnia – Santa Cruz) utilizando o software IMAGE J.

### **3.11 Avaliação do efeito da hHep1 sobre as proteínas HSPA9 e HSPA1A e seus CSM através de ensaio de filtração (dot blot)**

Amostras dos CSM das Hsp70 estudadas (0,24 µmol.L<sup>-1</sup>) foram incubadas com concentrações crescentes de hHep1 (0,024 a 4,8 µmol.L<sup>-1</sup>) e submetidas a um ensaio de filtração tipo *dot blot*. Tais experimentos foram realizados utilizando um aparato de 48 poços *Slot Blot Manifold* (GE Healthcare), contendo uma membrana de acetato de celulose (Advantec, C020A330R, 0,2 µm) equilibrada previamente em tampão TKP. As misturas de proteínas em tampão TKP, com volume final de 150 µL, foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente, em placa de 96 poços. Em seguida aplicou-se 100 µL nos poços experimentais e acoplou-se uma bomba de vácuo para facilitar a passagem das amostras através da membrana. Em seguida, cada poço foi lavado com 2 mL de tampão TKP, e a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em TBS-T (50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,0), 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 0,05% Tween 20) por 1 h.

Após o tempo de bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T (três lavagens de 15 min, em agitação constante) e incubada durante a noite à 4 °C com os seguintes anticorpos primários: anti-HSPA9 (Cell Signaling, #3593) em 1:1000 ou anti-HSPA1A (ABclonal, #A0284) em 1:1000. Após 18 h de incubação, a membrana foi lavada novamente e, em seguida, incubada com anticorpo secundário, anti-*rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2313) para HSPA9 ou anti-*mouse* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2055) para HSPA1A, em uma diluição de 1:7500 por 1 h. Por fim, a membrana foi lavada novamente e incubada com o kit ECL (Bio-Rad) para visualização em um sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A análise estatística foi realizada no software ImageLab (Bio-Rad), onde cada poço foi selecionado usando a mesma área delimitada. O valor médio dos *pixels* dentro de cada área delimitada e seu desvio padrão foram obtidos, com o método de subtração de *background* local. Os dados que representam a redução relativa das médias de *pixels* foram analisados em função da concentração de hHep1 e a porcentagem de redução de retenção de

CSM na membrana foi determinada em relação à maior média de número de *pixels*, ou seja, as amostras de CSM das Hsp70 na ausência de hHep1. O gráfico do logaritmo da concentração de hHep1 contra a porcentagem de redução de CSM foi utilizado para calcular o EC<sub>50</sub> (concentração de hHep1 na metade da resposta máxima), a partir de uma função de ajuste dose-resposta, no software OriginPro 2016. As seguintes condições foram usadas como controles: CSM (0,24 μmol.L<sup>-1</sup>) sem hHep1, hHep1 (4,8 μmol.L<sup>-1</sup>) e CSM tratados com cloridrato de guanidina 6 mol.L<sup>-1</sup> (GndHCl) para determinar a depuração total e o *background*.

Também foram realizados experimentos controle, para avaliar a especificidade da ação da co-chaperona hHep1 sobre os CSMs das Hsp70 estudadas. CSM (0,24 μmol.L<sup>-1</sup>), foram incubados com diferentes concentrações de lisozima (0,24, 1,2 e 4,8 μmol.L<sup>-1</sup>) e submetidas ao ensaio de filtração. Além disso, o agregado da luciferase com um marcador *tag-Myc* (0,48 μmol.L<sup>-1</sup>) foi incubado com diferentes concentrações de hHep1 (0,48, 2,4 e 9,6 μmol.L<sup>-1</sup>). Para tais experimentos, além dos anticorpos primários acima citados, foi utilizado o anticorpo anti-Myc (Merck Millipore, #2272) na diluição 1:1000. Após as lavagens, a membrana foi incubada com seu respectivo anticorpo secundário (anti-*rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2313) para HSPA9 e luciferase ou com anti-*mouse* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2055) para HSPA1A a uma diluição de 1:7500) por 1 h. As membranas foram reveladas como mencionado anteriormente. Os experimentos controle também foram realizados em triplicata.

A análise estatística destes experimentos controle foi realizada utilizando o software ImageLab (Bio-Rad). Os dados sem adição de lisozima ou hHep1 (0 μmol.L<sup>-1</sup>) foram usados para representar 100% da formação de CSM e os mesmos na presença de GndHCl (6 mol.L<sup>-1</sup>) foram apresentados como controle para cada experimento.

### **3.12 Estudos preliminares a partir de ensaios celulares**

Estudos foram realizados com o intuito de melhor compreender o comportamento das proteínas HSPA9 e hHep1 *in vivo*, bem como avaliar sua interação. Esses experimentos foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### ***3.12.1 Observação da localização e comportamento sobre estresse da hHep1 e da HSPA9 utilizando a técnica de imunofluorescência***

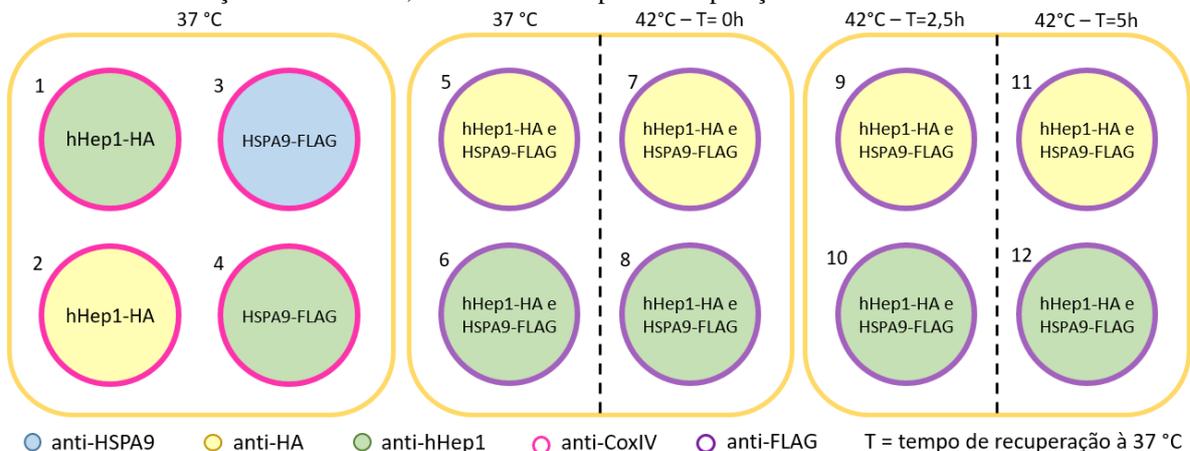
Estudos foram realizados utilizando células provenientes de osteosarcoma humano (U2OS) (HELDIN; JOHANSSON; WENNERGREN; WERNSTEDT *et al.*, 1986), devido ao fato de a mesma permitir uma melhor observação das mitocôndrias. Para tanto, as células U2OS foram crescidas sobre as lamínulas em placas de 4 poços e transfectadas com pcDNA3.1::hHep1 contendo o peptídeo sinal na região N-terminal e *tag*-HA no C-terminal e/ou pcDNA3.1::HSPA9 com o peptídeo sinal na região N-terminal e *tag*-FLAG no C-terminal. As transfecções foram realizadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, #11668019) de acordo com as instruções do fabricante. Após 48 h, as células foram lavadas com PBS, fixadas com solução de PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e 4% de paraformaldeído por 10 min e bloqueadas com 2% de BSA em solução de PBS por 30 min. Em seguida, foram incubadas com anticorpos primários, por 1 h.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-CoxIV (#11967), anti-HA (#3724), anti-HSPA9 (#3593) (Cell Signaling), anti-FLAG (#F1804) (Sigma Aldrich) e anti-hHep1 (#PA5-66527) (Thermo Fisher Scientific), diluídos em PBS e solução de BSA a 2% a 1:200, 1:600, 1:50, 1:50 e 1:50, respectivamente.

Depois, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h com os anticorpos secundários *Donkey anti-rabbit* Alexa 594 e *Goat anti-mouse* Alexa 488 (Invitrogen Life Technologies) na diluição de 1:800. Após a lavagem, os núcleos foram corados com DAPI usando o meio de montagem *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen Life Technologies). As imagens foram obtidas em microscópio confocal de fluorescência (SP5, Leica), disponível no Laboratório de Microscopia Confocal do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP / USP).

Com o intuito de observar o comportamento das proteínas hHep1 e HSPA9 durante estresse térmico, as células foram expostas à 42 °C antes da fixação por 1 h, sendo testados diferentes tempos de recuperação das mesmas à 37 °C (0 h, 2,5 h e 5 h). O esquema ilustrado na Figura 7 representa quais plasmídeos foram transfectados, os anticorpos primários utilizados e as temperaturas as quais foram mantidas cada uma das lamínulas. Já na Tabela 3 estão listadas cada uma das condições e o objetivo das mesmas.

**Figura 7 - Esquema representando a estratégia para preparo do experimento de imunocitoquímica.** Foram utilizadas três placas de 4 poços, nas quais é descrito cada plasmídeo transfetado. O esquema de cores representa quais anticorpos foram usados. Além disso no topo de cada placa se encontra a temperatura em que cada uma das condições foi incubada, bem como o tempo de recuperação das mesmas à 37 °C.



FONTE: Autoria própria.

**Tabela 3 - Esquema do experimento indicando as transfecções, anticorpos usados, temperaturas e diferentes tempos de recuperação.** Também é descrito quais proteínas puderam ser observadas em cada uma das condições, a partir da marcação com os anticorpos primários e secundários, na coluna observação.

	Plasmídeo transfetado	Anticorpos primários		Temp.	Tempo de recuperação à 37 °C	Observação			
1	pcDNA3.1::hHep1	anti-hHep1	anti-CoxIV	37 °C	não se aplica	hHep1 total e mitocôndria			
2		anti-HA				hHep1 transfetada e mitocôndria			
3	pcDNA3.1::HSPA9	anti-HSPA9	anti-CoxIV			HSPA9 total e mitocôndria			
4		anti-hHep1				hHep1 endógena e mitocôndria			
5	pcDNA3.1::hHep1 e pcDNA3.1::HSPA9	anti-HA	Anti-FLAG	42 °C	0 h	hHep1 e HSPA9 transfetadas			
6		anti-hHep1				hHep1 total e HSPA9 transfetada			
7		anti-HA				hHep1 e HSPA9 transfetadas			
8		anti-hHep1				hHep1 total e HSPA9 transfetada			
9		anti-HA				hHep1 e HSPA9 transfetadas			
10		anti-hHep1				hHep1 total e HSPA9 transfetada			
11		anti-HA			hHep1 e HSPA9 transfetadas				
12		anti-hHep1			hHep1 total e HSPA9 transfetada				
							5 h		

FONTE: Autoria própria.

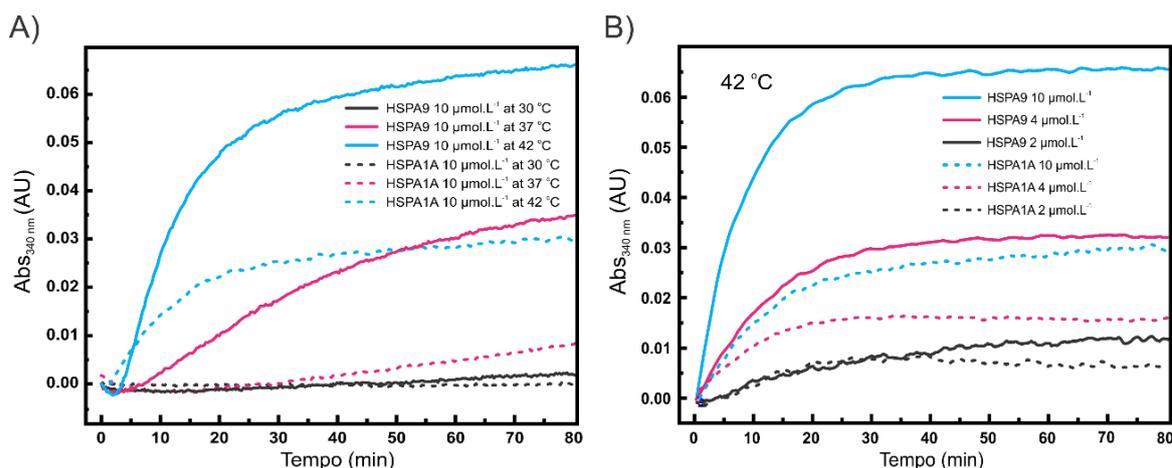
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudos de caracterização biofísica

#### 4.1.1 Cinética de formação de complexos supramoleculares

A formação de complexos moleculares resulta no aumento no tamanho de partículas presentes em solução e, dessa maneira, foi possível acompanhar esse processo por meio de experimentos de espalhamento de luz, que em um espectrofotômetro causa aumento do sinal de absorvância. Assim, a formação dos CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A foi avaliada observando o aumento da absorvância a 340 nm durante 80 min, submetendo as amostras a diferentes temperaturas (30, 37 e 42 °C). Para a HSPA9 não foi detectada a formação de CSM enquanto mantida à 30 °C, durante o tempo estudado. No entanto, houve aumento rápido de sinal de espalhamento de luz quando a mesma foi incubada à 37 ou 42 °C. Em contraste, a HSPA1A se mostrou mais estável do que a HSPA9, apresentando sinal relevante de espalhamento somente quando mantida à 42 °C (Figura 8A).

**Figura 8 - Cinética de formação dos CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A.** A) Espalhamento de luz das amostras a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  avaliado durante 80 min, em 30 °C (em preto), 37 °C (em rosa) e 42 °C (em azul). É possível observar que a HSPA9 (curvas contínuas) é menos estável do que a HSPA1A (linhas descontínuas) nas três temperaturas testadas. Ambas as proteínas mostraram sinal significativo de oligomerização à 42 °C. B) Experimento realizado variando a concentração das proteínas, 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (em preto), 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (em rosa) e 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (em azul) com temperatura fixa em 42 °C. Ambas as proteínas mostraram aumento no sinal com dependência da concentração, havendo processo mais pronunciado para a HSPA9.



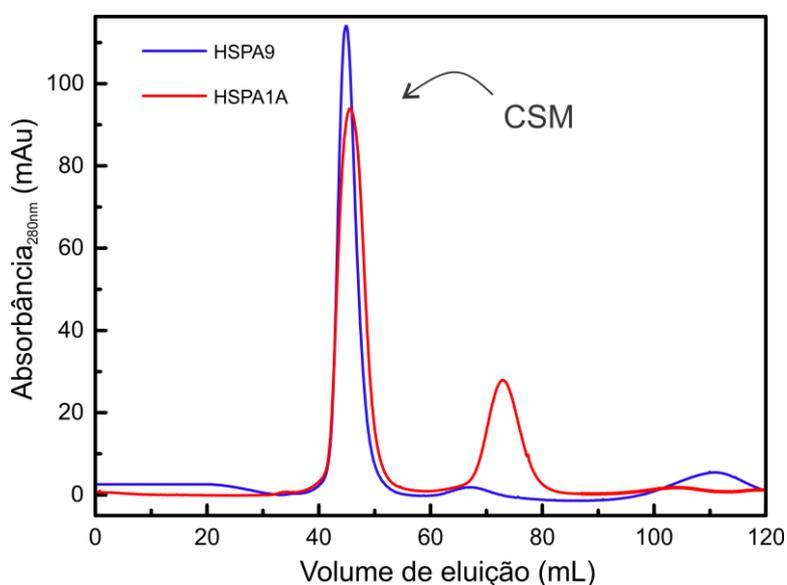
FONTE: Autoria própria.

A formação de CSM dessas proteínas também foi avaliada em diferentes concentrações (2, 4 e 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mantendo-se fixa a temperatura em 42 °C. Com relação à HSPA9 foi observado aumento no sinal conforme foram realizados incrementos na

concentração. Já com relação à HSPA1A o mesmo efeito foi observado, mas em escala menor, apresentando metade do sinal de oligomerização da HSPA9 na maior concentração testada (Figura 8B).

Esse experimento norteou a maneira em que foram obtidos os CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A, utilizados nos experimentos seguintes. Desta maneira, as proteínas resultantes do processo de purificação foram mantidas à 42 °C por 90 min, em banho térmico. Após incubação, foram submetidas à cromatografia de exclusão de tamanho preparativa coletando as frações correspondentes ao *void* ( $V_0$ ) da coluna (Figura 9).

**Figura 9 - Purificação dos CSMs das HSPA1A e HSPA9.** As amostras das proteínas HSPA9 (em azul) e HSPA1A (em vermelho), mantidas por 90 min à 42 °C foram submetidas à cromatografia de exclusão de tamanho preparativa, e os CSMs foram coletados no  $V_0$  da coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Healthcare LifeSciences).



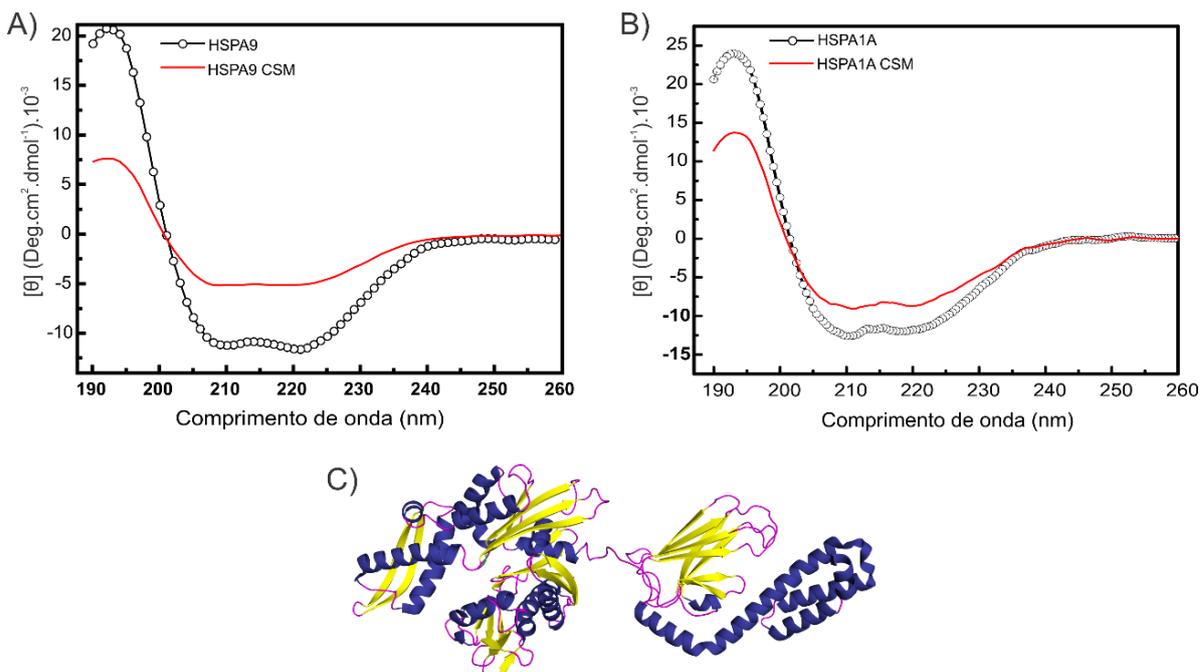
FONTE: Autoria própria.

#### ***4.1.2 Experimentos de dicroísmo circular indicaram a manutenção das estruturas secundárias dos CSMs estudados***

Experimentos de CD na região do UV distante (180-260 nm) forneceram informações com relação a estrutura secundária das proteínas, devido à maneira com que as ligações peptídicas absorvem luz circularmente polarizada. Diferentes arranjos estruturais como  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  resultam em diferentes espectros, que podem ser utilizados a fim de estimar a proporção de cada estrutura secundária que compõe a proteína de interesse. A Figura 10A representa os espectros de CD da HSPA9 (em preto) e seu CSM (em vermelho) normalizados para  $[\theta]_{EMR}$ . Ambas as conformações dessa proteína apresentaram o mesmo

perfil, com picos negativos em 222 nm e 208 nm, e um pico positivo em 195 nm, havendo redução de sinal para o CSM de aproximadamente metade daquele apresentado pela HSPA9.

**Figura 10 - Avaliação da estrutura secundária dos monômeros e CSM das Hsp70 estudadas por CD.** A) Espectros de CD obtidos para a HSPA9 e seu CSM. Observou-se que o sinal para o CSM (em vermelho) é aproximadamente metade daquele obtido para a HSPA9 (em preto). B) Espectros de CD obtidos para a HSPA1A, que apresenta perfil muito semelhante àquele obtido para a HSPA9, mas com menor redução de sinal entre a proteína monomérica e seu CSM. C) Hsp70 com as estruturas secundárias diferenciadas por cores (PDB: 2KHO). Em azul estão as hélices  $\alpha$ , em amarelo as folhas- $\beta$  e em magenta estão as estruturas randômicas.



FONTE: Autoria própria.

O espectro de CD da HSPA1A é apresentado na Figura 10B, que se comporta de maneira muito semelhante à HSPA9, havendo redução de sinal para o seu CSM (em vermelho) em comparação ao monômero (em preto), ainda que não seja da mesma magnitude da observada para a HSPA9. É importante salientar que esses experimentos indicam que os CSMs de HSPA9 e HSPA1A retiveram parte dos elementos de estrutura secundária.

Os dados normalizados para elipticidade molar residual foram inseridos no programa *CDNN deconvolution* (versão 2.1) (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992), a fim de determinar as quantidades de estrutura secundária presente nas proteínas estudadas. O resultado gerado é exibido abaixo, na Tabela 4, e está de acordo com o esperado para a família das Hsp70, como pode ser observado na Figura 10C acima, na qual se observa maior quantidade de hélices  $\alpha$  (azul) do que folhas- $\beta$  (amarelo) e regiões com estrutura randômica (rosa). Observou-se uma pequena redução na quantidade relativa de hélices  $\alpha$  para ambos os CSMs,

bem como aumento na quantidade de folhas- $\beta$ , quando comparados aos seus monômeros, o que sugere a existência de mudanças conformacionais durante o processo de formação do CSM. Mudanças conformacionais que levam à formação de estruturas secundárias do tipo folha- $\beta$  ocorrem durante processos de agregação que originam fibras amilóides (LI; LIU, 2020). Portanto, este dado estimulou a investigação da estrutura terciária local dos CSMs estudados, bem como a presença de assinaturas estruturais de agregados amilóides.

**Tabela 4 – Porcentagem de estrutura secundária de cada uma das proteínas, obtidas através do software CDNN.**

Proteína	$\alpha$ -hélices	Folhas- $\beta$	Volta- $\beta$	Estruturas randômicas
HSPA9	35%	16%	17%	32%
HSPA9 CSM	27%	22%	18%	33%
HSPA1A	35%	17%	17%	31%
HSPA1A CSM	22%	28%	19%	31%

FONTE: Autoria própria.

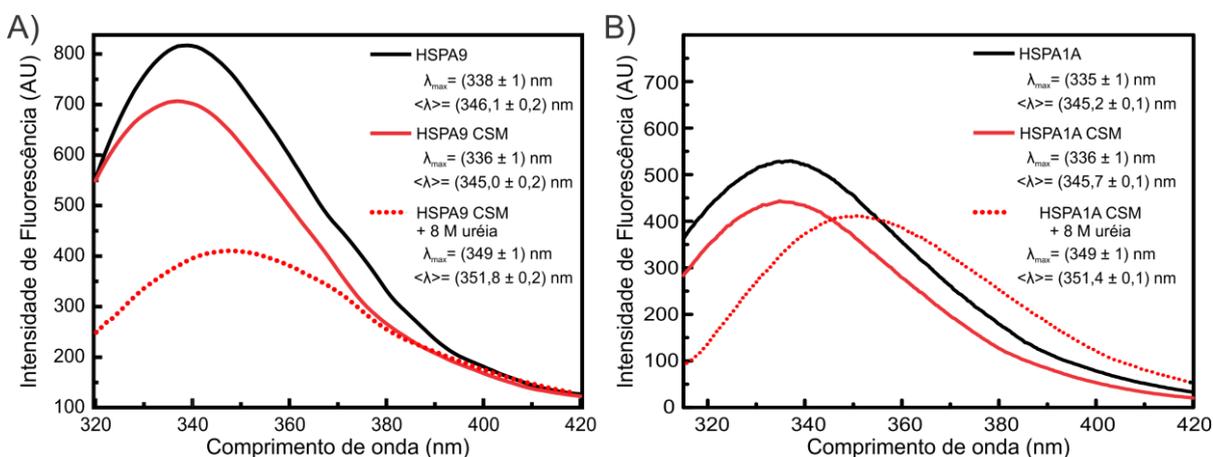
#### ***4.1.3 Estudo da estrutura terciária local das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs utilizando fluorescência intrínseca do triptofano indicam que os CSMs estudados possuem estrutura terciária local***

Foram realizados estudos de fluorescência intrínseca do triptofano com o intuito de observar a estrutura terciária local das proteínas, utilizando como sonda os resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (Trp, W) de cada uma das proteínas, que absorvem energia no comprimento de onda utilizado para a excitação (295 nm) e emitem entre 315-350 nm, dependendo do grau de exposição ao solvente aquoso. Quanto maior for essa exposição, maior será o deslocamento do pico para comprimentos de onda menos energéticos (BATISTA; GAVA; PINHEIRO; RAMOS *et al.*, 2015; JELESAROV; BOSSHARD, 1999).

A Figura 11A exibe os resultados obtidos para a HSPA9 que apresentou  $\lambda_{\max} = (338 \pm 1)$  nm e  $\langle \lambda \rangle = (346,1 \pm 0,2)$  nm. Para o seu CSM os dados mostraram pequena alteração com  $\lambda_{\max} = (336 \pm 1)$  nm e  $\langle \lambda \rangle = (345,0 \pm 0,2)$  nm, indicando que a mesma manteve estrutura terciária local, com triptofano menos exposto ao solvente, havendo deslocamento do  $\lambda_{\max}$  para comprimentos de onda mais energéticos (*blue shift*). Esses resultados sugerem o envolvimento do DLN, no qual se encontra o único triptofano da HSPA9, no processo de

formação dos CSMs. Além da medida em tampão TKP, o CSM também foi avaliado na presença de agente desnaturante ureia (8 M). Os resultados indicam uma alteração nos valores de  $\lambda_{\max}$  para  $(349 \pm 1)$  nm e  $\langle\lambda\rangle$  para  $(351,8 \pm 0,2)$  nm, deslocando o sinal para comprimento de onda menos energético (*red shift*), o que caracteriza a ocorrência de desenovelamento químico (DANIELSEN; HANSEN; HERBST; KJELDAL *et al.*, 2017).

**Figura 11 - Avaliação da estrutura terciária dos monômeros e CSMs das Hsp70 estudadas.** A) Fluorescência intrínseca do triptofano para a HSPA9 (em preto), seu CSM (em linha contínua vermelha) e este último na presença de agente desnaturante ureia (em linha descontínua vermelha). Os resultados indicam um *blue shift* para o CSM, sugerindo o envolvimento do domínio DLN no processo de oligomerização. B) Fluorescência intrínseca do triptofano para a HSPA1A (em preto), seu CSM (em linha contínua vermelha) e este último na presença de agente desnaturante (em linha descontínua vermelha). No geral, os dados sugerem que os CSMs de ambas as proteínas detêm estrutura terciária, já que sofreram desenovelamento após adição de ureia.



FONTE: Autoria própria.

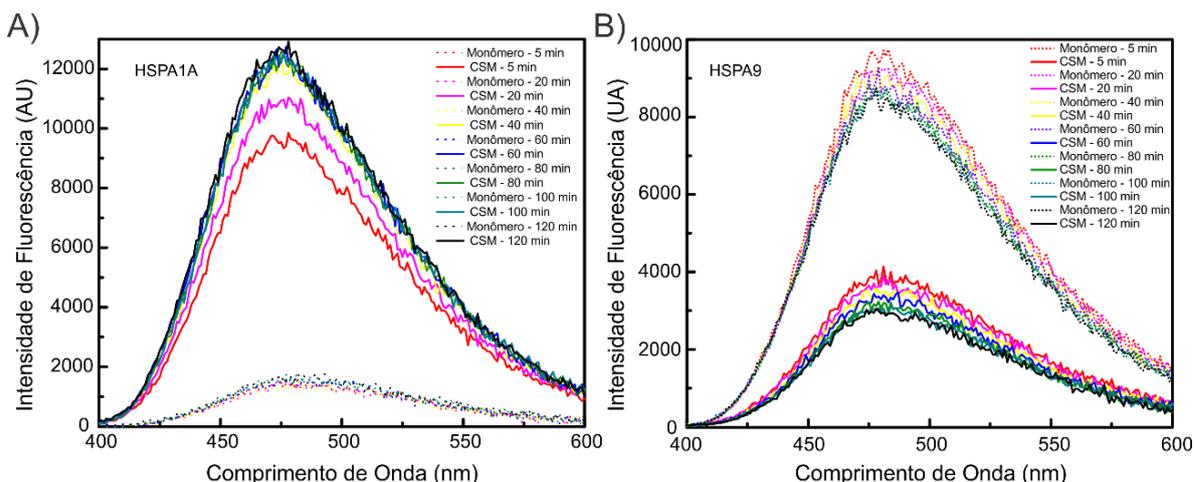
A Figura 11B exibe os resultados do mesmo experimento realizado para a HSPA1A e seu CSM, no qual a proteína monomérica exibiu  $\lambda_{\max} = (335 \pm 1)$  nm e  $\langle\lambda\rangle = (345,2 \pm 0,1)$  nm. O comportamento do CSM da HSPA1A foi semelhante ao apresentado pelo CSM da HSPA9, com  $\lambda_{\max} = (336 \pm 1)$  nm e  $\langle\lambda\rangle = (345,7 \pm 0,1)$  nm. De mesmo modo, a medida para o CSM na presença de agente desnaturante sofreu um *red shift*, com  $\lambda_{\max}$  de  $(349 \pm 1)$  nm e  $\langle\lambda\rangle$  de  $(351,4 \pm 0,1)$  nm, evidenciando o desenovelamento da proteína. Esse deslocamento do  $\lambda_{\max}$  observado indica aumento na exposição dos triptofanos ao solvente e, portanto, ambos os CSMs sofreram processo de desnaturação local, o que preconiza que os mesmos detinham estrutura terciária local. Ainda, essa estrutura não se mostrou resistente à ação de agentes desnaturantes químicos, diferentemente do comportamento observado para os agregados amilóides (DANIELSEN; HANSEN; HERBST; KJELDAL *et al.*, 2017).

Com o intuito de avaliar e comparar as estruturas terciárias das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs foram conduzidos experimentos de fluorescência com a sonda

extrínseca ANS, cuja intensidade de fluorescência aumenta significativamente ao ligar-se à regiões hidrofóbicas expostas de proteínas (GULIYEVA; GASIMOV, 2020). Os resultados apresentados na Figura 12 indicam que a sonda ANS interagiu tanto com a HSPA9 como com a HSPA1A e seus CSMs, apresentando máximo de fluorescência em torno de 475 nm, com pequenas alterações na intensidade de sinal em função do tempo.

Foi possível observar diferenças no comportamento entre as proteínas estudadas, já que na interação com o CSM da HSPA9 ocorreu uma redução na intensidade de fluorescência da sonda quando comparada à interação com seu respectivo monômero. Para a HSPA1A ocorreu o inverso, a sonda apresentou maior intensidade de fluorescência quando em contato com o CSM. De maneira geral, apesar da similaridade estrutural entre as proteínas avaliadas, esses resultados indicaram a existência de diferenças com relação à estrutura terciária dos CSMs, no qual o CSM da HSPA1A apresenta um aumento na exposição de superfícies hidrofóbicas ao solvente, com as quais o ANS interage. Essas observações estão alinhadas com os resultados obtidos para os monômeros, que também apresentaram diferenças quanto à exposição de sítios hidrofóbicos ao solvente, confirmando a existência de peculiaridades estruturais entre as Hsp70 avaliadas.

**Figura 12 - Ensaio de fluorescência com a sonda extrínseca ANS.** A) Emissão de fluorescência da sonda interagindo com a HSPA1A (linhas descontínuas) e seu CSM (linhas contínuas) de maneira dependente do tempo. É possível observar que a sonda tem maior emissão quando interage com os CSMs de HSPA1A. B) Experimento realizado para a HSPA9 (linhas descontínuas) e seu CSM (linhas contínuas), no qual a sonda ANS apresenta maior emissão quando interage com o monômero, de maneira contrária àquela apresentada para HSPA1A.

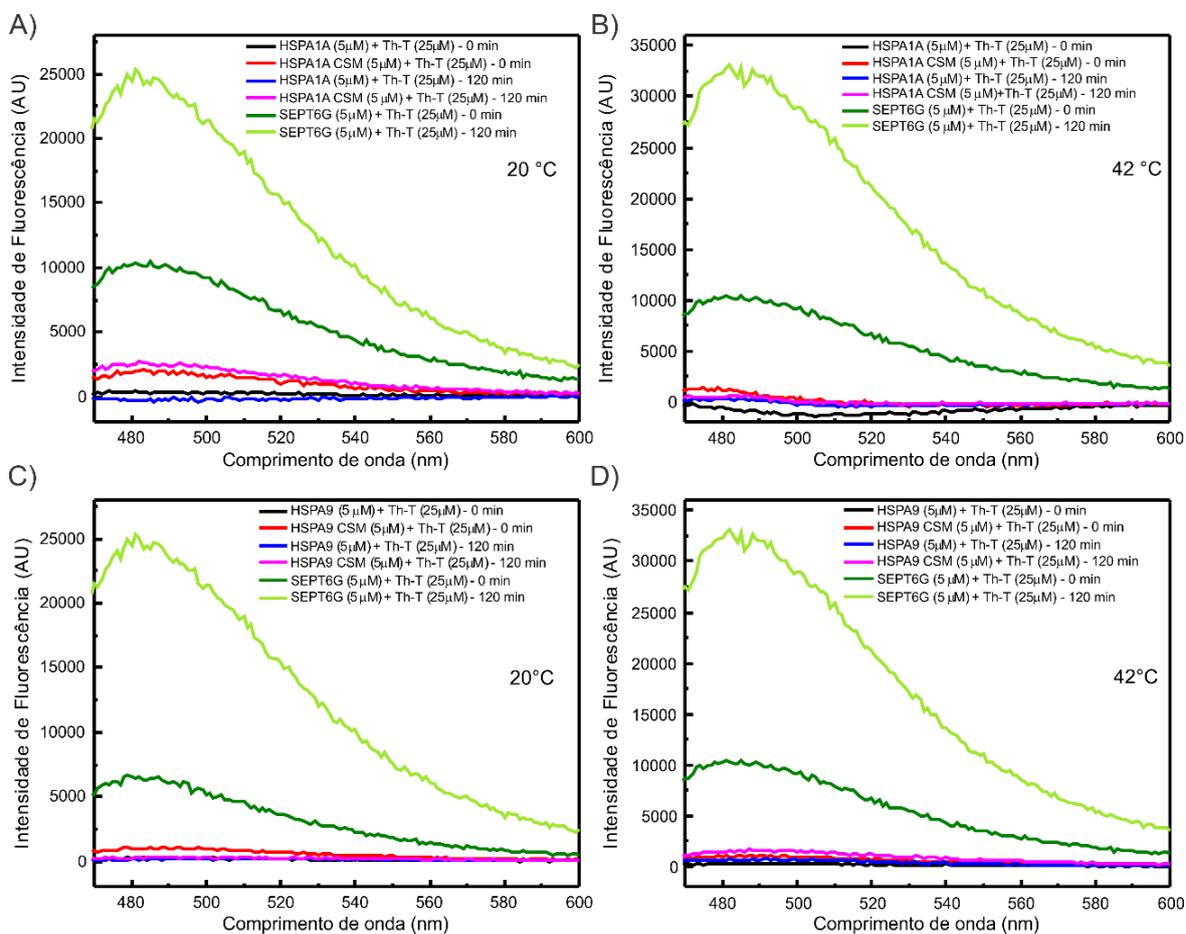


FONTE: Autoria própria.

Investigou-se também a interação entre os CSMs das Hsp70 estudadas com a sonda extrínseca Th-T. A alta especificidade dessa sonda por fibras amilóides, resultando no

aumento de sua fluorescência, e o fato de a mesma não interagir com proteínas enoveladas, desenoveladas ou mesmo agregados amorfos, faz com que a mesma seja utilizada como um padrão ouro para detecção da formação de estruturas  $\beta$ -amilóides (SULATSKY; SULATSKAYA; POVAROVA; ANTIFEEVA *et al.*, 2020).

**Figura 13 – Experimento controle com tioflavina-T (Th-T).** A) O experimento realizado para a HSPA1A e seu CSM. A proteína SEPT6G foi usada como controle positivo. B) Experimento foi realizado à 42 °C. C) De maneira semelhante, a emissão de fluorescência da HSPA9 e seu CSM foi avaliada na presença de Th-T, mantidos a 20 °C e D) a 42 °C. De maneira geral foi possível observar que a sonda extrínseca Th-T interagiu de maneira inespecífica com as Hsp70 estudadas, apresentando intensidades de fluorescência pequenas quando em comparação com o controle positivo (SEPT6G).



FONTE: Autoria própria.

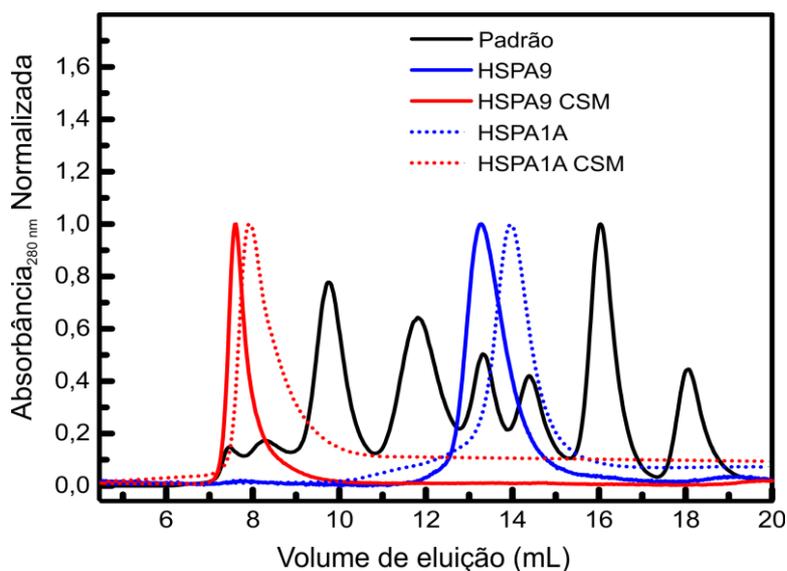
Os resultados apresentados na Figura 13 indicam que a interação da sonda Th-T com ambos os CSMs resultaram em baixas intensidades de fluorescência, de maneira independente da temperatura e/ou do tempo de incubação, em comparação com a intensidade de fluorescência resultante da interação da sonda com a SEPT6G, usada como controle positivo. Portanto, ainda que resultados obtidos por CD tenham apontado o aumento na quantidade de estruturas secundárias do tipo folha- $\beta$ , experimentos utilizando a sonda

extrínseca Th-T corroboram os dados de fluorescência realizados na presença de agente desnaturante, reafirmando que a formação dos CSMs não resulta em estruturas  $\beta$ -amilóides.

#### 4.1.4 Determinação de parâmetros hidrodinâmicos a partir de cromatografia de exclusão por tamanho analítica

A massa molecular aparente das proteínas HSPA9 e HSPA1A antes e depois da formação dos CSMs foi avaliada por aSEC, técnica que permite a análise de macromoléculas em solução separando-as de acordo com suas dimensões, além de fornecer parâmetros hidrodinâmicos. A partir do volume de eluição de cada amostra e utilizando a Equação 2 foi possível determinar o  $K_{av}$  das proteínas. Representando os valores do logaritmo da massa molecular do padrão de proteínas apresentados na Tabela 2 *versus* os valores de  $K_{av}$ , também foi determinada a  $MM_{app}$  das proteínas de interesse. O  $R_s$  experimental de cada uma das amostras foi determinado a partir do gráfico de  $R_s$  (Tabela 2) *versus*  $-\log.K_{av}^{1/2}$ . Por fim, a  $f/f_0$  foi obtida de acordo com (LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002), por meio da razão entre o  $R_s$  experimental e o raio de uma esfera com mesma massa ( $R_0$ ). O  $R_0$  teórico para as proteínas HSPA9 e HSPA1A foi calculado pelo Sednterp ([www.jphilo.mailway.com/download.htm](http://www.jphilo.mailway.com/download.htm)), resultando no valor de 27 Å.

**Figura 14 - Cromatografia de exclusão por tamanho analítica.** Linhas cheias correspondem ao resultado para a HSPA9 (azul) e seu CSM (vermelho) e pontilhado referente à HSPA1A (azul) e seu CSM (vermelho). Resultados indicam que os CSMs eluíram no  $V_0$  da coluna, como esperado. A HSPA9 apresentou perfil de eluição com  $MM_{app}$  de 83 kDa enquanto a HSPA1A eluiu um pouco depois, com  $MM_{app}$  de 67 kDa.



FONTE: A autoria própria.

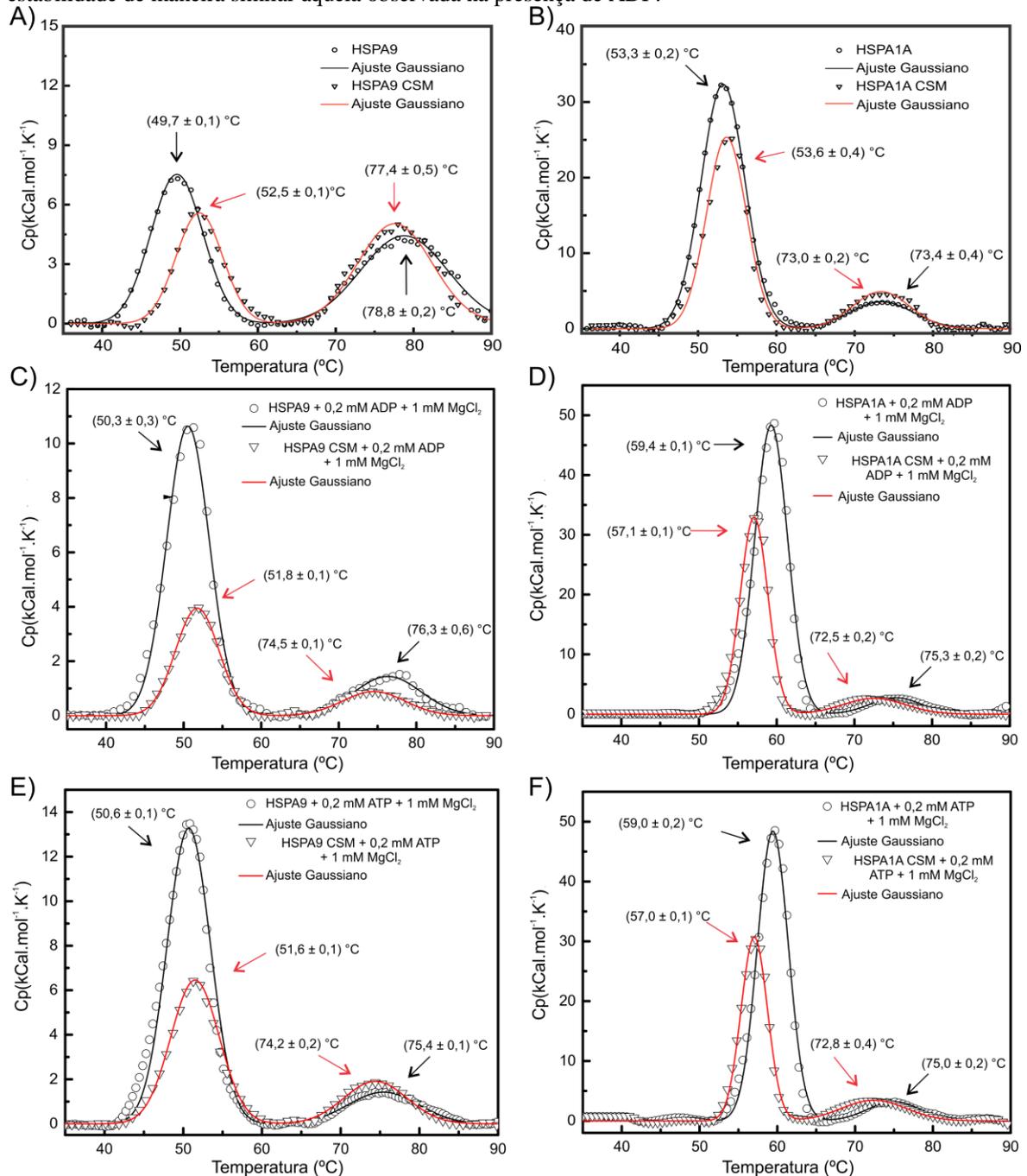
A Figura 14 exibe os gráficos obtidos para a HSPA9 (em azul) e seu CSM (em vermelho) nas linhas cheias e para a HSPA1A (em azul) e seu CSM (em vermelho) nas linhas pontilhadas. A mistura de proteínas padrão é representada pela linha contínua em preto. À 25 °C, a HSPA9 e a HSPA1A se comportam como espécies monoméricas (curvas em azul) como reportado anteriormente (BORGES; RAMOS, 2006; 2009; DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015). A HSPA9 eluiu em aproximadamente 13 mL, apresentando  $MM_{app}$  de 83 kDa,  $R_s$  de 36 Å e  $f/f_0$  de 1,3, indicando que possui uma forma levemente alongada. A HSPA1A eluiu em aproximadamente 14 mL, com  $MM_{app}$  de 67 kDa,  $R_s$  de 32 Å e  $f/f_0$  de 1,2, também indicando formato levemente alongado. Pode-se observar que, após tratamento térmico à 42 °C, os CSMs (em vermelho) eluíram no  $V_0$  da coluna, em cerca de 8 mL, indicando massa molecular similar ao blue dextran, de 2000 kDa. Esses resultados também demonstram que, uma vez formados, os CSMs permanecem estáveis em solução.

#### ***4.1.5 O estudo da estabilidade térmica das proteínas estudadas revelou a presença de duas transições e diferentes estabilidades, com o envolvimento do DLN na formação dos CSMs***

O DSC é uma técnica que envolve medidas de alteração de calor entre duas celas, a que contém a amostra de interesse e a referência, em função da temperatura. Quando sob taxa de aquecimento constante, amostras proteicas iniciam um processo de transição conformacional que resulta no aumento da absorção de energia, gerando um deslocamento da linha de base e dando origem a um pico. À medida que a proteína assume um estado desenovelado a energia é estabilizada e o sinal retorna à linha de base, porém num patamar superior pois a forma desenovelada tem maior capacidade calorífica ( $C_p$ ) devido à hidratação de suas partes hidrofóbicas (BATISTA; GAVA; PINHEIRO; RAMOS *et al.*, 2015; JELESAROV; BOSSHARD, 1999). Essas diferenças de energia no sistema refletem em alterações na  $C_p$ , que permitem o cálculo da variação de  $C_p$  ( $\Delta C_p$ ). A área da transição da  $C_p$  em função da temperatura permite o cálculo da variação da entalpia de desnaturação aparente ( $\Delta H_{app}$ ) e a determinação da temperaturas de transição térmica, ou temperatura de *melting* ( $T_m$ ) do processo (JOHNSON, 2013). Essa técnica possibilitou o acompanhamento do comportamento das proteínas monoméricas e seus CSMs, na presença de ATP ou ADP e  $MgCl_2$ , durante o desenovelamento térmico. Todas as amostras avaliadas apresentaram termogramas com duas transições bem definidas, sendo a 1ª relacionada à estabilidade do

DLN e a 2ª referente ao DLP, de maneira coerente com o reportado para as Hsp70 (BORGES; RAMOS, 2006; MONTGOMERY; MORIMOTO; GIERASCH, 1999).

**Figura 15 - Desenovelamento térmico acompanhado pelo DSC.** A) Termograma para HSPA9 (em preto) e seu CSM (em vermelho). Na 1ª transição o CSM se mostra mais estável, com comportamento contrário quando à 2ª transição. B) O mesmo experimento realizado para HSPA1A (em preto) e seu CSM (em vermelho). As transições apresentam diferenças mais sutis quando comparadas ao observado para HSPA9. C) HSPA9 na presença de ADP e MgCl<sub>2</sub>, o que aumenta a estabilidade do monômero na 1ª transição. D) HSPA1A na presença de ADP e MgCl<sub>2</sub>, o que favorece a estabilidade de ambos monômero e CSM quanto à primeira transição e da segunda transição somente para o monômero. E) HSPA9 na presença de ATP e MgCl<sub>2</sub>, aumentando a estabilidade do monômero na 1ª transição. F) HSPA1A na presença de ATP e MgCl<sub>2</sub>, o que aumenta a estabilidade de maneira similar àquela observada na presença de ADP.

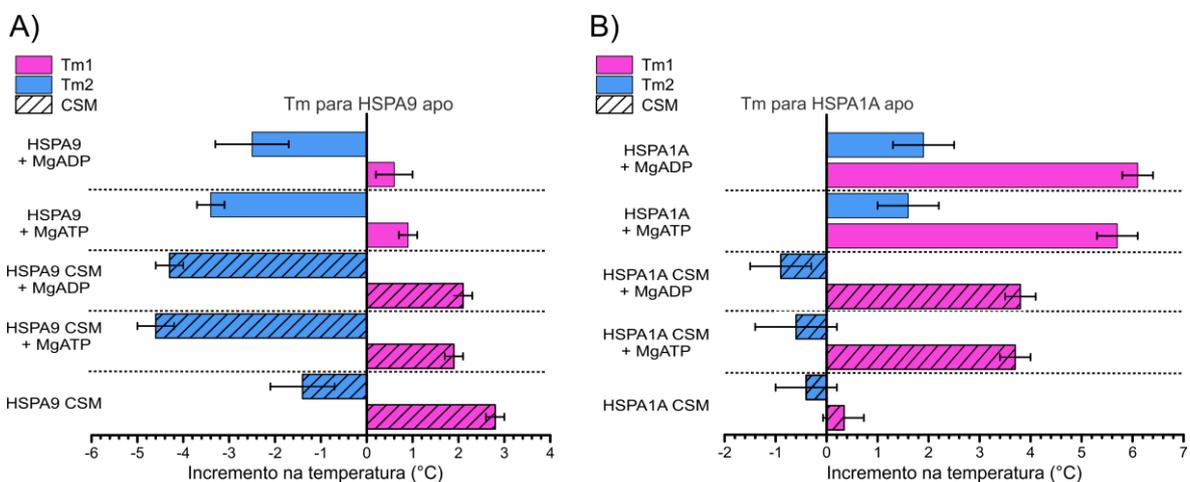


FONTE: Autoria própria.

Nas Figura 15A e B pode-se comparar as duas transições referentes às proteínas monoméricas e seus respectivos CSMs, sem adição de nucleotídeos. O CSM de ambas as proteínas mostrou um aumento na estabilidade referente à 1ª transição, de maneira mais pronunciada para a HSPA9, o que sugere que o processo de formação do complexo mantido à 42 °C envolve o DLN, resultando em uma estrutura com maior estabilidade com relação à este domínio. Este resultado reafirma o envolvimento do DLN na formação do CSM já observado por fluorescência intrínseca do triptofano.

Ao avaliar as alterações na  $T_m$  de cada condição com relação ao seus respectivos monômeros na forma apo, percebe-se que ligação de nucleotídeos ATP ou ADP e  $MgCl_2$  ao DLN acarretou em um aumento na estabilidade na 1ª transição das proteínas avaliadas, como é resumido pelo gráfico apresentado na Figura 16 (barras em rosa) e também pode ser observado nas Figura 15 C-F, o que indica que a presença dessas moléculas causou mudanças conformacionais que estabilizaram o DLN.

**Figura 16 – Gráfico representativo da alteração da  $T_m$  com relação à Hsp70 monomérica.** Barras em rosa representam a 1ª transição enquanto as em azul representam a 2ª. Barras representando os dados relativos aos CSMs são hachuradas. A) Incrementos relativos à HSPA9, onde é possível observar que há um aumento na estabilidade para a 1ª transição e redução na estabilidade da 2ª transição de todas as condições. B) Incrementos relativos à HSPA1A. Pode-se observar que a adição de nucleotídeos ao monômero tem comportamento diferente daquele apresentado pela HSPA9, havendo aumento na estabilidade em ambas as transições. Para os CSMs o comportamento se manteve semelhante, com menores reduções na estabilidade da 2ª transição.



FONTE: Autoria própria.

Alterações na conformação do DLN refletem em mudanças conformacionais do DLP, como já mencionado anteriormente. Dessa maneira, a adição de nucleotídeos às amostras ocasionou alterações no DLP que reduziram sua estabilidade, quando comparadas às proteínas monoméricas na forma apo, resultando na redução da  $T_m$  da 2ª transição, como pode ser observado nas Figura 15 C-F e no gráfico da Figura 16 (barras em azul). Uma

exceção a esse comportamento foi observada para a HSPA1A, que apresentou  $T_m$  maior para a 2ª transição na presença de nucleotídeos e  $MgCl_2$ , sugerindo que as mudanças conformacionais no DLP resultaram em estruturas mais estáveis, para este domínio.

É importante destacar que o processo de formação do CSM causou aumento na estabilidade térmica mais expressivo para a HSPA9 quando comparado à HSPA1A, no que se diz respeito à 1ª transição. A 2ª transição apresentou maior redução na estabilidade térmica para o CSM da HSPA9 do que para o CSM da HSPA1A. Esses dados indicam mais uma vez que as estruturas supramoleculares dessas duas Hsp70 humanas apresentam diferenças, como já mencionado quanto aos experimentos de fluorescência realizados na presença da sonda extrínseca ANS.

**Tabela 5** - Dados resultantes do experimento de DSC.

		Amostra			
		<i>apo</i>	MgATP	MgADP	
$T_{m1}$ (°C)	HSPA9	Monômero	49.7 ± 0.1	50.6 ± 0.1	50.3 ± 0.3
		CSM	52.5 ± 0.1	51.6 ± 0.1	51.8 ± 0.1
	HSPA1A	Monômero	53.3 ± 0.2	59.0 ± 0.2	59.4 ± 0.1
		CSM	53.2 ± 0.4	57.0 ± 0.1	57.1 ± 0.1
$T_{m2}$ (°C)	HSPA9	Monômero	78.8 ± 0.2	75.4 ± 0.1	76.3 ± 0.6
		CSM	77.4 ± 0.5	74.2 ± 0.2	74.5 ± 0.1
	HSPA1A	Monômero	73.4 ± 0.4	75.0 ± 0.2	75.3 ± 0.2
		CSM	73.0 ± 0.2	72.8 ± 0.4	72.5 ± 0.2
$\Delta H_{app1}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	HSPA9	Monômero	270 ± 30	380 ± 30	310 ± 20
		CSM	160 ± 10	220 ± 20	120 ± 20
	HSPA1A	Monômero	940 ± 50	1010 ± 60	1100 ± 50
		CSM	640 ± 30	550 ± 30	610 ± 20
$\Delta H_{app2}$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	HSPA9	Monômero	260 ± 20	70 ± 10	70 ± 10
		CSM	250 ± 20	80 ± 10	50 ± 10
	HSPA1A	Monômero	150 ± 20	120 ± 20	90 ± 20
		CSM	190 ± 20	160 ± 20	120 ± 20

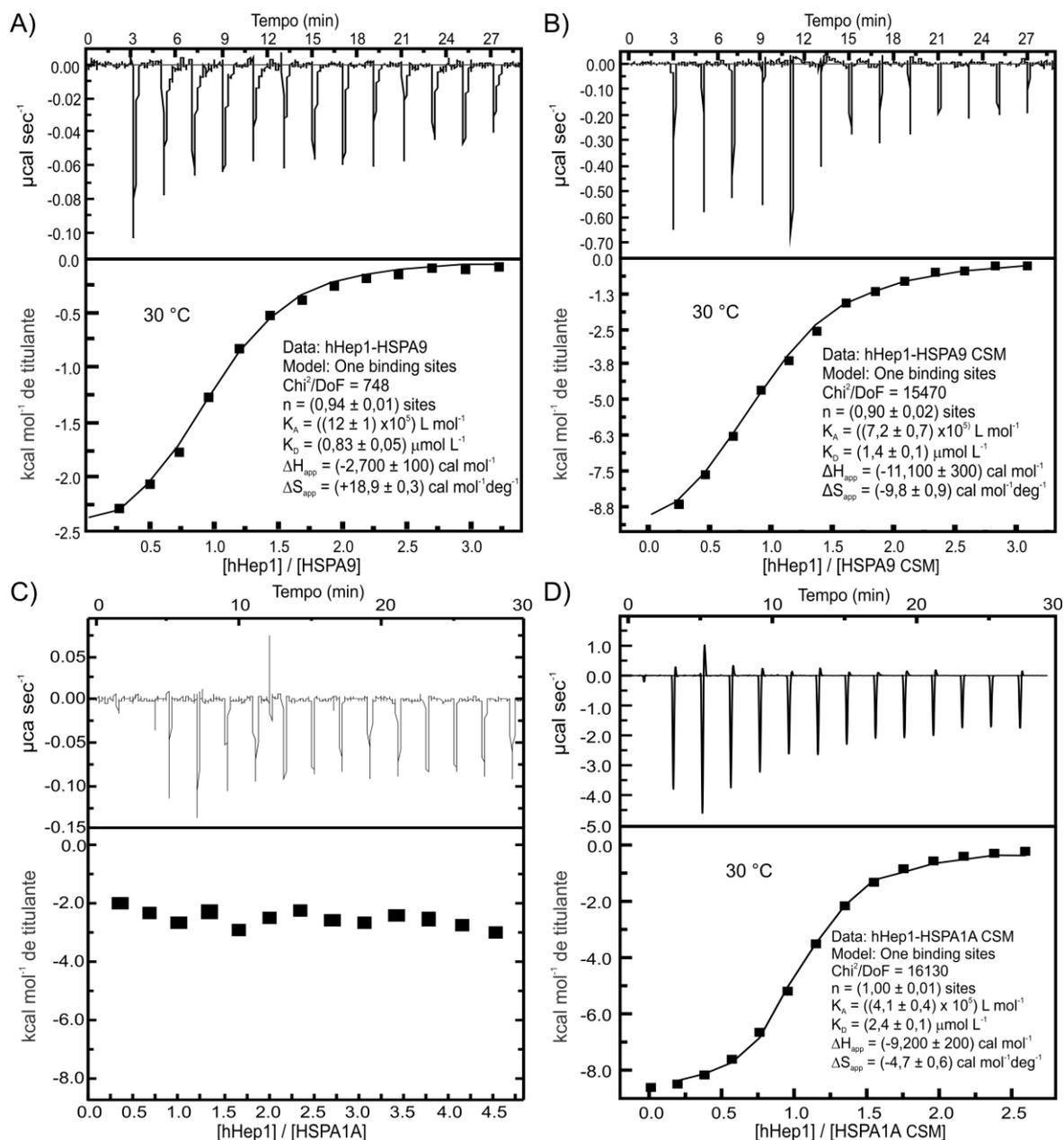
FONTE: Autoria própria.

A Tabela 5 sumariza os dados de  $T_m$  e entalpia obtidos desse experimento. Com relação às medidas de entalpia, todos os valores foram positivos, indicando que o processo de desenovelamento de todas as amostras avaliadas foi endotérmico. Ao compararmos a entalpia de desnaturação aparente referente à 1ª transição ( $\Delta H_{app1}$ ) entre as proteínas no estado monomérico e seus CSMs sem a adição de nucleotídeos, observa-se uma redução substancial da mesma, sugerindo novamente o envolvimento de alterações conformacionais no DLN durante o processo de formação dos complexos. Quanto à entalpia de desnaturação aparente referente à 2ª transição ( $\Delta H_{app2}$ ), percebe-se que houve uma redução nos valores ao adicionar nucleotídeos e  $MgCl_2$  às proteínas, especialmente para a HSPA9, o que reitera o fato de que alterações no DLN afetam o DLP das mesmas.

#### ***4.1.6 Estudos de interação entre a hHep1 com as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs revelaram que a co-chaperona foi capaz de interagir com os CSMs de maneira independente da adição de nucleotídeos***

A técnica de ITC nos permite medir a quantidade de calor liberado ou absorvido resultante de uma interação entre biomoléculas. Os testes foram conduzidos para melhor compreender a interação entre a hHep1 e as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs. Na Figura 17 se encontram os isotermogramas obtidos a partir da titulação de hHep1 nas chaperonas. Os resultados indicam que hHep1 interagiu com a HSPA9 (Figura 17A) e seu CSM (Figura 17B) com constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $(0,83 \pm 0,05) \mu mol.L^{-1}$  e  $(1,4 \pm 0,2) \mu mol.L^{-1}$ , respectivamente, e com razão estequiométrica próxima a 1 para ambos os casos. No entanto, o sinal de interação obtido ao titular a hHep1 em HSPA1A no estado monomérico não foi o suficiente para que a mesma seja avaliada por ITC (Figura 17C), devido às limitações da técnica. Considerando que o calor referente à cada injeção é proporcional à área sob o pico apresentado no isotermograma, e que uma diferença razoável entre a quantidade de calor de interação e a linha de base em um espaço curto de tempo é necessária, não houve geração de calor o suficiente nas condições testadas (MINARI; DE AZEVEDO; KIRALY; BATISTA et al., 2019). Em contrapartida, a hHep1 interagiu com o CSM da HSPA1A, apresentando um  $K_D$  de  $(2,4 \pm 0,1) \mu mol.L^{-1}$  e estequiometria igual a 1 (Figura 17D). O gráfico das assinaturas termodinâmicas indica que as afinidades da hHep1 pela HSPA9 e seu CSM são semelhantes, conforme indicado pela mudança nos valores de energia livre de Gibbs aparente ( $\Delta G_{app}$ ), representado pelas barras em cinza (Figura 18).

**Figura 17 – Interação da co-chaperona hHep1 com as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSM.** A) e B) Isotermogramas obtidos para a interação de HSPA9 e seu CSM com a hHep1, respectivamente. Dados sugerem que as mesmas ocorrem com estequiometria próxima de 1, apresentando afinidades semelhantes e  $\Delta G$  negativa, indicando um processo exergônico. C) e D) Isotermogramas obtidos para a interação de HSPA1A e seu CSM com a hHep1, respectivamente. Não foi possível observar interação entre a co-chaperona e a HSPA1A. Já com o CSM a interação resultou em estequiometria igual a 1, num processo exotérmico. Os valores apresentados são a média de três experimentos independentes.

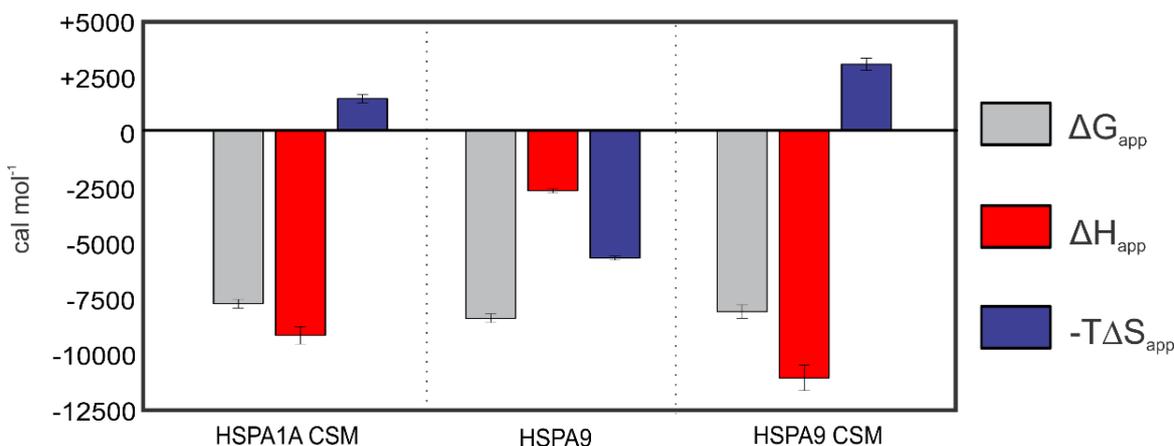


FONTE: Autoria própria

No entanto, existem algumas diferenças nessa interação. A variação de entalpia de ligação aparente ( $\Delta H_{\text{app}}$ ) obtida da titulação de hHep1 no CSM da HSPA9 foi 4 vezes maior do que aquela obtida da interação entre a hHep1 e a HSPA9, provavelmente devido à liberação de calor relacionada à formação de interações eletrostáticas e ligações de

hidrogênio (LAFONT; ARMSTRONG; OHTAKA; KISO *et al.*, 2007). Já com relação à mudança de entropia aparente ( $\Delta S_{app}$ ), representados pelas barras azuis na Figura 18, percebe-se que há uma penalidade para a interação com o CSM, enquanto processo com a HSPA9 é favorecido. Portanto, a interação termodinâmica entre a hHep1 e a HSPA9 é conduzida por processos entálpicos e entrópicos e a interação com o CSM é majoritariamente impulsionada pela entalpia, com um considerável custo entrópico.

**Figura 18 – Gráfico de assinatura termodinâmica obtida a partir dos experimentos de ITC.** Barras em vermelho indicam a variação de entalpia, em azul a variação de entropia e em cinza a variação de energia livre. Os dados sugerem que as interações de hHep1 com monômeros e CSMs seguem diferentes mecanismos termodinâmicos. Os CSMs apresentam um processo dirigido entalpicamente, com penalidades entrópicas. Já o monômero de HSPA9 apresenta um processo com entalpia e entropia favorecendo o processo. As interações são exotérmicas.



FONTE: Autoria própria.

A interação com o CSM da HSPA1A também envolveu uma penalidade na variação de entropia e apresentou variação de entalpia semelhante àquela observada para o CSM da HSPA9 (Figura 18). Pode-se supor que essa redução no grau de liberdade de interação da hHep1 com os CSMs ocorra devido à incorporação de moléculas de hHep1 nos CSMs e/ou à maior absorção de moléculas de água, que podem ser necessárias para que a interação entre as proteínas ocorra. No entanto, seria esperado uma estequiometria de interação menor que 1 para as interações, já que a ligação de hHep1 aos CSMs supostamente ocorre em sua superfície e alguns protômeros de Hsp70 poderiam estar enterrados e indisponíveis para interagir com a hHep1. Portanto, as explicações para essa penalidade entrópica e para a estequiometria da reação com os CSMs ainda são incertas. Os parâmetros termodinâmicos experimentais obtidos para a interação da hHep1 com a HSPA9 e ambos CSMs são resumidos na Tabela 6. Ademais, os dados obtidos por ITC indicaram que a interação das

Hsp70 estudadas com a hHep1 ocorreu independentemente da adição de nucleotídeos, sugerindo que a mesma não requer um estado conformacional específico.

**Tabela 6** - Parâmetros experimentais obtidos por ITC.

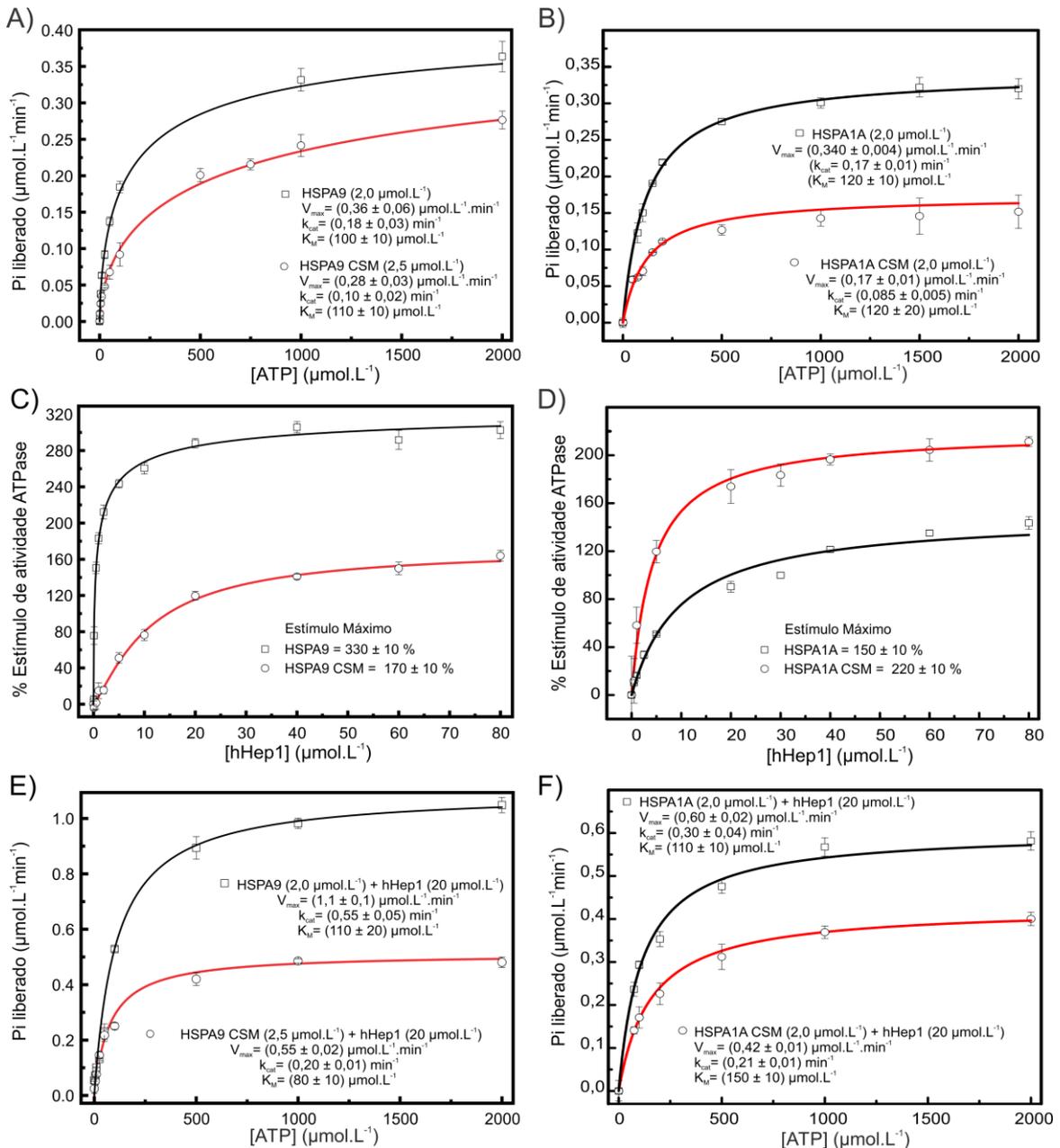
	<b>HSPA9</b>	<b>CSM da HSPA9</b>	<b>CSM da HSPA1A</b>
<b>Estequiometria (n)</b>	0,94 ± 0,01	0,90 ± 0,02	1,00 ± 0,01
<b><math>\Delta H_{app}</math> (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-2.700 ± 100	-11.100 ± 300	-9.200 ± 200
<b><math>-T\Delta S_{app}</math> (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-5730 ± 90	+2970 ± 270	+1420 ± 180
<b><math>K_A</math> (10<sup>5</sup>.L.mol<sup>-1</sup>)</b>	12 ± 1	7,2 ± 0,7	4,1 ± 0,4
<b><math>\Delta G_{app}</math> (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-8400 ± 100	-8100 ± 300	-7800 ± 200
<b><math>K_D</math> (μmol.L<sup>-1</sup>)</b>	0,83 ± 0,05	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1

FONTE: Autoria própria.

***4.1.7 Estudos de atividade das proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs, indicaram que os CSMs detêm atividade ATPásica e que a hHep1 foi capaz de estimulá-la***

A funcionalidade das proteínas foi estudada por meio da avaliação da atividade ATPásica basal e estimulada das Hsp70. É importante destacar que as Hsp70 apresentam baixa taxa de hidrólise de ATP (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015), sendo conhecidas por necessitarem do auxílio de co-chaperonas para estimular a mesma (KITYK; KOPP; SINNING; MAYER, 2012), o que justifica os valores baixos obtidos para a  $V_{máx}$ . As Figuras 19A e B apresentam os dados obtidos para as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus respectivos CSMs, variando a concentração de ATP de 0 a 2 mmol.L<sup>-1</sup>. As proteínas monoméricas apresentaram parâmetros cinéticos coerentes com dados reportados na literatura (DORES-SILVA; BARBOSA; RAMOS; BORGES, 2015). Além disso, ambos CSMs mantiveram atividade ATPásica, ainda que menor do que aquela apresentada pelas frações monoméricas, com  $K_M$  similar aos monômeros, sugerindo que o processo de formação dos complexos não interferiu na ligação dos mesmos ao ATP. A concentração de ATP em que observou-se a maior velocidade de reação, com saturação do sistema, (1 mmol.L<sup>-1</sup>) foi utilizada para a execução dos experimentos seguintes.

**Figura 19 - Atividade ATPásica das Hsp70 e seus CSMs na ausência e presença da hHep1.** A) Ajuste de Michaelis-Menten para a atividade ATPásica da HSPA9 e de seu CSM. O CSM apresenta cerca de 60% do valor da  $k_{cat}$  da HSPA9. B) O mesmo experimento é realizado para a HSPA1A, com CSM apresentando cerca de 50% do valor da  $k_{cat}$  da proteína monomérica. C) Porcentagem de estímulo da atividade ATPásica em função da concentração de hHep1, estimulando a HSPA9 em 330% e seu CSM em 170%. D) Co-chaperona hHep1 estimula a HSPA1A em 150% e seu CSM em 220%. E) Experimento realizado fixando concentração das proteínas e variando a concentração de ATP, no qual se observa o incremento da atividade ATPásica das chaperonas na presença da hHep1. F) Experimento fixando concentração de proteínas e variando ATP, no qual se observa incremento da atividade ATPásica na presença de hHep1.



FONTE: Autoria própria.

Em seguida, foi realizado o experimento fixando as concentrações das Hsp70 estudadas e do ATP (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), variando a concentração de hHep1 de 0 a 80  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . O resultado para a HSPA9 é exibido na Figura 19C, e indica que a hHep1 foi capaz de estimular

a atividade ATPásica da fração monomérica em 330% e de seu CSM em 170%. Para o monômero da HSPA1A o resultado na Figura 19D indica que a co-chaperona foi capaz de estimular a atividade ATPásica em 150%, com menor eficiência do que a observada para a HSPA9. Já para o CSM da HSPA1A o estímulo foi de 220%, maior do que o exibido para o CSM da HSPA9, o que pode ser explicado pela baixa atividade do CSM na ausência da co-chaperona. Como o estímulo máximo para as proteínas foi alcançado a partir da adição de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  da co-chaperona, essa concentração foi utilizada nos experimentos seguintes.

Finalmente, o último experimento de atividade ATPásica para as Hsp70 na presença de hHep1 foi realizado fixando as concentrações das proteínas e variando a concentração de ATP entre 0 e  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Nos painéis E e F da Figura 19, observa-se o aumento da atividade ATPásica das Hsp70 monoméricas na presença de hHep1, indicando que a mesma foi capaz de modular seu ciclo molecular, bem como de seus CSMs. A presença da co-chaperona levou a um aumento dos valores de  $V_{\text{max}}$ , mas não alterou a  $K_M$ , sugerindo que a mesma atua reduzindo a “barreira energética” para atingir o estado de transição necessário para catalisar a hidrólise de ATP. A Tabela 7 resume as constantes catalíticas obtidas.

**Tabela 7** – Constantes catalíticas obtidas a partir dos experimentos de atividade ATPásica.

Proteína	Amostra	Estímulo Máximo	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Razão $k_{\text{cat}}$ #	$K_M$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
<b>HSPA9</b>	Monômero	-----	$0,18 \pm 0,03$	-----	$100 \pm 10$	-----
	CSM	-----	$0,10 \pm 0,02$	-----	$110 \pm 10$	-----
<b>HSPA1A</b>	Monômero	-----	$0,17 \pm 0,01$	-----	$120 \pm 10$	-----
	CSM	-----	$0,085 \pm 0,005$	-----	$120 \pm 20$	-----
<b>HSPA9 + hHep1</b>	Monômero	$330 \pm 10\%$	$0,55 \pm 0,05$	$3,1 \pm 0,5$	$110 \pm 20$	$1,0 \pm 0,1$
	CSM	$170 \pm 10\%$	$0,20 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,2$	$80 \pm 10$	$11 \pm 1$
<b>HSPA1A + hHep1</b>	Monômero	$150 \pm 10\%$	$0,30 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,2$	$110 \pm 10$	$10 \pm 1$
	CSM	$220 \pm 10\%$	$0,21 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,2$	$150 \pm 10$	$4,3 \pm 0,5$

# Razão da  $k_{\text{cat}}$  entre os experimentos realizados na presença da co-chaperona hHep1 e em sua ausência.

FONTE: A autoria própria.

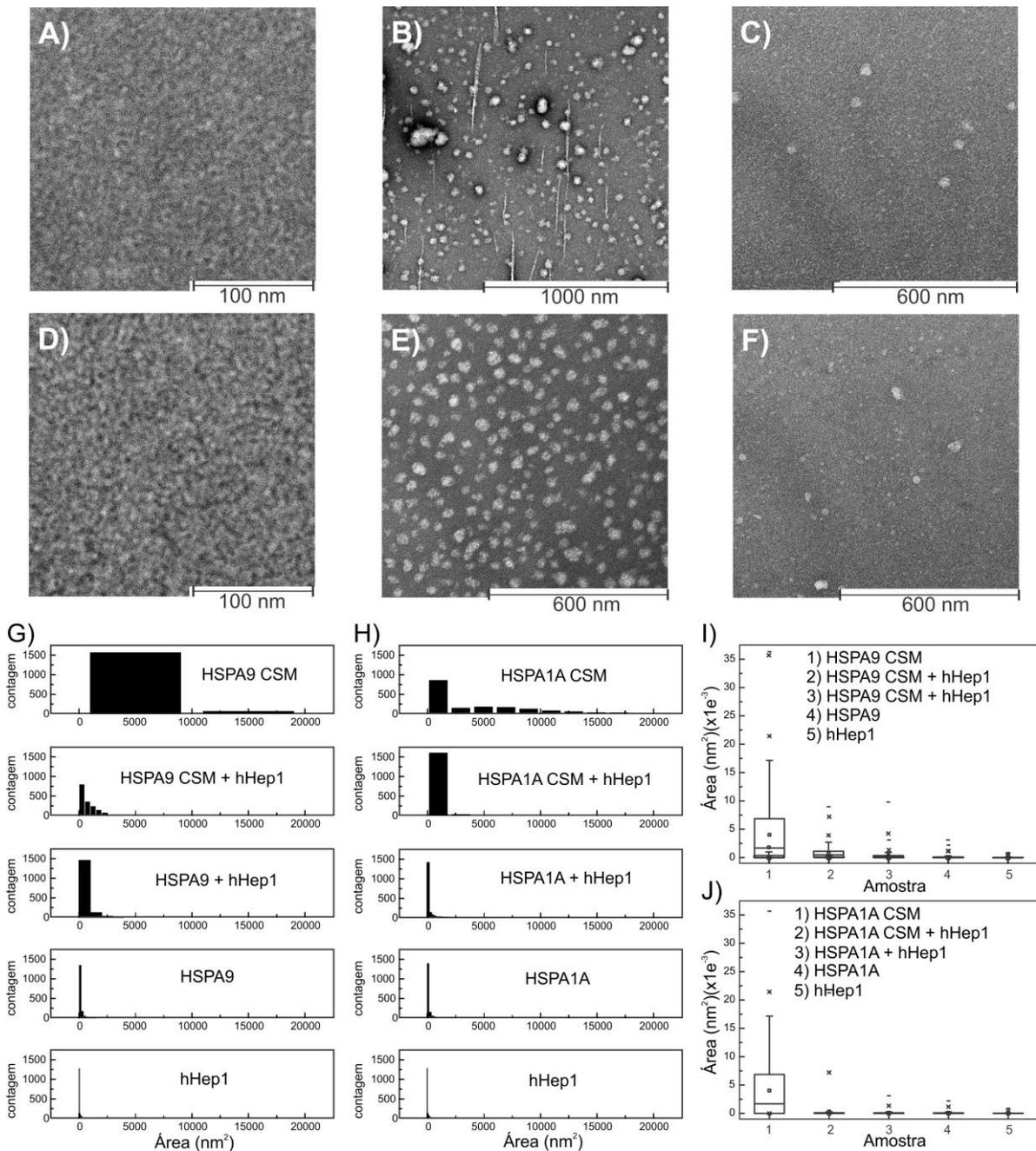
De maneira geral a hHep1 estimulou cerca de 2 a 3 vezes a atividade ATPásica das proteínas nas frações monoméricas e CSMs, o que pode ser observado a partir da razão entre a  $k_{cat}$  obtida dos experimentos na presença e ausência de hHep1. Como ambos os CSMs apresentaram atividade ATPásica parcial e a hHep1 foi capaz de estimulá-las, é provável que esse estímulo ocorra tanto pela atuação da hHep1 sobre os CSMs quanto sobre monômeros potencialmente resgatados do complexo.

#### ***4.1.8 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão indicam que a hHep1 é capaz de remodelar os CSMs estudados***

Imagens em contraste negativo, ou *negative-stain*, consiste na deposição de um sal metálico sobre a grade contendo a amostra, o que gera um contraste da macromolécula que pode ser observado no microscópio eletrônico. Desse experimento foi possível obter estatísticas referentes ao tamanho das partículas formadas pelos CSMs da HSPA9 e da HSPA1A, comparando-as com o comportamento das proteínas no estado monomérico, bem como observar o efeito da co-chaperona hHep1 sobre esses CSMs. A Figura 20 sumariza os resultados obtidos.

As micrografias para a HSPA9 e HSPA1A indicaram homogeneidade das amostras na fração monomérica, compostas por partículas que ocupam de cerca de  $100 \text{ nm}^2$  (Figura 20A e B, respectivamente). Após tratamento térmico, as micrografias para os CSMs revelaram o surgimento de partículas grandes, com alta polidispersividade e desprovidas de qualquer padrão morfológico, apresentando diferenças consideráveis com relação ao tamanho apresentado por seus respectivos monômeros. Em média, o CSM da HSPA9 (Figura 20B) apresentou distribuição do tamanho de partículas de 200 a aproximadamente  $20.000 \text{ nm}^2$  (Figura 20G). Já o CSM da HSPA1A (Figura 20E) apresentou partículas com polidispersividade menor do que a observada para o CSM da HSPA9 com distribuição de tamanho de partículas entre  $80 \text{ nm}^2$  e  $17.000 \text{ nm}^2$  (Figura 20H). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos a partir dos experimentos de espalhamento de luz, nos quais o aumento da absorbância estava relacionado ao aumento no tamanho de partículas das amostras tratadas termicamente.

**Figura 20 – Visualização por *negative stain* da influência da hHep1 sobre os CSMs estudados.** A) Micrografia para a HSPA9 B) Micrografia para o CSM da HSPA9. C) Micrografia para o CSM da HSPA9 após incubação com hHep1 por 1 h. O perfil da amostra muda drasticamente, exibindo partículas menores quando comparado à Figura A. D) Micrografia para a HSPA1A. E) Micrografia para o CSM da HSPA1A, menos polidisperso do que o CSM da HSPA9. F) Micrografia para o CSM da HSPA1A após incubação com hHep1 por 1 h, indicando que também ocorreu redução no tamanho das partículas. G) Análise estatística da área de CSM de HSPA9 em comparação ao CSM da HSPA9 na presença de hHep1 e os controles: HSPA9 com hHep1, HSPA9 e hHep1, respectivamente. H) Análise estatística de CSM de HSPA1A em comparação com o mesmo na presença de hHep1 e os controles: HSPA1A com hHep1, HSPA1A e hHep1, respectivamente. Os histogramas representam a área da partícula (nm<sup>2</sup>) relacionada com a contagem de partículas presentes nas micrografias. I) e J) Gráfico das distribuições da área e o desvio padrão de cada amostra para os CSMs de HSPA9 e HSPA1A, respectivamente.



FONTE: Autoria própria.

A adição de hHep1 ao CSM pré-formado da HSPA9 resultou na redução significativa do tamanho das partículas, com diminuição da polidispersividade (Figura 20C), apresentando maioria com tamanho aproximado de 90 nm<sup>2</sup>, com valor máximo de 2.500 nm<sup>2</sup> (Figura 20G). O diagrama de caixa, (Figura 20I) resume as estatísticas referentes ao tamanho das partículas, que corroboram a mudança de comportamento entre as amostras percebida visualmente. Ao comparar o CSM da HSPA9 antes e depois da adição da hHep1, observa-se uma redução no desvio padrão e na média da área ocupada pelas mesmas, indicando que a hHep1 remodelou os complexos em partículas menores. Além disso, todas as amostras controle revelaram a presença de partículas pequenas (Figura 20G e I).

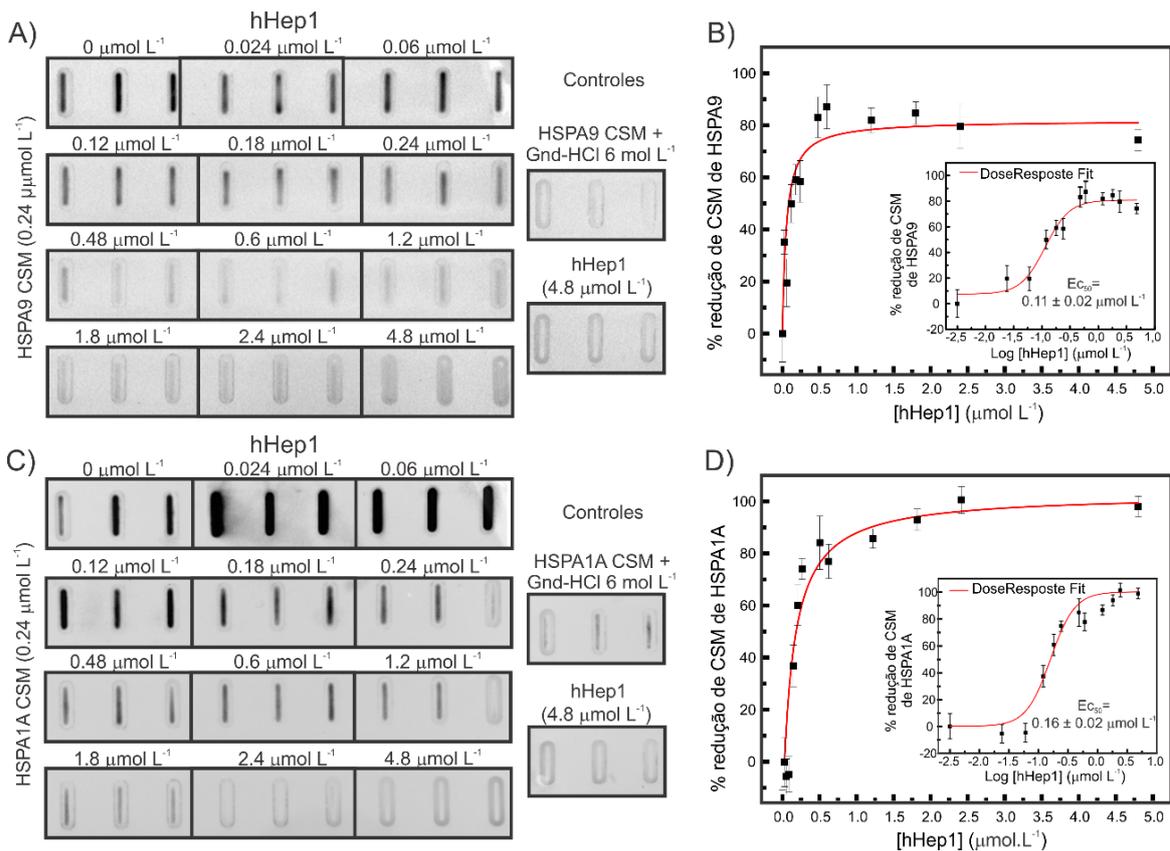
A hHep1 também foi capaz de reduzir o tamanho e a distribuição do CSM da HSPA1A, que passou a apresentar maioria de partículas com tamanho de cerca de 100 a 2000 nm<sup>2</sup> (Figura 20F e J). Apesar desta diminuição expressiva de tamanho, o efeito da co-chaperona sobre o CSM da HSPA1A foi diferente daquele apresentado para o CSM da HSPA9, já que se observou maior quantidade de partículas de aproximadamente 2000 nm<sup>2</sup>. A maior eficiência em reduzir o tamanho superficial dos complexos da HSPA9 também ficou evidente ao se comparar o gráfico de dispersão das proteínas monoméricas na presença da hHep1 e aquele do CSM com a adição da co-chaperona. É possível notar que a quantidade de partículas de tamanho superior à 1300 nm<sup>2</sup> para o CSM da HSPA1A com adição de hHep1 foi significativamente maior do que aquela apresentada para a HSPA1A na mesma condição (Figura 20H). De maneira geral, esse efeito mais pronunciado da co-chaperona sobre a HSPA9 se mantém de maneira coerente com o observado nos experimentos anteriores.

#### ***4.1.9 Ensaios de filtração em membrana (dot blot) confirmam que a hHep1 foi capaz de remodelar os CSMs das proteínas HSPA9 e HSPA1A em partículas menores***

Com o intuito de validar os resultados obtidos a partir dos experimentos de TEM, foram realizados ensaios de filtração em membrana com poro de diâmetro 0,2 µm, de modo que partículas maiores que o tamanho do poro ficassem retidas na mesma. Os ensaios mostraram que a hHep1 foi capaz de atuar sobre os CSMs de HSPA9 e HSPA1A, transformando-os em partículas menores de maneira dose-dependente (Figura 21A e C, respectivamente). Como controles, além da hHep1 sozinha, os CSMs foram incubados com o agente caotrópico cloridrato de guanidina (6 mol.L<sup>-1</sup>) que desnatura-os resultando na redução da retenção da proteína na membrana (Figura 21A e C, controles).

Para estimar o  $EC_{50}$ , uma curva do logaritmo da concentração de hHep1 *versus* a porcentagem de redução de retenção de CSM das Hsp70 na membrana foi preparada. Para o CSM de HSPA9, o  $EC_{50}$  foi de  $110 \pm 20 \text{ nmol.L}^{-1}$ , enquanto para o CSM da HSPA1A, o  $EC_{50}$  foi de  $160 \pm 20 \text{ nmol.L}^{-1}$  (Figura 21B e D, inserto). Estes dados indicam uma especificidade ligeiramente superior da hHep1 pelo CSM da HSPA9, o que está de acordo com o observado pela  $K_{Dapp}$  obtida por ITC (Figura 17).

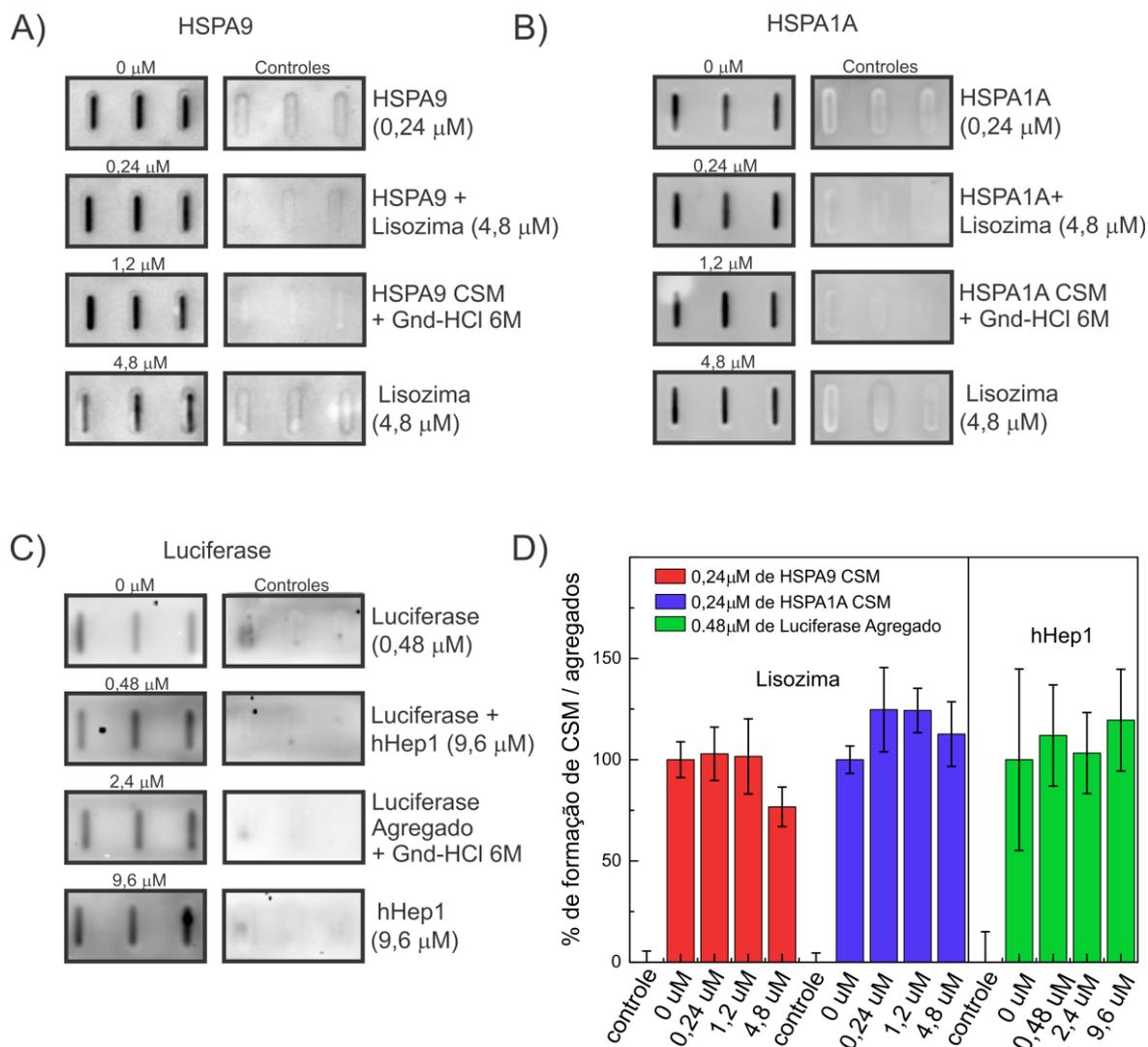
**Figura 21 - hHep1 reduz o tamanho dos CSMs de HSPA9 e HSPA1A de maneira dependente da concentração.** A) Ensaio de filtração para CSM de HSPA9 na presença de diferentes concentrações de hHep1. As imagens também mostram os controles usados no experimento. Percebe-se a redução na quantidade de proteína retida na membrana com incrementos na concentração da co-chaperona. C) Mesmo ensaio para o CSM de HSPA1A. Como controles foram utilizados os CSMs na presença de cloridrato de guanidina ( $6 \text{ mol.L}^{-1}$ ), e a hHep1 na máxima concentração utilizada. A mesma redução na quantidade de proteína retida na membrana com relação ao aumento da concentração de hHep1 é observada. B) e D) Gráficos que representam a porcentagem de depuração de CSM retidos na membrana, com base nas intensidades de *pixel* relativas, em função da concentração de hHep1. Insertos: porcentagem de depuração de CSM em função da concentração de hHep1 em escala logarítmica, o que permite calcular o  $EC_{50}$ .



FONTE: Autoria própria.

Experimentos controle adicionais foram realizados. Para tanto, a lisozima foi utilizada substituindo a hHep1, e pôde-se observar que a mesma não foi capaz de reduzir o tamanho dos CSMs das Hsp70 estudadas (Figura 22A e B). Por outro lado, a Figura 22C indica que a hHep1 não remodelou o agregado térmico da Myc-luciferase, uma proteína cliente modelo usada para avaliar a atividade chaperona intrínseca da hHep1.

**Figura 22 – Experimentos de filtração controle adicionais.** A) Ensaio de filtração de CSM da HSPA9 na presença de diferentes concentrações de lisozima, indicando que a mesma não promove redução na retenção de proteína na membrana. B) CSM de HSPA1A na presença de diferentes concentrações de lisozima, sem redução na retenção de proteínas. C) Agregado de Luciferase-Myc na presença de diferentes concentrações de hHep1. Não foi possível observar ação da hHep1 sobre os agregados, indicando que a co-chaperona apresenta alguma especificidade sobre as Hsp70 estudadas. As imagens também mostram os controles usados no experimento. D) Gráfico que representa a porcentagem de CSM retidos na membrana, com base nas intensidades relativas de *pixels*, em função da concentração de lisozima ou hHep1. Como controles foram utilizados os CSMs na presença de cloridrato de guanidina ( $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), as proteínas monoméricas na presença e ausência de Lisozima ou hHep1 bem como a Lisozima ou hHep1. Os CSMs sem a adição de outras proteínas ( $0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foram considerados como 100% de retenção, para cada experimento. De maneira geral esses controles validam o efeito de depuração dos CSMs das Hsp70 estudadas pela hHep1.



FONTE: Autoria própria.

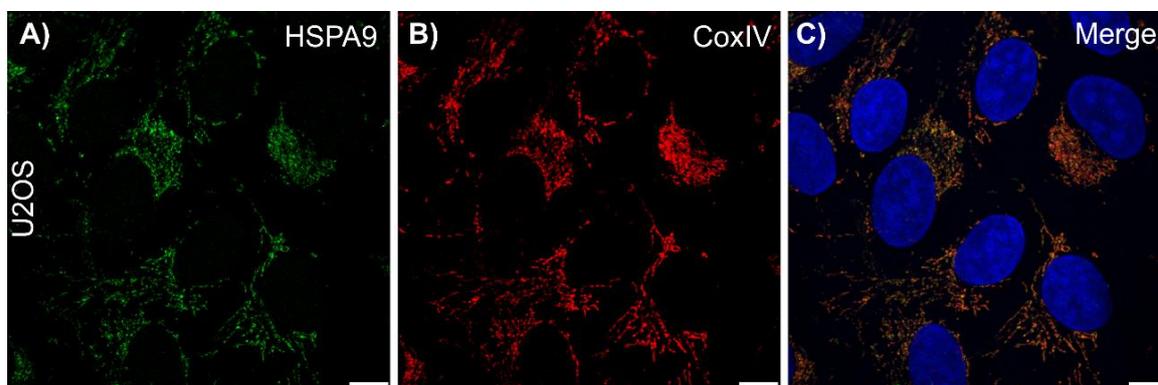
A Figura 22D resume os dados obtidos desses experimentos, indicando a porcentagem de proteínas retidas na membrana em função de diferentes concentrações de hHep1 ou lisozima e percebeu-se que não houve redução significativa nesses valores. Portanto, esses experimentos controles indicaram que a atividade da co-chaperona hHep1 no remodelamento dos CSMs da HSPA9 e HSPA1A é específica.

## 4.2 Estudos preliminares a partir de ensaios celulares

### 4.2.1 Experimentos de imunofluorescência com células transfectadas e não-transfectadas detectou a presença mitocondrial e nuclear da co-chaperona hHep1 e confirmou a localização da HSPA9 na mitocôndria

Os experimentos de imunofluorescência permitem visualizar antígenos de interesse a partir da sua marcação com anticorpos específicos, fornecendo informações com relação a localização. Imagens representativas obtidas a partir de células U2OS transfectadas com pcDNA3.1::HSPA9, contendo a tag-FLAG, e marcadas com anti-HSPA9 confirmaram a localização dessa Hsp70 na mitocôndria. Como é possível observar na Figura 23A, a HSPA9 total (endógena e transfectada) em verde apresentou co-localização com a CoxIV, em vermelho, utilizada para marcar a mitocôndria. Essa co-localização resultou na coloração alaranjada presente na Figura 23C, em torno dos núcleos corados com DAPI, em azul.

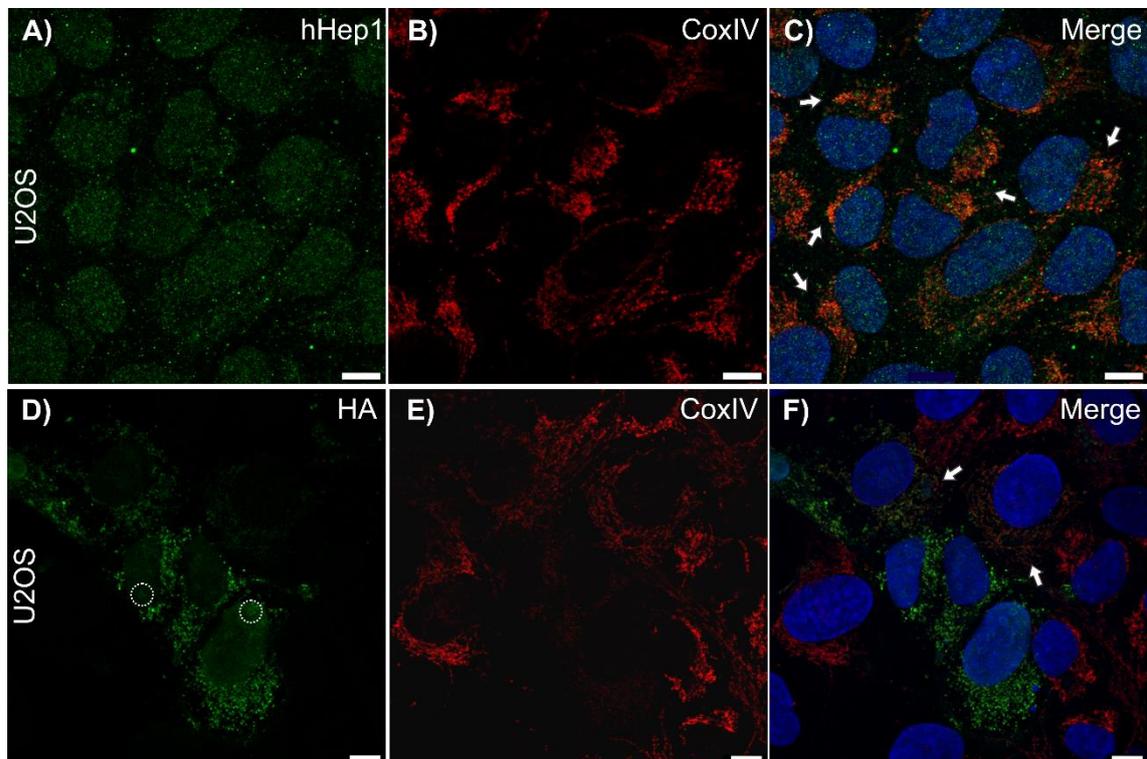
**Figura 23 - Localização da chaperona HSPA9 endógena e transfectada em células U2OS.** A) Células transfectadas com pcDNA3.1::HSPA9-FLAG, marcadas com anti-HSPA9 (em verde), revelando HSPA9 total. B) Marcação de mitocôndria com anti-CoxIV (em vermelho). C) Sobreposição das imagens, indicando co-localização da HSPA9 com as mitocôndrias (cor alaranjada), como esperado. Os núcleos são corados com DAPI (em azul). As imagens representativas das células foram obtidas usando magnificação de 63x com barra de escala de 10  $\mu$ m.



FONTE: Autoria própria.

Embora os dados na literatura referentes à hHep1 sejam escassos, alguns trabalhos mostraram que mesma se encontra nas mitocôndrias (ZHAI; STANWORTH; LIU; SILBERG, 2008), e infere-se que também possa ser encontrada no núcleo e citoplasma (DORES-SILVA; KIRALY; MORITZ; SERRÃO *et al.*, 2021). Portanto, células U2OS não transfectadas e transfectadas com pcDNA3.1::hHep1 (contendo a tag-HA) foram analisadas, com o intuito de determinar a localização dessa co-chaperona. A Figura 24A revela uma marcação dispersa para a hHep1 endógena, sem transfecção, marcada com anti-hHep1. As imagens representativas apontam a co-localização da co-chaperona com a CoxIV (em vermelho), indicada na pelas setas brancas, o que confirmou sua presença mitocondrial. Além disso, as imagens sugerem que a mesma também estava presente no núcleo.

**Figura 24 – Localização da co-chaperona hHep1 endógena e transfectada em células U2OS.** A) Células não transfectadas marcadas com anti-hHep1 (verde), marcando hHep1 endógena. B) Células não transfectadas marcadas com anti-CoxIV (vermelho). C) Sobreposição das imagens das células não transfectadas com núcleos corados com DAPI (azul) e setas brancas indicando a co-localização da hHep1 com a mitocôndria. D) Células transfectadas com pcDNA3.1::hHep1-HÁ, marcadas com anti-HA (verde), selecionando apenas as proteínas transfectadas. E) Células transfectadas marcadas com anti-CoxIV (vermelho). F) Sobreposição das imagens das células transfectadas com núcleos corados com DAPI (azul) e setas brancas indicando a co-localização da hHep1 transfectada com a mitocôndria. As imagens representativas das células foram obtidas usando magnificação de 63x com barra de escala de 10 µm.

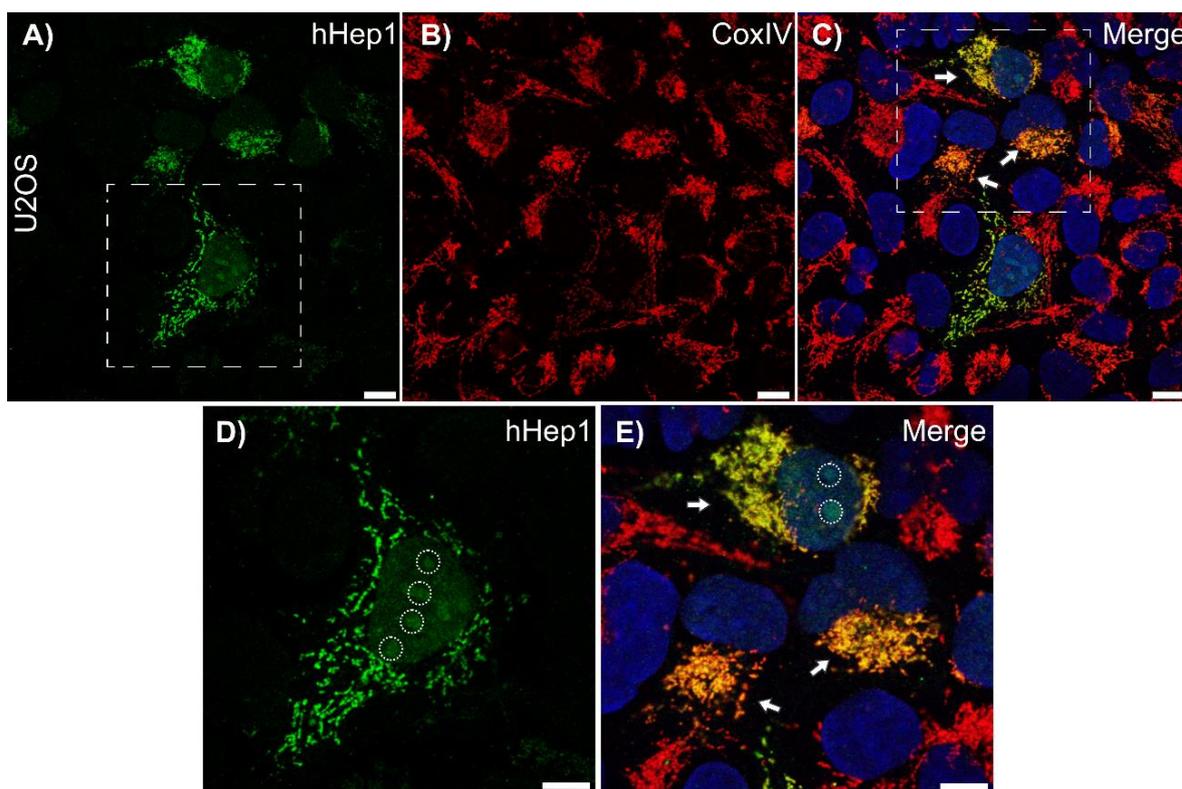


FONTE: Autoria própria.

Investigou-se também o comportamento da hHep1-HA em células U2OS transfectadas com pcDNA3.1, marcadas com anti-HA (Figura 24D), a qual se mostrou

presente no núcleo e nas mitocôndrias, assim como a hHep1 endógena. Ao comparar as Figura 24A e D, foi possível perceber que a transfecção resultou no aumento de sinal da co-chaperona na região mitocondrial, cuja co-localização é indicada por setas brancas na Figura 24F, além do surgimento de alguns acúmulos no núcleo, ressaltados por círculos brancos (Figura 24D), o que sugere a localização da hHep1 em estruturas subnucleares. Esse comportamento em que a co-chaperona encontra-se na mitocôndria e no núcleo, organizando-se em estruturas subnucleares, também ficou evidente nas imagens das células transfectadas e tratadas com anti-hHep1, marcando hHep1 total, endógenas e transfectadas (Figura 25).

**Figura 25 - Localização da co-chaperona hHep1 total (endógena e transfectada) em células U2OS.** A) Células U2OS transfectadas com pcDNA3.1::hHep1-HA marcadas com anti-hHep1 (verde), indicando a presença de hHep1 total no núcleo e nas mitocôndrias. B) Células marcadas com anti-CoxIV (vermelho). C) Sobreposição das imagens A e B com co-localização da hHep1 na mitocôndria indicada por setas brancas. Os núcleos são corados com DAPI (azul). D) e E) Zoom da área descontínua marcada em A) e C), respectivamente, na qual os círculos brancos indicam a localização da hHep1 em estruturas subnucleares. As imagens representativas das células foram obtidas usando magnificação de 63x com barra de escala de 10  $\mu$ m.

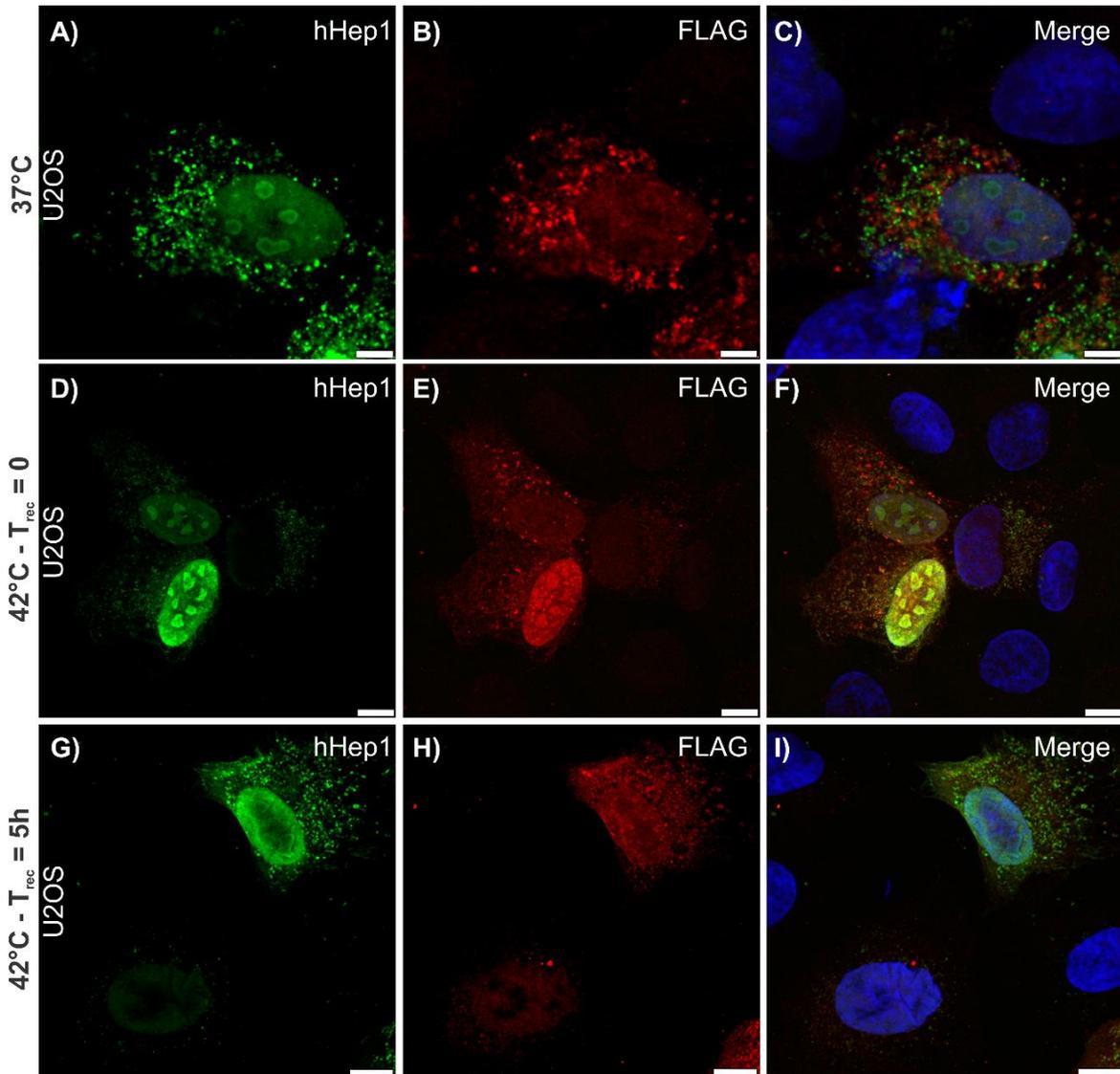


FONTE: Autoria própria.

Por fim, o comportamento das hHep1 (transfectadas e endógenas) e HSPA9 transfectadas durante estresse térmico (42 °C) e com tempos diferentes de recuperação à 37 °C foi avaliado. Os resultados obtidos desses experimentos são representados na Figura 26,

a partir da qual é possível perceber que o estresse promoveu mudanças no comportamento de ambas as proteínas. As Figura 26A, B e C representam o comportamento das proteínas à 37 °C, em que ambas foram localizadas na mitocôndria havendo a presença de hHep1 em acúmulos subnucleares, como descrito anteriormente.

**Figura 26 – Avaliação do comportamento das proteínas hHep1 total e HSPA9 transfectadas em células U2OS durante choque térmico, com e sem tempo de recuperação.** A) Células transfectadas com pcDNA3.1::HSPA9-FLAG, e com pcDNA3.1::hHep1-HÁ, marcando hHep1 total com anti-hHep1 (em verde). B) Células transfectadas marcando HSPA9 transfectada com anti-FLAG (em vermelho). Essas células foram utilizadas como controle, e não foram expostas à 42 °C. C) Sobreposição das imagens A e B, representando a co-localização de hHep1 e HSPA9 na mitocôndria. Essas células foram utilizadas como controle, e não foram expostas à 42 °C. D) Células transfectadas marcadas com anti-hHep1 (em verde). E) Células transfectadas marcadas com anti-FLAG (em vermelho). F) Sobreposição das imagens D e E. Essas células foram expostas à 42 °C, sem tempo de recuperação à 37 °C. G) Células transfectadas marcadas com anti-hHep1 (em verde). H) Células transfectadas marcadas com anti-FLAG (em vermelho). I) Sobreposição das imagens G e H. Essas células foram expostas à 42 °C, com tempo de recuperação à 37 °C de 5 h. As imagens representativas das células foram obtidas usando magnificação de 63x com barra de escala de 5 µm (A-C) e 10 µm (D-I).



FONTE: Autoria própria.

Quando expostas à temperatura de 42 °C por 1 h sem tempo de recuperação, ou seja, fixadas logo após o tempo de incubação nesta temperatura, foi possível observar uma diminuição de sinal de hHep1 na mitocôndria em comparação com seu comportamento à 37 °C (Figura 26A), além do aumento de acúmulos da mesma no núcleo (Figura 26D). Já a HSPA9 apresentou um aumento relativo de sinal distribuído em torno da região externa ao núcleo, referente à mitocôndria, podendo estar distribuída no citoplasma. Assim como a hHep1, observou-se sua presença em pequenos acúmulos nucleares (Figura 26E).

A partir das imagens das células fixadas após 5 h de recuperação à 37 °C, foi constatado um aumento de sinal da hHep1 total na região referente à mitocôndria, quando comparado à imagem das células sem tempo de recuperação. Também foi possível observar o desaparecimento dos acúmulos nucleares presentes anteriormente, alterando sua distribuição para a região perinuclear da célula (Figura 26G). Comportamento similar foi apresentado pela HSPA9 transfectada, que apresentou marcação mais pronunciada na região referente às mitocôndrias e desaparecimento dos acúmulos nucleares, com sinal distribuído de maneira uniforme pela região nuclear (Figura 26H).

A localização da hHep1 em outros compartimentos celulares além das mitocôndrias, como citoplasma e núcleo, levanta conjecturas quanto a possibilidade de que essa co-chaperona poderia interagir com outras Hsp70 citoplasmáticas, como HSPA1A ou a HSPA8 (DORES-SILVA; CAUVI; COTO; SILVA *et al.*, 2021), além da HSPA5 (BiP) presente no RE, que pode sofrer *splicing* alternativo e perder o sinal de encaminhamento para o retículo endoplasmático, tornando-se uma isoforma citosólica (NI; ZHOU; WEY; BAUMEISTER *et al.*, 2009).

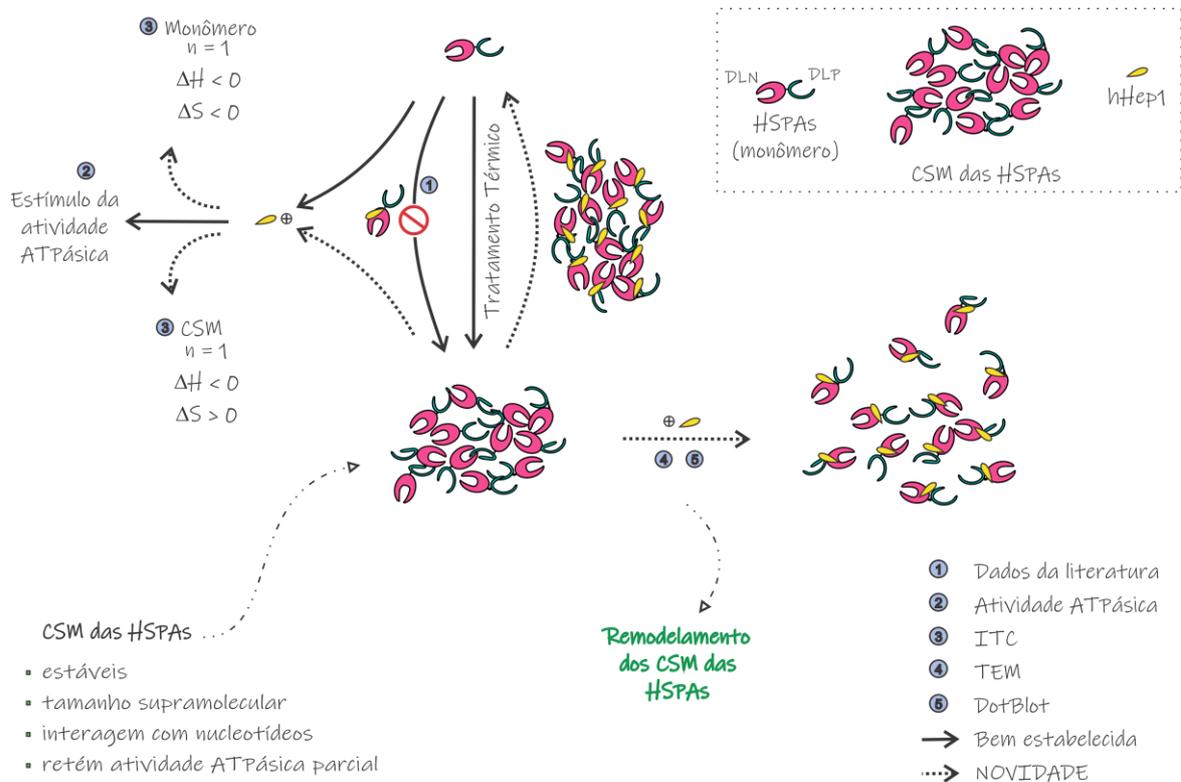
## 5. CONCLUSÕES

Os CSMs de ambas as Hsp70 estudadas apresentaram estrutura secundária e terciária, ainda que com pequenas diferenças quando comparados às proteínas monoméricas, não se comportaram como estruturas  $\beta$ -amilóides e mantiveram funcionalidade, ainda que parcial, o que pôde ser observado através dos experimentos de atividade ATPásica. Apesar de apresentarem 76% de similaridade entre si e de serem preparados da mesma maneira, os mesmos se comportaram de maneira distinta, sugerindo que podem assumir diferentes funções nas células. Sugere-se que o processo de formação do CSM surja como estratégia para autoproteção e até mesmo proteção de proteínas cliente durante eventos de estresse celular, evitando processos de agregação irreversíveis, dano à célula e apoptose. Após investigar as características biofísicas dos CSM, foi avaliada a influência da co-chaperona hHep1 sobre os mesmos.

A Figura 27 exhibe o modelo proposto a partir dos resultados obtidos deste trabalho. A hHep1, sabidamente importante para a manutenção das Hsp70 em seu estado funcional, foi capaz de interagir com as proteínas HSPA9, HSPA1A e seus CSMs, além de estimular a atividade ATPásica dos mesmos, sugerindo que sítios de interação dos CSMs com a co-chaperona se mantêm, de alguma forma, disponível. Imagens de TEM e os resultados de *dot blot* quantitativo revelaram que a co-chaperona promoveu o remodelamento dos CSMs estudados, reduzindo seu tamanho e polidispersividade. Esses resultados indicam que a hHep1 pode atuar modulando o processo de formação do CSM dessas Hsp70 nos compartimentos celulares, exibindo importância fisiológica na manutenção da homeostase.

Considerando que os membros da família de Hsp70 se encontram em diversos compartimentos celulares e que existe a predição da presença de hHep1 no citoplasma, nucleoplasma e mitocôndria, buscou-se investigar a localização da co-chaperona e da HSPA9. Estudos de imunofluorescência confirmaram a localização celular da HSPA9 e demonstraram a presença mitocondrial e nuclear da hHep1, com flutuações na intensidade de sinal dependentes da realização de transfecção. Células transfectadas apresentaram acúmulos da co-chaperona em estruturas subnucleares, que devem ser mais bem investigadas. A exposição das células à estresse térmico promoveu mudanças no comportamento de ambas as proteínas, ocasionando aumento relativo de acúmulos subnucleares que dispersam após experimentarem um tempo de recuperação.

**Figura 27 - Esquema representativo da atuação da co-chaperona hHep1 sobre os CSM das HSPA9 e HSPA1A propostas neste trabalho.** A partir do tratamento térmico pôde-se observar que as Hsp70 estudadas formam os CSMs e dados da literatura relatam que a adição de hHep1 às mesmas evita essa formação (1). Ainda, os CSMs se mostraram estáveis, interagiram com nucleotídeos e retiveram atividade ATPásica. A hHep1 foi capaz de interagir com as proteínas em sua forma monomérica e CSM (3), estimulou suas atividades ATPásica (2) e também remodelou os CSMs em partículas menores (4 e 5).



FONTE: Adaptado de Dores-Silva et al., 2021.

Vários resultados apresentados aqui indicaram que a hHep1 é uma co-chaperona cognata para HSPA9, bem como HSPA1A, podendo ser uma co-chaperona das Hsp70 em geral e não apenas específica para HSPA9. Ademais, seu envolvimento no processo de remodelação dos CSMs sugere que a mesma é capaz de modular sua formação e atividade, durante e após eventos de estresse. Assim, este processo poderia ocorrer *in vivo* com a participação de outros fatores celulares, evitando a apoptose ou pelo menos adiando-a, oferecendo ao organismo uma oportunidade de se recuperar após o estresse, o que surge como uma estratégia adaptativa. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender como se formam os CSMs dessas Hsp70, bem como a sua interação com a hHep1 dentro da célula.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

- (i) hHep1 estimulou a atividade ATPásica das proteínas HSPA1A e HSPA9;
- (ii) CSMs das proteínas HSPA1A e HSPA9 detiveram estrutura secundária e terciária, e apresentaram atividade ATPásica;
- (iii) hHep1 interagiu com ambos os CSMs, estimulou sua atividade ATPásica e reduziu o tamanho e a polidispersividade dos mesmos;
- (iv) HSPA9 foi visualizada majoritariamente na mitocôndria. Houve marcação nuclear após estresse térmico, com surgimento de acúmulos em estruturas subnucleares que desapareceram após tempo de recuperação de 5 h;
- (v) hHep1 foi visualizada na mitocôndria e em estruturas subnucleares. Após estresse térmico houve aumento de acúmulos em estruturas subnucleares. Após tempo de recuperação de 5 h, a hHep1 apresentou distribuição perinuclear, com desaparecimento dos acúmulos nucleares.

## 7. PUBLICAÇÕES REFERENTES AO DOUTORADO:

**KIRALY, V. T. R.** et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behaves supramolecular assemblies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 320–331, 2020.

DORES-SILVA, P. R., **KIRALY, V. T. R.**, MORITZ, M. N. O., SERRÃO, V.H.B., New insights on human Hsp70-escort protein 1: Chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 182, p. 772-784, 2021.

## 8. PUBLICAÇÕES ADICIONAIS

MINARI K., AZEVEDO E. C., **KIRALY V. T. R.**, BASTISTA F. A. H., MORAES F. R., MELO F. A., NASCIMENTO A. S., GAVA L. M., RAMOS C. H. I., BORGES J. C. Thermodynamic analysis of interactions of the Hsp90 with adenosine nucleotides: A comparative perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 125–138, 2019.

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

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

CAMPANELLA, J.E.M., JUNIOR, S. L. R., **KIRALY V. T. R.**, GOMES, A. A. S., BARROS, A. C., MATEOS, P. A., FREITAS, F. Z., FONTES, M. R. M., BORGES J. C., BERTOLINI, M. C.. Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa*. **Biochimie**. v. 191, p. 11-26, 2021.

CARDOSO, V.M.O., **KIRALY V. T. R.**, BONI, F. I., FERREIRA, N. N., PEREIRA, F. M. V., BORGES J. C., CURY, B. S. F., GREMIÃO, M. P. D. Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic cross-linking processes: a potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 66, 2021.

## 9. REFERÊNCIAS

ABYADEH, M.; GUPTA, V.; CHITRANSHI, N.; GUPTA, V.; WU, Y.; DANIT SAKS, D.; WALL, R.W.; FITZHENRY, M. J.; BASAVARAJAPPA, D.; YOU, Y.; SALEKDEH, G. H.; HAYNES, P. A.; GRAHAM, S. L.; MIRZAEI, M. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease - a proteomics perspective. **Expert Rev. Proteomics**, Abingdon, v. 18, n. 4, p. 295-304, 2021.

ALAM, P.; SIDDIQI, M. K.; MALIK, S.; CHATURVEDI, S. K.; UDDIN, M.; KHAN, R. H. Elucidating the inhibitory potential of vitamin A against fibrillation and amyloid associated cytotoxicity. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 129, p. 333-338, 2019.

ALLAN, R. K.; RATAJCZAK, T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 353-367, 2011.

ANDO, K.; OKI, E.; ZHAO, Y.; IKAWA-YOSHIDA, A.; KITAO, H.; SAEKI, H.; KIMURA, Y. IDA, S.; MORITA, M.; KUSUMOTO, T.; MAEHARA, Y. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. **Gastric Cancer**, New York, v. 17, n. 2, p. 255-262, 2014.

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. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 259, n. 1-2, p. 505-512, 1999.

ARAUJO, T. L.; BORGES, J. C.; RAMOS, C. H.; MEYER-FERNANDES, J. R.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; PASCUTTI, P. G.; FOGUEL, D.; PALHANO, F. L. Conformational changes in human Hsp70 induced by high hydrostatic pressure produce oligomers with ATPase activity but without chaperone activity. **Biochemistry**, Washington, v. 53, n. 18, p. 2884-2889, 2014.

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

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

BEISSINGER, M.; BUCHNER, J. How chaperones fold proteins. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 379, n. 3, p. 245-259, 1998.

BENAROUDJ, N.; BATELIER, G.; TRINIOLES, F.; LADJIMI, M. M. Self-association of the molecular chaperone Hsc70. **Biochem.**, Washington, v. 34, n. 46, p. 15282-15290, 1995.

BHATWA, A.; WANG, W.; HASSAN, Y. I.; ABRAHAM, N.; LI, X. Z.; ZHOU, T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address the for industrial applications. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, Lausanne, v. 9, p. 630551, 2021.

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

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 452, n. 1, p. 46-54, 2006.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. **BMB Rep.**, Seoul, v. 42, n. 3, p. 166-171, 2009.

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

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 351-366, 1998.

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

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

CABRERA, M.; BORONAT, S.; MARTE, L.; VEGA, M.; PÉREZ, P.; AYTÉ, J. HIDALGO, E. Chaperone-facilitated aggregation of thermo-sensitive proteins shields them from degradation during heat stress. **Cell Rep.**, Cambridge, v. 30, n. 7, p. 2430-2443.e2434, 2020.

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

CHEN, B.; RETZLAFF, M.; ROOS, T.; FRYDMAN, J. Cellular strategies of protein quality control. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, Cold Spring Harbor, v. 3, n. 8, p. a004374, 2011.

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

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

DANIELSEN, H. N.; HANSEN, S. H.; HERBST, F. A.; KJELDAL, H.; STENSBALLE, A.; NIELSEN, P. H.; DUEHOL, M. S. Direct identification of functional amyloid proteins by label-free quantitative mass spectrometry. **Biomolecules**, Base, v. 7, n. 3, 2017.

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

DEOCARIS, C. C.; LU, W. J.; KAUL, S. C.; WADHWA, R. Druggability of mortalin for cancer and neuro-degenerative disorders. **Curr. Pharm. Design**, Sharjah, v. 19, n. 3, p. 418-429, 2013.

DEOCARIS, C. C.; WIDODO, N.; ISHII, T.; KAUL, S.; WADHWA, R. Functional significance of minor structural and expression changes in stress chaperone mortalin. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Hoboken, v. 1119, p. 165-175, 2007.

DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. **Nature**, London, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 2003.

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

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

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

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

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

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

DUBREZ, L.; CAUSSE, S.; BORGES BONAN, N.; DUMÉTIER, B.; GARRIDO, C. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. **Oncogene**, London, v. 39, n. 3, p. 516-529, 2020.

ELLIS, R. J.; HARTL, F. U. Principles of protein folding in the cellular environment. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 9, n. 1, p. 102-110, 1999.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R.; VALPUESTA, J. M. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. **F1000Res.**, London, v. 7, p. 1-10, 2018.

FURKAN, M.; SIDDIQI, M. K.; ZAKARIYA, S. M.; KHAN, F. I.; HASSAN, M. I.; KHAN, R. H. An in vitro elucidation of the antiaggregatory potential of diosminover thermally induced unfolding of hen egg white lysozyme; a preventive quest for lysozyme amyloidosis. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 129, p. 1015-1023, 2019.

GONÇALVES, C. C.; PINHEIRO, G. M. S.; DAHLSTRÖM, K. M.; SOUTO, D. E. P.; KUBOTA, L. T.; BARBOSA, L. R. S.; RAMOS, C. H. I. On the structure and function of sorghum bicolor CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein): a link between chaperone and proteasome systems. **Plant Sci.**, East Park Shannon, v. 296, p. 110506, 2020.

GULIYEVA, A. J.; GASIMOV, O. K. ANS fluorescence: potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. **Biochem. Biophys. Rep.**, Amsterdam, v. 24, p. 100843, 2020.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, London, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

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

HELDIN, C. H.; JOHNSON, A.; WENNERGREN, S.; WERNSTEDT, C.; BETSHOLTZ, C.; WESTERMARK, B. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. **Nature**, London, v. 319, n. 6053, p. 511-514, 1986.

HUNT, C.; MORIMOTO, R. I. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 82, n. 19, p. 6455-6459, 1985.

HWANG, J. H.; RYU, J. K.; YOON, Y. B.; LEE, K. H.; PARK, Y. S.; KI, J. W.; KIM, N.; LEE, D. H.; JEONG, J. B.; SEO, J. S.; KIM, Y. T. Spontaneous activation of pancreas trypsinogen in heat shock protein 70.1 knock-out mice. **Pancreas**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 332-336, 2005.

JEE, H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. **J. Exerc. Rehabil.**, Seoul, v. 12, n. 4, p. 255-259, 2016.

JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **J. Mol. Recognit.**, Hoboken, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.

JIN, J.; HULETTE, C.; WANG, Y.; ZHANG, T.; PAN, C.; WADHWA, R.; ZHANG, J. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to parkinson disease. **Mol. Cell. Proteomics**, Rockville, v. 5, n. 7, p. 1193-1204, 2006.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 531, n. 1-2, p. 100-109, 2013.

JUHASZ, K.; LIPP, A. M.; NIMMERVOLL, B.; SONNLEITNER, A.; HESSE, J.; HASELGRUEBLER, T.; BALOGI, Z. The complex function of hsp70 in metastatic cancer. **Cancers**, Basel, v. 6, n. 1, p. 42-66, 2013.

KAMPINGA, H. H.; ANDREASSON, C.; BARDUCCI A.; CHEETHAM, M.E.; CYR, D.; EMANUELSSON, C.; GENEVAUX, P.; GESTWICKI, J. E.; GOLOUBINOFF, P.; HUERTA-CEPAS, J.; KIRSTEIN, J.; LIBEREK, K.; MAYER, M.P.; NAGATA, K.; NILLEGODA, N.B.; PULIDO, P.; RAMOS, C.; DE LOS RIOS, P.; ROSPERT, S.; ROSENZWEIG, R.; SAHI, C.; TAIPALE, M.; TOMICZEK, B.; USHIODA, R.; YOUNG, J. C.; ZIMMERMANN, R.; ZYLICZ, A.; ZYLICZ, M.; CRAIG, E. A.; MARSZALEK, J. Function, evolution, and structure of J-domain proteins. **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 7-15, 01 2019.

KANG, B. H.; PLESCIA, J.; DOHI, T.; ROSA, J.; DOXSEY, S. J.; ALTIERI, D. C. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. **Cell**, Cambridge, v. 131, n. 2, p. 257-270, 2007.

KANN, O.; KOVÁCS, R. Mitochondria and neuronal activity. **Am. J. Physiol.-Cell Physiol.**, Bethesda, v. 292, n. 2, p. C641-657, 2007.

KARLIN, S.; BROCCIERI, L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. **J. Mol. Evol.**, New York, v. 47, n. 5, p. 565-577, 1998.

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

KIM, T. K.; NA, H. J.; LEE, W. R.; JEOUNG, M. H.; LEE, S. Heat shock protein 70-1A is a novel angiogenic regulator. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 469, n. 2, p. 222-228, 2016.

KING, C.; EISENBERG, E.; GREENE, L. Polymerization of 70-kDa heat shock protein by yeast DnaJ in ATP. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 270, n. 38, p. 22535-22540, 1995.

KITYK, R.; KOPP, J.; SINNING, I.; MAYER, M. P. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 48, n. 6, p. 863-874, 2012.

KLAUS, C.; KAEMMERER, E.; REINARTZ, A.; SCHNEIDER, U.; PLU, P.; JEON, M. K.; HOSE, J.; HARTMANN, F.; SCHNOLZER, M.; WAGNER, N.; KOPITZ, J.; GASSLER, N. TP53 status regulates ACSL5-induced expression of mitochondrial mortalin in enterocytes and colorectal adenocarcinomas. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 357, n. 1, p. 267-278, 2014.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 92, n. 5, p. 2177-2186, 2002.

KUMAGAI, P. S.; MARTINS, C. S.; SALES, E. M.; ROSA, H. V. D.; MENDONÇA, D. C.; DAMALIO, J. C.; SPINOZZI, F.; ITRI, R.; ARAUJO, AP. P. U. Correct partner makes the difference: septin G-interface plays a critical role in amyloid formation. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 133, p. 428-435, 2019.

LAFONT, V.; ARMSTRONG, A. A.; OHTAKA, H.; KISO, Y.; AMZEL L. M.; FREIRE, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chem. Biol. Drug Des.**, Hoboken, v. 69, n. 6, p. 413-422, 2007.

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

LEE, S. H.; KIM, M.; YOON, B. W.; KIM, Y. J.; MA, S. J.; ROH, J. K.; LEE, J. S.; SEO, J. S. Targeted hsp70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, Philadelphia, v. 32, n. 12, p. 2905-2912, 2001.

LI, D.; LIU, C. Structural diversity of amyloid fibrils and advances in their structure determination. **Biochemistry**, Washington, v. 59, n. 5, p. 639-646, 2020.

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

LU, W. J.; LEE, N. P.; KAUL, S. C.; LAN, F.; POON, R. T. P.; WADHWA, R.; LUK, J. M. Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. **Int. J. Cancer**, Hoboken, v. 129, n. 8, p. 1806-1814, 2011a.

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

LUO, W. I.; DIZIN, E.; YOON, T.; COWAN, J. A. Kinetic and structural characterization of human mortalin. **Protein Expr. Purif.**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 75-81, 2010.

MAJID, N.; SIDDIQI, M. K.; KHAN, A. N.; SHABNAM, S.; MALIK, S.; ALAM, A.; UVERSKY, V. N.; KHAN, R. H. Biophysical elucidation of amyloid fibrillation inhibition and prevention of secondary nucleation by cholic acid: an unexplored function of cholic acid. **ACS Chem. Neurosci.**, Washington, v. 10, n. 11, p. 4704-4715, 2019.

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

- MINARI, K.; DE AZEVEDO, É. C.; KIRALY, V. T. R.; BATISTA, F. A. H.; DE MORAES, F. R.; DE MELO, F. A.; NASCIMENTO, A. S.; GAVA, L. M.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. Thermodynamic analysis of interactions of the Hsp90 with adenosine nucleotides: a comparative perspective. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 130, p. 125-138, 2019.
- MOMOSE, T.; OHSHIMA, C.; MAEDA, M.; ENDO, T. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. **EMBO Rep.**, Hoboken, v. 8, n. 7, p. 664-670, 2007.
- MONTGOMERY, D. L.; MORIMOTO, R. I.; GIERASCH, L. M. Mutations in the substrate binding domain of the Escherichia coli 70 kDa molecular chaperone, DnaK, which alter substrate affinity or interdomain coupling. **J. Mol. Biol.**, London, v. 286, n. 3, p. 915-932, 1999.
- MOSENG, M. A.; NIX, J. C.; PAGE, R. C. Biophysical consequences of EVEN-PLUS syndrome mutations for the function of mortalin. **J. Phys. Chem. B**, Washington, v. 123, n. 16, p. 3383-3396, 2019.
- MOSSER, D. D.; CARON, A. W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 17, n. 9, p. 5317-5327, 1997.
- MURPHY, M. E. The HSP70 family and cancer. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 1181-1188, 2013.
- NA, Y.; KAUL, S. C.; RYU, J.; LEE, J. S.; AHN, H. M.; KAUL, Z.; KALRA, R. S.; LI, L.; WIDODO, N.; YUN, C. O.; WADHWA, R. Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 76, n. 9, p. 2754-2765, 2016.
- NI, M.; ZHOU, H.; WEY, S.; BAUMEISTER, P.; LEE, A. S. Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e6868, 2009.
- NOLLEN, E. A.; SALOMONS, F. A.; BRUNSTING, J. F.; VAN DER WANT, J. J.; SIBON, O. C.; KAMPINGA, H. H. Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, n. 21, p. 12038-12043, Oct 2001.
- NYAKUNDI, D. O.; BENTLEY, S. J.; BOSHOFF, A. Hsp70 escort protein: more than a regulator of mitochondrial Hsp70. **Curr. Proteomics**, Sharjah, v. 16, p. 64-73, 2019.
- NYAKUNDI, D. O.; VUKO, L. A.; BENTLEY, S. J.; HOPPE, H.; BLATCH, G. L.; BOSHOFF, A. Plasmodium falciparum Hep1 is required to prevent the self aggregation of PfHsp70-3. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0156446, 2016.

- PALLEROS, D. R.; WELCH, W. J.; FINK, A. L. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 88, n. 13, p. 5719-5723, 1991.
- PARK, S. J.; SHIN, J. H.; JEONG, J. I.; SONG, J. H.; JO, Y. K.; KIM, E. S.; LEE, E. H.; HWANG, J. J.; LEE, E. K.; CHUNG, S. J.; KOH, J. Y.; JO, D. G.; CHO, D. H. Down-regulation of mortalin exacerbates A $\beta$ -mediated mitochondrial fragmentation and dysfunction. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 289, n. 4, p. 2195-2204, 2014.
- PEREZ-RIBA, A.; ITZHAKI, L. S. The tetratricopeptide-repeat motif is a versatile platform that enables diverse modes of molecular recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, London, v. 54, p. 43-49, 02 2019.
- PHAM, M. Q.; TRAN, T. H. V.; PHAM, Q. L.; GAIRIN, J. E. In silico analysis of the binding properties of solasonine to mortalin and p53, and in vitro pharmacological studies of its apoptotic and cytotoxic effects on human HepG2 and Hep3b hepatocellular carcinoma cells. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Paris, v. 33, p. 385-396, 2019.
- RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016.
- RAN, Q.; WADHWA, R.; KAWAI, R.; KAUL, S. C.; SIFERS, R. N.; BICK, R. J.; SMITH, J. R.; PEREIRA-SMITH, O. M. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 275, n. 1, p. 174-179, 2000.
- REBEAUD, M. E.; MALLIK, S.; GOLOUBINOFF, P.; TAWFIK, D. S. On the evolution of chaperones and cochaperones and the expansion of proteomes across the tree of life. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 118, n. 21, p. e2020885118, 2021.
- ROSENZWEIG, R.; NILLEGODA, N. B.; MAYER, M. P.; BUKAU, B. The Hsp70 chaperone network. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.
- RUDDON, R. W.; BEDOWS, E. Assisted protein folding. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 272, n. 6, p. 3125-3128, 1997.
- SAAD, S.; CEREGHETTI, G.; FENG, Y.; PICOTTI, P.; PETER, M.; DECHAT, R. Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress. **Nat. Cell Biol.**, London, v. 19, n. 10, p. 1202-1213, 2017.
- SANCHEZ DE GROOT, N.; TORRENT, M.; VILLAR-PIQUÉ, A.; LANG, B.; VENTURA, S.; GSPONER, J.; BABU, M. M. Evolutionary selection for protein aggregation. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 40, n. 5, p. 1032-1037, 2012.
- SARI, A. N.; ELWAKEEL, A.; DHANJAL, J. K.; KUMAR, V.; SUNDAR, D.; KAUL, S. C.; WADHWA, R. Identification and characterization of mortaparib<sup>Plus</sup>—a novel triazole derivative that targets mortalin-p53 interaction and inhibits cancer-cell proliferation by wild-type p53-dependent and -independent mechanisms. **Cancers**, Basel, v. 13, n. 4, p. 835, 2021.

SHRIVASTAVA, S. Protein folding. In: MISRA, G. (ed.). **Introduction to biomolecular structure and biophysics: basics of biophysics**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 33-56.

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

SREEDHAR, A. S.; CSERMELY, P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 227-257, 2004.

STEEL, R.; CROSS, R. S.; ELLIS, S. L.; ANDERSON, R. L. Hsp70 architecture: the formation of novel polymeric structures of Hsp70.1 and Hsc70 after proteotoxic stress. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e52351, 2012.

SULATSKY, M. I.; SULATSKAYA, A. I.; POVAROVA, O. I.; ANTIFEEVA, I. A.; KUZNETSOVA, I. M.; TUROVEROV, K. K. Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. **Prion**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2020.

THOMPSON, A. D.; BERNARD, S. M.; SKINIOTIS, G.; GESTWICKI, J. E. Visualization and functional analysis of the oligomeric states of Escherichia coli heat shock protein 70 (Hsp70/DnaK). **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 313-327, 2012.

VERMA, A.; SUMI, S.; SEERVI, M. Heat shock proteins-driven stress granule dynamics: yet another avenue for cell survival. **Apoptosis**, Dordrecht, v. 26, n. 7-8, p. 371-384, 2021.

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

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

WALLACE, E. W.; KEAR-SCOTT, J. L.; PILIPENKO, E. V.; SCHWARTZ, M. H.; LASKOWSKI, P. R.; ROJEK, A. E.; KATANSKI, C. D.; RIBACK, J. A.; DION, M. F.; FRANKS, A. M.; AIROLDI, E. M.; PAN, T.; BUDNIK, B.A.; DRUMMOND, D. A. Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress. **Cell**, Cambridge, v. 162, n. 6, p. 1286-1298, 2015.

WALTER, S.; BUCHNER, J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v. 41, n. 7, p. 1098-1113, 2002.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci.**, London, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.

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

WHITLEY, D.; GOLDBERG, S. P.; JORDAN, W. D. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. **J. Vasc. Surg.**, New York, v. 29, n. 4, p. 748-751, 1999.

WIDODO, N.; DEOCARIS, C. C.; KAUR, K.; HASAN, K.; YAGUCHI, T.; YAMASAKI, K.; SUGIHARA, T.; ISHII, T.; WADHWA, R.; KAUL, S. Stress chaperones, mortalin, and pex19p mediate 5-aza-2' deoxycytidine-induced senescence of cancer cells by DNA methylation-independent pathway. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.**, Washington, v. 62, n. 3, p. 246-255, 2007.

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

ZHANG, S.; WANG, B.; XIAO, H.; DONG, J.; LI, Y.; ZHU, C.; JIN, Y.; LI, H. CUI, M.; FAN, S. LncRNA HOTAIR enhances breast cancer radioresistance through facilitating HSPA1A expression via sequestering miR-449b-5p. **Thorac. Cancer**, v. 11, n. 7, p. 1801-1816, 2020.

ZHOU, H. X.; PANG, X. Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. **Chem. Rev.**, Washington, v. 118, n. 4, p. 1691-1741, 2018.