

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA JÚLIA MATTOS GOMES

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS
MUTANTES TRUNCADOS DA *HSP70-ESCORT PROTEIN 1* HUMANA**

SÃO CARLOS

2024

MARIA JÚLIA MATTOS GOMES

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS
MUTANTES TRUNCADOS DA *HSP70-ESCORT PROTEIN 1* HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges (IQSC/USP)

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (DGE/UFSCar)

SÃO CARLOS

2024

MARIA JÚLIA MATTOS GOMES

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS
MUTANTES TRUNCADOS DA *HSP70-ESCORT PROTEIN 1* HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Membros Efetivos:

Dra. Milene Nóbrega de Oliveira Moritz

Dra. Silvia Helena Libardi

Local: Sala 10 do Departamento de Genética e
Evolução da Universidade Federal de São
Carlos (DGE/UFSCar)

Data: 16 de fevereiro de 2024

Horário: 15h às 18h

SÃO CARLOS

2024

Dedico à memória da minha mãe, Maria do Carmo, por ter sido a luz nos momentos desafiadores, apoio, incentivo e amor incondicional durante nossa jornada

“C’est une folie de haïr toutes les roses parce que une épine vous a piqué, d’abandonner tous les rêves parce que l’un d’entre eux ne s’est pas réalisé, de renoncer à toutes les tentatives parce qu’on a échoué... Il y aura toujours une autre occasion, un autre ami, un autre amour, une force nouvelle. Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ.”

(Le Petit Prince, Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão à Deus por cada oportunidade, desafio, aprendizado e por ser guia nessa caminhada acadêmica.

À minha querida mãe, por ser minha fonte inesgotável de apoio. Sua dedicação incansável e crença inabalável no meu potencial foram minha maior motivação para cada conquista alcançada neste TCC, um reflexo do seu impacto positivo em minha vida acadêmica e pessoal.

Aos meus irmãos, Pedro Paulo e Gabriela, pelo constante apoio e fé no meu potencial. À minha tia e meus primos, Maria Teresa, Lara e o Lucas, por abrirem um vasto horizonte de oportunidades.

À Universidade Federal de São Carlos, pela excelência acadêmica, pelos dedicados professores que me transformaram em uma estudante crítica e ávida por conhecimento.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química de São Carlos e ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, expresso minha gratidão por possibilitarem a execução do projeto com todo o suporte necessário.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Borges, por dedicar seu tempo e expertise para me guiar em cada etapa desse processo.

Às minhas colegas de laboratório, Dra. Milene Moritz e Dra. Noeli Melo, cruciais para meu desenvolvimento como pesquisadora. Agradeço pelas lições, apoio, paciência e pela amizade cultivada ao longo desses anos. Aos demais membros do LBBP, pelos aprendizados e as discussões científicas.

Aos meus amigos, Vinicius Cauan, Marco Túlio Freitas, Ana Clara Bernado, Conny Wara Fukuyama, Samara Banhos, Jaiane Santana e Felipe Ribaldo, por serem fonte de inspiração, dedicação, amizade e alegria. Agradeço o suporte, afeto e recordações que permanecerão eternas.

Agradeço à Daniela Mara e Leandro Marques pela amizade, acolhimento, suporte e incentivo nessa caminhada.

Ao apoio da agência de fomento para realização do presente trabalho: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2021/04799-0.

RESUMO

A *Heat shock protein* de 70 kDa (Hsp70 ou HSPA em humanos) representa uma família de chaperonas moleculares altamente conservada, expressa em diversos compartimentos celulares, e associada a diversas patologias, como doenças neurodegenerativas e câncer. Entre as HSPAs, destaca-se a HSPA mitocondrial (HSPA9 ou mortalina), que desempenha um papel crucial na importação de proteínas sintetizadas no citosol para a mitocôndria. Essa função requer a interação com uma co-chaperona específica, denominada *Hsp70-escort protein* 1 humana (hHep1), cuja estrutura em forma de L contendo um domínio "dedo de zinco" é fundamental para tal interação. A hHep1 desempenha papéis significativos na manutenção da solubilidade da HSPA9 e HSPA1A (Hsp701A humana), remodelação de seus complexos supramoleculares e estímulo à atividade ATPásica dessas HSPAs. Além de sua localização mitocondrial, a hHep1 também é encontrada no núcleo celular, onde pode interagir com outras HSPAs, como a HSPA1A em situação de estresse. Diante da relevância da hHep1 para a estabilidade das HSPAs, este estudo propõe a expressão, purificação e caracterização estrutural de mutantes da hHep1, nos quais as regiões N- e C-terminais foram truncadas, visando identificar as principais regiões responsáveis por sua função. O mutante hHep1-Core, contendo o domínio "dedo de zinco", também foi caracterizado, visando elucidar seus papéis estruturais e funcionais. Foram conduzidos experimentos para análise da estrutura secundária e terciária por meio de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, respectivamente. Os resultados indicaram semelhanças estruturais entre hHep1-Ndel e hHep1 Δ mts, assim como entre hHep1-Cdel e hHep1-Core. Além disso, foi demonstrada a estabilidade temporal das proteínas por até 72 horas a 4°C, bem como sua estabilidade química frente ao agente desnaturante GndHCl, revelando valores de C_m de 1,4 M, 1,9 M e 1,5 M para hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core, respectivamente. As propriedades hidrodinâmicas dos mutantes foram determinadas por meio de cromatografia de exclusão por tamanho analítica, evidenciando que todas as proteínas são monoméricas, com destaque para a estrutura mais globular observada em hHep1-Core em comparação com a estrutura completa. Conclui-se que os protocolos e condições testadas são as ideais para a expressão, purificação e caracterização dessas proteínas recombinantes, o que proporciona um avanço científico nessa área de estudo.

Palavras-chaves: Chaperonas moleculares; Hsp70; Proteínas recombinantes; Caracterização biofísica.

ABSTRACT

The 70 kDa Heat shock protein (Hsp70 or HSPA in humans) is a highly conserved family of molecular chaperones that is expressed in various cellular compartments and is associated with several pathologies, including neurodegenerative diseases and cancer. Among HSPAs, the mitochondrial HSPA (HSPA9 or mortalin) plays a crucial role in the import of proteins synthesized in the cytosol into the mitochondria. This function requires interaction with a specific co-chaperone called human Hsp70-escort protein 1 (hHep1), whose L-shaped structure, containing a "zinc finger" domain, is fundamental for such interactions. hHep1 holds great importance in the maintenance of HSPA9 and HSPA1A (human Hsp701A) solubility, as well as the remodeling and stimulation of their ATPase activity. It is present in both the mitochondria and the cell nucleus, where it interacts with HSPAs such as HSPA1A. Due to its role in HSPA homeostasis, this study aimed to express, purify, and characterize hHep1 mutants with truncated N- and C-terminal regions to identify the primary regions responsible for its function. The hHep1-Core mutant, containing the "zinc finger" domain, was also studied to elucidate its structural and functional roles. The secondary and tertiary structures of the hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, and hHep1-Core mutants were investigated using circular dichroism and fluorescence spectroscopy, respectively. The results revealed similarities in structure between the hHep1-Ndel and hHep1 Δ mts mutants, as well as between the hHep1-Cdel and hHep1-Core mutants. Moreover, the stability of the proteins was demonstrated for up to 72 hours, and their resistance to denaturing agents was demonstrated, with C_m values of 1.4 M, 1.9 M, and 1.5 M for hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, and hHep1-Core, respectively. The size and shape of the mutants were also analyzed using analytical size exclusion chromatography, revealing that all proteins were monomeric, and that hHep1-Core had a more globular structure compared to the complete structure. The study concluded that the methods and conditions used were suitable for the expression, purification, and characterization of these recombinant proteins, providing a valuable contribution to the field of research.

Keywords: Molecular chaperone; Hsp70; Recombinant proteins; Biophysical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural da Hsp70.	14
Figura 2. Ciclo das Hsp70 com a proteína-cliente.	15
Figura 3. Representação esquemática da atividade proposta da hHep1 sobre conjuntos supramoleculares de HSPAs.....	17
Figura 4. Diagrama esquematizando as regiões da hHep1 mantidas nos mutantes truncados hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.	20
Figura 5. Protocolo detalhado para expressão e purificação da proteína hHep1 Δ mts e dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Core e hHep1-Cdel.....	26
Figura 6. Análise das condições de indução à expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE.....	30
Figura 7. Etapas do processo de purificação realizados na primeira condição para as proteínas hHep1 Δ mts. (A), hHep1-Ndel (B) e hHep1-Cdel (C).....	31
Figura 8. Primeira e segunda cromatografia de afinidade do mutante hHep1-Cdel.	33
Figura 9. Cromatografia de exclusão por tamanho preparativa e o padrão por SDS-PAGE do mutante hHep1-Cdel.....	35
Figura 10. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade (A) e a exclusão por tamanho preparativa (B) na ausência de fosfato e pH ideal.	37
Figura 11. Perfil eletroforético do mutante hHep1-Cdel obtido durante as etapas de purificação.	37
Figura 12. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade da proteína hHep1 Δ mts	38
Figura 13. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade do mutante hHep1-Ndel.	39
Figura 14. Alinhamento das sequências da hHep1 completa, hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core, realizado pelo software The UniProt Consortium: the Universal Protein Knowledgebase in 2023.	40
Figura 15. (A) Alinhamento das estruturas hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core obtidas pelo software AlphaFold e realizado no Chimera. (B) Estrutura da hHep1 Δ mts indicando as estruturas secundárias. Estrutura hélice α indicada pela seta em vermelho.	41
Figura 16. Alinhamento das estruturas hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core com a hHep1 Δ mts obtidas pelo software AlphaFold e realizado no Chimera.....	42

Figura 17. Caracterização estrutural das proteínas recombinantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1 Δ mts por espectropolarimetria de CD na janela de 260 a 195 nm.	43
Figura 18. Cromatograma de aSEC, com ênfase no intervalo de eluição dos mutantes truncados.....	44
Figura 19. Avaliação da integridade estrutural dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1 Δ mts em função do tempo.	46
Figura 20. Avaliação da estabilidade química da hHep1-Ndel frente ao agente desnaturante GndHCl.....	47
Figura 21. Avaliação da estabilidade química dos mutantes hHep1-Core e hHep1-Cdel frente ao agente desnaturante GndHCl.	48
Figura 22. Curva do ajuste por Boltzmann das variações nos $\langle\lambda\rangle$ em função da concentração de GndHCl para os mutantes hHep1-Cdel, hHep1-Core e hHep1-Ndel sobrepostos.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos mutantes hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core sem a cauda de histidina.....	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos mutantes hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1_Core com a cauda de histidina.	24
Tabela 3. Valores de pH dos tampões utilizados para a purificação da proteína hHep1 Δ mts e dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Core e hHep1-Cdel.	25
Tabela 4. Proteínas globulares padrão.	28
Tabela 5. Comparativo entre a Deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD para os mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1 Δ mts.	43
Tabela 6. Comparativo entre os dados hidrodinâmicos dos mutantes hHep1, hHep1-Core e hHep1-Cdel.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Aminoácidos e proteínas	12
1.2. Chaperonas moleculares	12
1.3. Hsp70	13
1.4. Hsp70 escort protein 1	15
1.5. Caracterização estrutural e aplicações	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos Específicos	22
2.1.1. Obtenção dos mutantes	22
2.1.2. Caracterização estrutural dos mutantes	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Obtenção e purificação	23
3.1.1. Transformação das células competentes contendo pET28a:construção	23
3.1.2. Indução à expressão	23
3.1.3. Processo de purificação	24
3.1.4. SDS-PAGE	26
3.2. Análise estrutural	26
3.2.1. Análise estrutural pelo AlphaFold	26
3.2.2. Espectropolarimetria de dicroísmo circular.....	27
3.2.3. Espectroscopia de Emissão por Fluorescência	27
3.2.4. Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC).....	27
3.3. Análise da estabilidade	28
3.3.1. Estabilidade temporal	28
3.3.2. Estabilidade química.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Obtenção dos mutantes	30
4.1.1. Indução à expressão	30
4.1.2. Processo de purificação	30
4.2. Análise estrutural	40
4.2.1. Análise estrutural pelo AlphaFold	40
4.2.2. Dicroísmo circular e Espectroscopia de emissão por fluorescência.....	42
4.2.3. Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC).....	43
4.3. Análise da estabilidade	45
4.3.1. Estabilidade temporal	45
4.3.2. Estabilidade química.....	46
5. CONCLUSÃO	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aminoácidos e proteínas

Os aminoácidos são os blocos de construção das proteínas. São compostos orgânicos constituídos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, majoritariamente. As proteínas são grandes biomoléculas compostas de aminoácidos conectados por ligações peptídicas. Essas, desempenham um papel crucial em vários processos biológicos, incluindo suporte estrutural, reações enzimáticas, vias de sinalização e transporte de moléculas. Além disso, desempenham um papel vital no sistema imunológico, adesão celular e na contração muscular. A estrutura e função das proteínas são determinadas pela sequência de aminoácidos presentes na cadeia proteica (BYWATER *et al.*, 2018).

1.2. Chaperonas moleculares

Um conjunto de proteínas denominadas chaperonas moleculares ou proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*, Hsp) atuam na manutenção das proteínas, contribuindo para a homeostase celular. Elas são compostas por diferentes famílias de proteínas, as quais são classificadas de acordo com sua massa molecular (HSPH ou Hsp110, HSPC ou Hsp90, HSPA ou Hsp70, HSPD ou Hsp60, DNAJ ou Hsp40 e HSPB ou pequenas Hsps), em que apresentam diferenças entre suas estruturas primárias ou seus mecanismos de ação (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011; BORGES; RAMOS, 2006; KAMPINGA *et al.*, 2008).

Essas chaperonas desempenham um papel crucial na manutenção da conformação adequada das proteínas em ambientes celulares variáveis, desempenhando um papel fundamental no controle de qualidade das proteínas. A exposição das células a condições de estresse, como temperatura, estresse oxidativo e alterações osmóticas, pode resultar em proteínas malformadas, que podem se tornar proteotóxicas. Essas proteínas malformadas frequentemente expõem sítios hidrofóbicos em suas estruturas, levando à agregação molecular (LIBEREK; LEWANDOWSKA; ZIĘTKIEWICZ, 2008).

As chaperonas moleculares desempenham sua função por meio da capacidade de prevenir a formação desses agregados moleculares, utilizando ciclos de ligação e liberação da proteína cliente, regulados por proteínas auxiliares, comumente referidas como co-chaperonas. Esses ciclos de ligação e liberação mediados pelas chaperonas moleculares ajudam a evitar a exposição de superfícies desdobradas das proteínas-cliente, facilitando seu correto enovelamento. Além disso, as chaperonas moleculares auxiliam no transporte de proteínas

através de membranas celulares e coordenam as interações entre proteínas, além de sinalizar proteínas danificadas para o sistema proteolítico (KIM *et al.*, 2013).

1.3. Hsp70

Uma família vital de chaperonas moleculares é a *Heat shock proteins 70* (Hsp70 ou HSPA em humanos), que exibe uma notável conservação evolutiva e está amplamente distribuída em organismos procariotos e eucariotos, com suas diversas isoformas localizadas em diferentes compartimentos celulares. Essas proteínas desempenham um papel essencial no processo de enovelamento de proteínas, na regulação de atividades enzimáticas e na translocação de proteínas através de membranas celulares. É importante destacar que as Hsp70 desempenham um papel significativo na prevenção da agregação de proteínas induzida por estresse celular e na recuperação de agregados proteicos (KARLIN; BROCCHERI, 1998; KANG *et al.*, 1990). As Hsp70 desempenham papel essencial na manutenção da proteostase celular, na maturação e sinalização de proteínas, bem como na marcação de proteínas para a degradação (BLATCH; EDKINS, 2015; KIRALY *et al.*, 2020).

As Hsp70 são fortemente reguladas e protegem as células em uma variedade de estresses, como choque térmico, inflamações, infecções bacterianas e virais, substâncias tóxicas, estresse oxidativo, hipóxia, entre outros (WITKIN; KANNINEN; SISTI, 2017). Essas chaperonas dispõem de um mecanismo citoprotetor que aumenta a sobrevivência e a longevidade celular e também estão relacionadas à várias patologias humanas (SANTORO, 2000) como câncer e doenças neurodegenerativas, como por exemplo Alzheimer e Parkinson devido ao seu mal funcionamento (CHATTERJEE; BURNS, 2017; ZHEYING SUN *et al.*, 2018). Uma alta expressão das HSPAs é verificado em células tumorais, podendo ser responsável pela progressão tumoral e resistência à quimioterapia (KUMAR *et al.*, 2016). Além disso, a disfunção ou menor taxa de expressão das HSPAs gera um acúmulo de proteínas mal enoveladas no cérebro formando emaranhados neurofibrilares que são característicos da doença de Alzheimer (LACKIE *et al.*, 2017). Neste contexto, a elevada expressão das HSPAs pode favorecer o avanço de tumores e em contrapartida uma baixa expressão pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo portanto um importante alvo de estudo para tais doenças (EVANS; CHANG; GESTWICKI, 2010).

A estrutura das HSPAs (apresentada na Figura 1) é composta por dois principais domínios: o domínio de ligação ao nucleotídeo (DLN) que se encontra na região N-terminal, apresentando aproximadamente 45 kDa e que possui fraca atividade ATPásica; o domínio de

ligação à proteína-cliente (DLP) com ~25 kDa, localizado na região C-terminal, e que está ligado ao DLN via um linker hidrofóbico flexível (MAYER; BUKAU, 2005; SILVA; BORGES, 2011). Algumas das principais proteínas-cliente das HSPAs são: fatores de transcrição, receptores de hormônios corticoides, proteínas quinases e de replicação de DNA, assim como a proteína p53 fortemente relacionada ao desenvolvimento de tumores (BREHMER *et al.*, 2001).

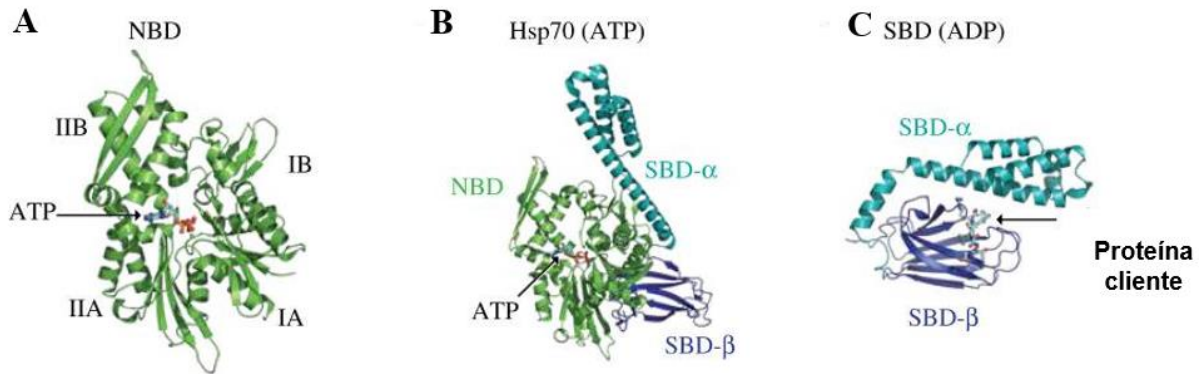


Figura 1. Representação estrutural da Hsp70.

(A) NBD (do inglês *Nucleotide-Binding Domain*) mostrando a organização dos quatro subdomínios IA, IB, IIA, IIB, com ATP ligado ao sítio ativo (PDB 4B9Q). (b) A estrutura completa da Hsp70 ligada ao ATP, ilustrando o arranjo dos dois domínios NBD e SBD um em relação ao outro. (c) A estrutura do SBD (do inglês *Substrate-Binding Domain*) ligada ao peptídeo substrato. A tampa do SBD α fecha sobre o sítio de ligação a proteína-cliente, que está presente no subdomínio SBD β , aprisionando o substrato.

Fonte: adaptado de LARBURU *et al.* (2020).

As Hsp70 atuam por meio de ciclos que dependem da sua interação com co-chaperonas a fim de modular sua atividade ATPásica, ao passo que formam maquinarias moleculares (KAMPINGA; CRAIG, 2010). Dentro desse ciclo, representado na Figura 2, uma proteína importante é a proteína J, a qual é uma co-chaperona que facilita o recrutamento de proteínas-cliente para as Hsp70. A associação da proteína J com a proteína-cliente medeia, em conjunto, a hidrólise de ATP pela Hsp70 e, conseqüentemente, as HSPAs se encontram em um estado fechado caracterizado por alta afinidade pela proteína-cliente. Além da proteína J, os fatores de troca de nucleotídeo (NEF's, do inglês *Nucleotide Exchange Factors*), são co-fatores essenciais para a manutenção destes ciclos, visto que medeiam a troca de ADP para ATP, facilitando a transição para a conformação aberta, em que atuam para promover a redução da afinidade do DLN das Hsp70 por nucleotídeos adenosina (LARBURU *et al.*, 2020).

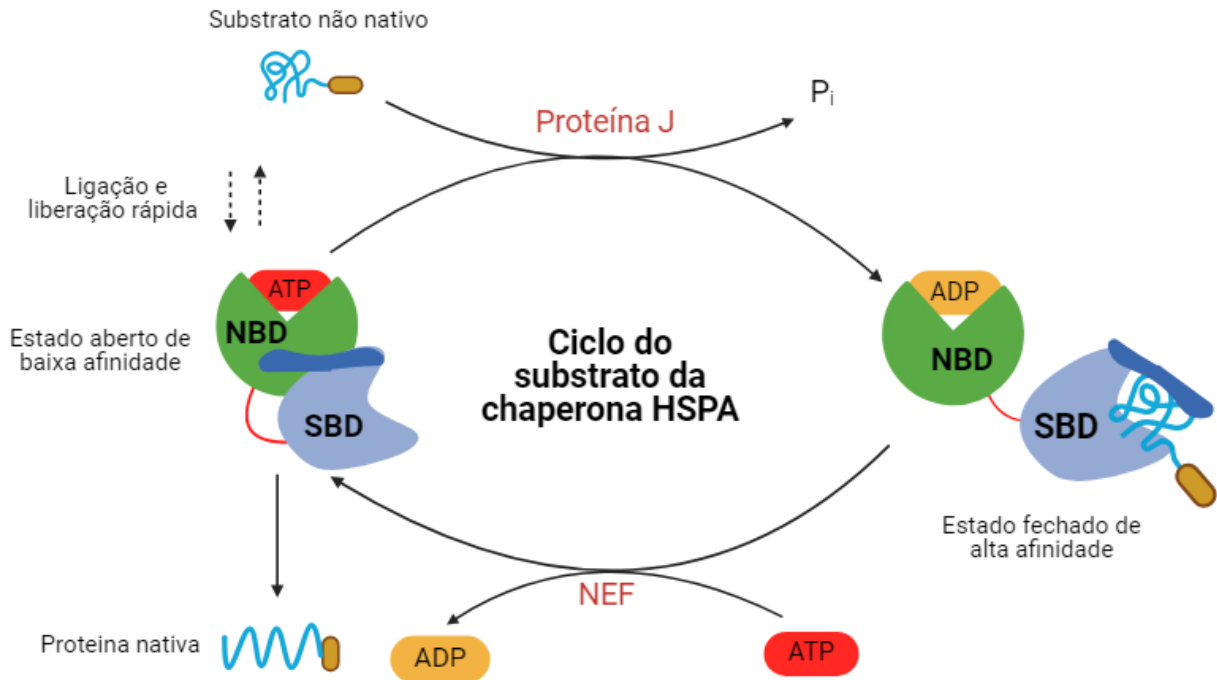


Figura 2. Ciclo das Hsp70 com a proteína-cliente.

Fonte: adaptado de LARBURU et al. (2020). Criado com BioRender.

1.4. *Hsp70 escort protein 1*

A HSPA mitocondrial (HSPA9, mortalina ou GRP75), está diretamente envolvida com a importação de proteínas sintetizadas no citoplasma para matriz mitocondrial e o enovelamento dessas proteínas, sendo, portanto, imprescindível para a biogênese dessa organela (KANG *et al.*, 1990). A HSPA9 é induzida como resposta ao estresse para permitir a sobrevivência celular em condições letais em organismos pluricelulares (LONDONO *et al.*, 2012), sendo que ela é também encontrada no citoplasma e núcleo (DORES-SILVA *et al.*, 2021).

As Hsp70 mitocondriais, incluindo a HSPA9, possuem alta propensão à oligomerização/agregação, levando a alguns defeitos quanto a importação de proteínas para a matriz mitocondrial e subsequente falha na biogênese dependente de TIM23, a principal translocase da membrana interna que transporta essencialmente todas as proteínas da matriz e as proteínas do espaço intermembranas (SZKLARZ *et al.*, 2005). Dessa forma, para se manter em um estado funcional e solúvel, a HSPA9 requer o auxílio de co-chaperonas, formalmente nomeadas como “*Hsp70-escort protein 1*” (Hep1 - Zim17/TIM15/DNLZ), visto que possui dupla função na HSPA9. A primeira consiste na prevenção da sua autoagregação e a segunda em controlar sua atividade ATPásica (SICHTING *et al.*, 2005; GOSWAMI; CHITTOOR; D'SILVA, 2010).

A proteína de choque térmico 70-1A humana (HSP701A) é um membro da família HSPA e é denominada como HSPA1A, HSP70-1, HSP72 ou HSPA1 (KAMPINGA *et al.*, 2008). Essa proteína pode ser encontrada no citoplasma e núcleo (DAUGAARD *et al.*, 2007; RADONS, 2016), sendo uma das responsáveis pela sobrevivência da célula (MURPHY, 2013; RADONS, 2016). A HSPA1A é uma proteína induzível por estresse, então quando em células e tecidos normais o seu padrão de expressão tem níveis baixos, até mesmo indetectáveis. A HSPA1A atua como componente central da rede celular de chaperonas moleculares e catalisadores de enovelamento dentro das células (KIM *et al.*, 2016). Além disso, tende a se oligomerizar ou formar complexos supramoleculares (SMA), assim como a HSPA9 (Kiryaly *et al.*, 2020). Sabe-se que o envolvimento da HSPA1A em doenças neurodegenerativas e câncer tem atraído interesse a fim de compreender o seu funcionamento e abrangência, visto que o tal ainda não é bem estabelecido (KIM *et al.*, 2016).

Nesse contexto, um estudo recente do grupo quanto a interação da Hep1 humana (hHep1) com as HSPAs (HSPA9 e a HSPA1A) demonstrou que essa co-chaperona é eficaz na prevenção da agregação térmica dessas proteínas. Além disso a hHep1 tem a capacidade de estimular a atividade ATPásica dos agregados térmicos das proteínas estudadas, concluindo que o sítio responsável por essa interação não é prejudicado pelo estado agregado (DORES-SILVA *et al.*, 2021). Embora hHep1 estimule a atividade ATPásica das HSPAs, a associação da hHep1 com as HSPAs não é dependente de nucleotídeos, sugerindo que a interação não requer um estado conformacional específico. Surpreendentemente, os resultados obtidos sugeriram que a hHep1 tem a capacidade de remodelar os conjuntos supramoleculares das HSPA9 e HSPA1A em partículas menores (DORES-SILVA *et al.*, 2021).

O esquema apresentado na Figura 3 representa a atuação da hHep1 sobre as HSPAs. Os monômeros das HSPAs são propensos a apresentar à autoagregação após o estresse térmico, sendo a hHep1 capaz de prevenir tal agregação, representado em 1. Além disso, a hHep1 pode se ligar nos monômeros das HSPAs e nos seus SMAs, aumentando a atividade ATPásica das HSPAs, como mostrado em 2. A partir do momento em que os SMAs se formam, a hHep1 foi capaz de desmontá-los em partículas menores, como representado em 4 e 5. (DORES-SILVA *et al.*, 2021).

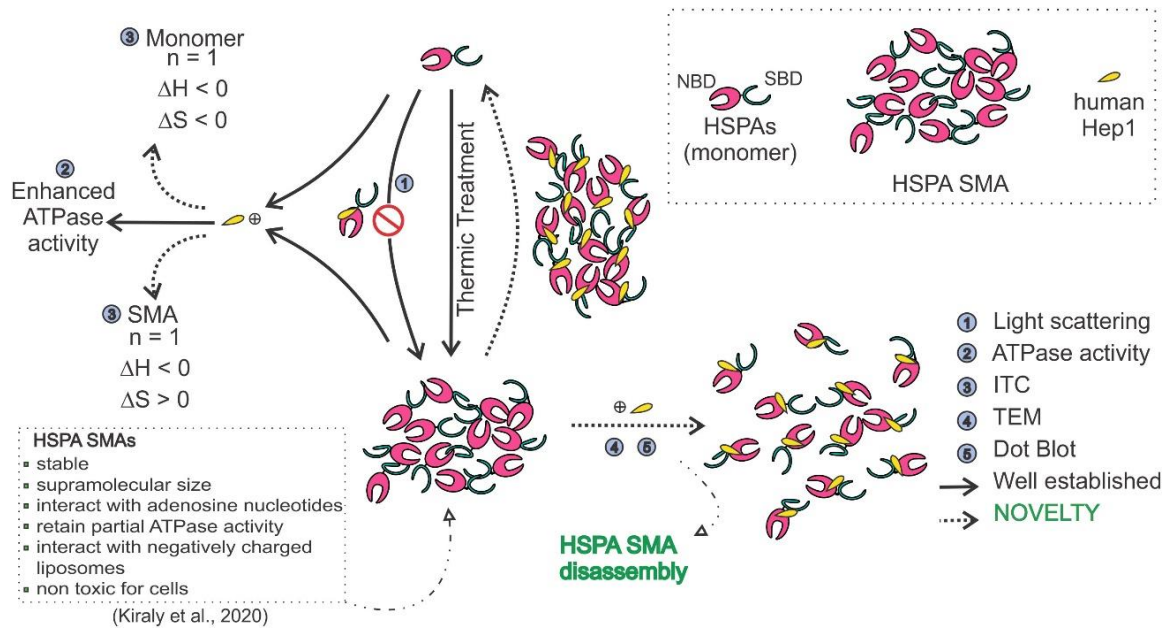


Figura 3. Representação esquemática da atividade proposta da hHep1 sobre conjuntos supramoleculares de HSPAs.

Fonte: retirado de DORES-SILVA *et al.* (2021).

A Hep1 é altamente conservada, presente em praticamente todos os eucariotos e sua estrutura tem forma de L, com um domínio “dedo de zinco”, o qual é essencial para a interação com seus ligantes. Esse domínio é crítico para a sua função *in vivo*, tanto em células eucarióticas de humanos como de leveduras. A estrutura de ressonância magnética nuclear (RMN) da Hep1 em leveduras (yHep1) mostra uma forma de L onde o dedo de zinco está bastante enterrado, formando a região principal, e duas pequenas hélices formando a outra região de função desconhecida (MOMOSE *et al.*, 2007). A yHep1 possui 2 subdomínios: o N-terminal, composto de um par de folhas- β antiparalelas que coordenam o íon Zn^{2+} ; e o C-terminal, composto de α -hélices, folhas- β e *random coils*. A estrutura da solução da yHep1 truncada sugere que o conteúdo de estrutura secundária é de cerca de 23% e 28% de α -hélices e folhas- β , respectivamente (MOMOSE *et al.*, 2007).

A yHep1 se liga especificamente ao DLN da Hsp70 mitocondrial em leveduras (Ssc1) evitando sua autoagregação de forma sub-estequiométrica (SICHTING *et al.*, 2005), no entanto pode ser necessário a ação do inter-domínio (*linker*) da Ssc1 para se ligar adequadamente a yHep1 (BLAMOWSKA *et al.*, 2010). A exclusão ou modificação do DLN leva a perda de ação em evitar a agregação da Ssc1, o que sugere que o domínio contendo o dedo de zinco da yHep1 é essencial para a interação com a Ssc1 e outras chaperonas (SICHTING *et al.*, 2005).

A capacidade de estímulo da hHep1 à atividade ATPásica da HSPA9 têm se mostrado exclusiva desta espécie (DORES-SILVA *et al.*, 2021). Ainda não identificaram essa atividade

para outras Hep1 ortólogas já bem caracterizadas, como a yHep1 (NYAKUNDI *et al.*, 2016). Foi analisado por Dores-Silva *et al.* (2013) a estrutura secundária da hHep1, demonstrando que ela é formada por 10% de α -hélices, 34% de folhas- β e 21% e 35% de voltas e *random coils*, respectivamente. Com base nesses dados, concluiu-se que a hHep1 é formada principalmente por folhas- β , que envolve o domínio dedo de zinco conforme observado para yHep1. Portanto, esses dados indicam que a hHep1 e yHep1 compartilham semelhanças no nível da estrutura secundária, apesar de sua identidade ser apenas de 25% na sequência de aminoácidos (DORES-SILVA *et al.*, 2013).

Alguns estudos quanto a interação entre a hHep1 e a HSPA9 ainda vem sendo desenvolvidos, visto que os mecanismos que envolvem essa interação não estão bem elucidados. A partir da Ssc1, um modelo hipotético em relação a ação da yHep1 no enovelamento das Ssc1 foi proposto, bem como na manutenção de sua solubilidade. Esse modelo propõe que os domínios da Ssc1 se enovelam de forma individual, em que o DLP se enovela sem o auxílio de co-chaperonas, mas, o DLN adquire uma conformação intermediária que é facilmente reconhecida pela yHep1. Esta, por sua vez, promove uma alteração conformacional desta região que propicia a ligação de nucleotídeos ao DLN e, em seguida, se desliga da Ssc1, que então adquire sua conformação nativa. A ausência de nucleotídeos ligados leva a região composta pelo DLN e o *linker* a adquirir uma conformação que é propícia à autoagregação. No entanto, a formação de agregados é evitada por uma nova interação da Ssc1 com a yHep1 (BLAMOWSKA; NEUPERT; HELL, 2012).

Zhai *et al.* (2008) demonstrou que a hHep1 também promove a solubilização da HSPA9 por meio de sua interação com o DLN. O processo de estímulo à hidrólise de ATP envolve um mecanismo cinético bifásico, em que tem início por uma fase rápida, cujo máximo de estímulo que a HSPA9 é capaz de receber seria de 49 vezes, o que é maior do que quando observada com o domínio ATPase sozinho. A segunda fase, por sua vez, é mais lenta, em que a HSPA9 foi deixada cerca de 2 minutos em reação e nesse tempo a hHep1 estimulou a sua atividade ATPásica a uma extensão máxima inferior de 27 vezes (ZHAI *et al.*, 2008). Alguns resíduos da hHep1 que se mostraram importantes na interação com a HSPA9 são: Arg81, His107 e Asp111. O resíduo H107 demonstrou desempenhar um papel crítico na estimulação da atividade ATPásica da HSPA9. Curiosamente, este resíduo de histidina é altamente conservado em todos os ortólogos (ZHAI *et al.*, 2011). Estudos do grupo indicam que a hHep1 tem atividade chaperona intrínseca seletiva, sendo capaz de bloquear a agregação térmica de HSPA humanas, assim como remodelar e desagregar seus agregados térmicos (DORES-SILVA *et al.*, 2021).

As proteínas Hep1 de levedura e humana possuem 174 e 178 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A PfHep1 (*Plasmodium falciparum* Hep1) foi recentemente caracterizada como ortóloga a Hep1 e é composta por 302 resíduos de aminoácidos, com uma extensão contínua de resíduos de asparagina, e é a maior ortóloga alinhada (NYAKUNDI *et al.*, 2016). Há uma falta de identidade de sequência fora do domínio dedo de zinco e as funções das regiões N- e C- terminais não são claras. No entanto, a criação de mutantes de truncamento em LbHep1 (*Leishmania braziliensis* Hep1) indicou que a região a montante do domínio de dedo de zinco contribuiu aumentando a solubilidade de LbmtHsp70, Hsp70 mitocondrial em *Leishmania braziliensis* (DORES-SILVA *et al.*, 2015). O subdomínio C-terminal mostrou desempenhar um papel na solubilidade do domínio de ligação de zinco e pode interagir com o DLP da mtHsp70 (VU *et al.*, 2012). A função desses subdomínios da hHep1 ainda não está bem elucidado, sendo, portanto, o objetivo principal do presente trabalho.

1.5. Caracterização estrutural e aplicações

A caracterização estrutural de proteínas recombinantes é um passo crucial na compreensão de sua função e comportamento. Envolve a determinação da estrutura tridimensional da proteína, o que fornece informações valiosas sobre seu enovelamento, estabilidade e interações com outras moléculas. Esta informação é essencial para várias aplicações, incluindo desenvolvimento de medicamentos, engenharia de proteínas e compreensão de mecanismos de doenças (BAUER; SCHNAPP, 2007). As técnicas de caracterização estrutural comumente usadas para proteínas recombinantes incluem cristalografia de raios X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica. Essas técnicas permitem aos pesquisadores visualizarem o arranjo dos átomos dentro da proteína, identificar regiões e domínios importantes e determinar como a proteína interage com seu ambiente. Adicionalmente, técnicas como dicroísmo circular e espectroscopia de emissão de fluorescência podem ser utilizadas para investigar a estrutura secundária e terciária da proteína, respectivamente (OLIVEIRA; DOMINGUES, 2017; MACHIUS, 2003).

Nos últimos anos, a predição precisa da estrutura tridimensional das proteínas tem sido um dos maiores desafios da bioinformática. A capacidade de prever com precisão a estrutura de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos é fundamental para entender sua função e desempenha um papel crucial no desenvolvimento de novos medicamentos e na engenharia de proteínas. Recentemente, uma equipe de pesquisadores fez um avanço revolucionário nesse campo com a introdução do *AlphaFold*, um sistema de inteligência

artificial que usa redes neurais para prever a estrutura 3D das proteínas usando proteínas depositadas em banco de dados como referência.

No geral, a caracterização estrutural de proteínas recombinantes é um processo multifacetado que combina várias técnicas para obter uma compreensão abrangente da sua estrutura e função. Este conhecimento é essencial para avançar a nossa compreensão dos processos biológicos e desenvolver novas estratégias terapêuticas. Levando em consideração as inúmeras aplicações que essas técnicas abordam, é relevante cientificamente realizar a caracterização estrutural da hHep1.

A organização estrutural da hHep1 completa, como pode ser observado na figura 4, é constituída pelo peptídeo sinal, N-terminal, o Core e o C-terminal, em que a ordem dos resíduos corresponde a hHep1 Δ ₁₋₄₈, hHep1 Δ ₄₉₋₆₃, hHep1 Δ ₆₄₋₁₆₀ e hHep1 Δ ₁₆₁₋₁₇₈, respectivamente. Dentre os resíduos importantes para sua função, a Cys (Cisteína) é um dos principais, por ser responsável pelo complexo com o íon Zn²⁺ no domínio dedo de zinco. Uma espécie recombinante foi previamente estudada pelo nosso grupo, em que o mutante não possui as regiões N- e C- terminais, restando somente a região Core (hHep1-Core).

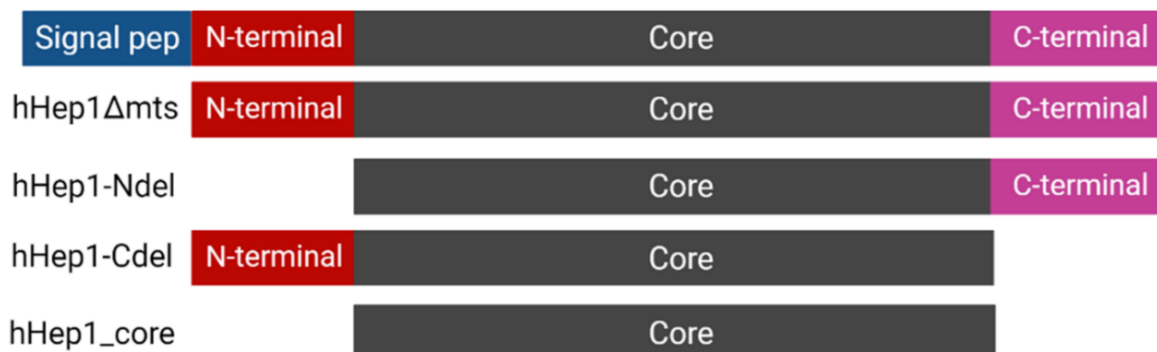


Figura 4. Diagrama esquematizando as regiões da hHep1 mantidas nos mutantes truncados hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.

Os intervalos de resíduos de aminoácidos que compõem o peptídeo sinal (azul), N-terminal (vermelho), Core (cinza) e C-terminal (roxo) são indicados.

Fonte: autoria própria.

Neste contexto, propomos caracterizar a estrutura e estabilidade dos mutantes da hHep1 usando ferramentas biofísicas. Portanto, foi caracterizado os mutantes da hHep1 com N-terminal (hHep1-Ndel) ou C-terminal (hHep1-Cdel) deletados, a fim de determinar a importância dessas regiões em sua estrutura e função. O objetivo dessas modificações em sua estrutura proteica foi avaliar se essas extremidades possuem papel essencial em relação à proteína hHep1 completa. Os resultados foram comparados à hHep1 Δ mts, assim como em relação à hHep1-Core (dados não publicados pelo grupo). Sendo assim, tal caracterização é de

relevância científica, visto que com um maior entendimento de sua estrutura levará a uma melhor elucidação de seu papel na maquinaria bioquímica celular.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi realizar a caracterização estrutural de duas espécies mutantes correspondentes a hHep1 Δ mts com N ou C terminais deletados. Esses resultados foram comparados a hHep1 Δ mts e a hHep1-Core.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Obtenção dos mutantes

- Expressar e purificar as construções recombinantes correspondentes aos dos mutantes hHep1-Ndel e hHep1-Cdel da hHep1 Δ mts.

2.1.2. Caracterização estrutural dos mutantes

- Analisar a estrutura secundária dos mutantes por meio da técnica de CD;
- Analisar a estrutura terciária local dos mutantes por meio da técnica de fluorescência intrínseca do triptofano;
- Analisar a estrutura e propriedade termodinâmicas por meio da cromatografia analítica (aSEC);
- Análise da estabilidade química dos mutantes por meio da técnica de fluorescência intrínseca do triptofano;
- Analisar a estabilidade temporal a 4°C dos mutantes por meio de SDS-PAGE.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção e purificação

3.1.1. Transformação das células competentes contendo pET28a:construção

Para a produção das proteínas recombinantes, foram utilizados três plasmídeos contendo o DNA codificante para as proteínas de interesse (pET28a:hHep1-Ndel, pET28a:hHep1-Cdel, pET28a:hHep1-Core e a pET28a:hHep1 Δ mts), os quais foram adquiridos comercialmente da empresa estadunidense *Epoch LifeSciences*. O plasmídeo pET28a codifica, na extremidade N-terminal da proteína recombinante, uma sequência de 20 aminoácidos contendo um sítio para a enzima trombina e seis histidinas vicinais. Essas histidinas auxiliam no processo de purificação. No entanto, como a hHep1 é uma proteína com poucos resíduos, essa sequência de aminoácidos pode interferir nas análises. Portanto, o vetor utilizado permite a clivagem dessa cauda de histidina por meio da enzima trombina. Como pode ser observado na Tabela 2, algumas propriedades físico-químicas das proteínas com a cauda de histidina sofreram alterações em comparação com as proteínas sem cauda de histidina, confirmando a necessidade de sua remoção para as análises planejadas.

A produção das proteínas recombinantes foi conduzida em cepas bacterianas competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3) competente. Inicialmente, estas células foram transformadas através da incubação com 5 μ L do plasmídeo pET28a:hHep1 Δ mts, pET28a:hHep1-Ndel, pET28a:hHep1-Core e o pET28a:hHep1-Cdel no gelo por 30 min. Em seguida, um choque térmico foi aplicado às células, aquecendo-as a 42 °C por 1,5 min e, imediatamente após, incubando-as novamente no gelo por 3 min. Após o choque térmico, adicionou-se 1 mL de meio de cultura *Lysogeny Broth* (LB), e a mistura foi mantida a 37 °C, sob agitação constante, por 50 min. Em seguida, o *pellet* foi obtido por centrifugação a 5000 rpm por 5 min, ressuspenso em menor volume, e inoculado em uma placa de cultura contendo meio LB, ágar e o antibiótico canamicina a 50 μ g. mL⁻¹. A cultura foi incubada a 37 °C por um período de 16 h.

3.1.2. Indução à expressão

Após o processo de transformação, foram selecionadas colônias isoladas e cultivadas em meio LB contendo canamicina, a 37 °C, sob agitação constante, até que a cultura bacteriana atingisse uma DO_{600nm} no intervalo entre 0,6 e 0,8 unidades de absorvância. Diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo

(IPTG) foram previamente testadas a fim de se avaliar quais as melhores condições para os processos de indução da hHep1-Core (dados realizados pela mestranda do grupo). Dessa forma, aqui testamos somente duas concentrações de IPTG (0,2 mM e 0,4 mM), a 30 °C e 200 rpm por 4 h, visando obter a melhor condição de expressão dos mutantes truncados. Após o período de indução, os *pellets* foram obtidos por centrifugação a 8000 rpm por 10 min a 4 °C.

3.1.3. Processo de purificação

Para a realização das análises e experimentos, foi essencial obter certas propriedades físico-químicas dos mutantes hHep1-Ndel e hHep1-Cdel, bem como das proteínas hHep1 Δ mts e hHep1-Core, pois foram utilizadas de forma comparativa. Estas propriedades incluem a quantidade de resíduos de aminoácidos, a presença dos aminoácidos Triptofano (W), Tirosina (Y) e Cisteína (C), a massa molecular em Da, o ponto isoelétrico (pI) e o coeficiente de extinção molar (ϵ). Na Tabela 1, encontram-se os dados teóricos das propriedades dos mutantes sem a cauda de histidina, enquanto na Tabela 2 estão os dados referentes aos mutantes contendo essa cauda.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos mutantes hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core sem a cauda de histidina.

Proteína ^b	Resíduos de AA ^a	pI teórico ^a	MM (Da) ^a	W/Y/C ^a	$\epsilon_{280\text{nm}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a
hHep1 Δ mts	133	6,04	13869	1/3/4	9970
hHep1-Ndel	118	6,03	12491		
hHep1-Cdel	115	7,26	12106		
hHep1-Core	100	7,16	10728		

^a Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácidos pelo Software *Protparam*.

^b Valores obtidos para a sequência sem o peptídeo sinal e a cauda de histidina.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos mutantes hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core com a cauda de histidina.

Proteína ^b	Resíduos de AA ^a	pI teórico ^a	MM (Da) ^a	W/Y/C ^a	$\epsilon_{280\text{nm}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a
hHep1 Δ mts	150	6,67	15751	1/3/4	9970
hHep1-Ndel	135	6,66	14373		
hHep1-Cdel	132	8,08	13988		
hHep1-Core	117	7,83	12610		

^a Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácidos pelo Software *Protparam*.

^b Valores obtidos para a sequência sem o peptídeo sinal e com a cauda de histidina.

O *pellet* obtido no processo de indução foi ressuspenso em tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl. Em seguida, a mistura, mantida em gelo, foi incubada com 5 U de DNase (Promega) e 30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de lisozima (Sigma) por 30 min em gelo e submetida a pulsos ultrassônicos intermitentes para promover o processo de lise celular. A fração solúvel foi separada por centrifugação e em seguida clarificada por filtração utilizando membrana com poro de 0,45 μm .

Para a cromatografia de afinidade, uma coluna de níquel *HiTrap Chelating HP 5mL* (*GE Healthcare LifeSciences*) foi equilibrada em tampão contendo 100 mM de NaCl e 20 mM de imidazol. A proteína foi eluída com o mesmo tampão contendo 500 mM de imidazol. O terceiro passo cromatográfico foi realizado com a remoção da His tag pela enzima trombina em diálise contra tampão TK contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 5 mM de KCl e 2 mM de β -mercaptoetanol.

As proteínas foram novamente submetidas a uma cromatografia de afinidade com a coleta da fração eluída com 75 mM de imidazol. O quinto passo de purificação foi realizado por uma cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, em coluna *HiLoad Superdex 16/60 75 prep grade* (*GE Healthcare LifeSciences*) conectada ao equipamento *ÄKTA Prime Plus* (*GE Healthcare LifeSciences*), equilibrada em tampão TK. O processo completo foi conduzido com estrito controle de temperatura (4 °C). No caso das proteínas hHep1-Cdel e hHep1-Core, foi imprescindível realizar uma diálise para ajuste do pH, passando de 8,0 para 7,5, valor necessário para as análises estruturais subsequentes.

Os valores de pH empregados durante o processo de purificação dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e da proteína hHep1 Δ mts estão documentados na Tabela 3. Adicionalmente, o protocolo completo pode ser consultado na Figura 5, onde são apresentados os procedimentos detalhados utilizados ao longo do processo de purificação.

Tabela 3. Valores de pH dos tampões utilizados para a purificação da proteína hHep1 Δ mts e dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Core e hHep1-Cdel.

Proteína	Tampão de Lise	Tampão 20 mM (Imidazol)	Tampão 500 mM (Imidazol)	TK 1ª Diálise (Trombina)	TK Exclusão Molecular	TK 2ª Diálise
hHep1 Δ mts	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	-
hHep1-Ndel	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	-
hHep1-Cdel	8,5	8,5	8,5	8,5	8,0	7,5
hHep1-Core	8,5	8,5	8,5	8,5	8,0	7,5

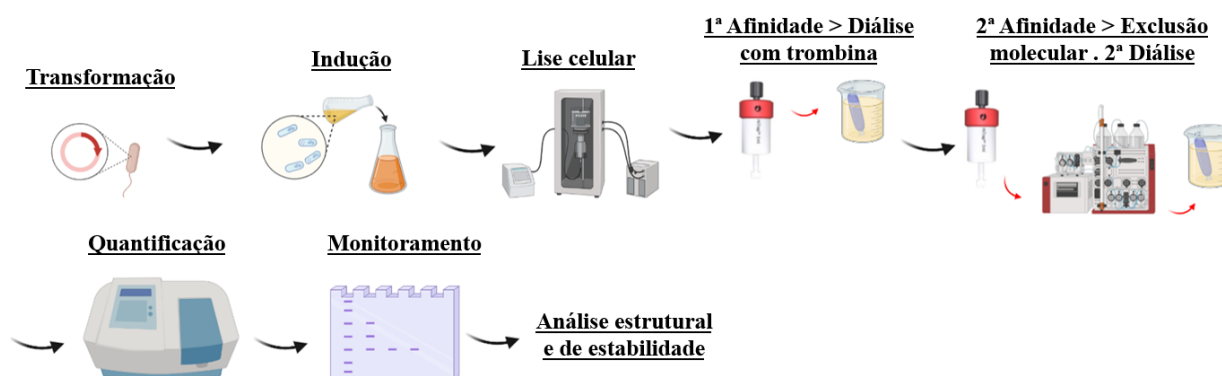


Figura 5. Protocolo detalhado para expressão e purificação da proteína hHep1 Δ mts e dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Core e hHep1-Cdel.

Fonte: autoria própria. Criado com BioRender

3.1.4. SDS-PAGE

As amostras obtidas durante os testes de indução e durante o processo de purificação dos mutantes foram analisadas por SDS-PAGE. Para isso, foram preparadas através de diluição em tampão 100 mM de Tris/HCl, contendo 0,2% de azul de bromofenol, 4% de SDS e 20% de glicerol. Devido à baixa massa molecular das proteínas recombinantes, foram utilizados géis de poli-acrilamida de 12% e tampão de corrida Tris/Tricina 100 mM (pH 8,2). Após a eletroforese, os géis foram corados com uma solução de corante azul de Coomassie 3 mM contendo 10% de ácido acético glacial e 45% de metanol. Os géis foram revelados utilizando uma solução descolorante composta por 45% de metanol e 10% de ácido acético glacial.

3.2. Análise estrutural

3.2.1. Análise estrutural pelo AlphaFold

Para prever a estrutura tridimensional (3D) dos mutantes truncados foi utilizado o *software AlphaFold*, um sistema de inteligência artificial de última geração desenvolvido pela *DeepMind*. Este sistema é capaz de prever as estruturas de proteínas de forma computacional, com uma precisão e velocidade sem precedentes. Em colaboração com o Instituto Europeu de Bioinformática do EMBL (EMBL-EBI), é disponibilizado mais de 200 milhões de previsões de estruturas de proteínas geradas pelo *AlphaFold* de forma gratuita e aberta para a comunidade científica global. Dessa forma, a fim de prever a estrutura 3D dos mutantes truncados a partir de sua sequência de aminoácidos, utilizamos essa inteligência artificial e comparamos com os resultados obtidos pelas caracterizações estruturais realizadas.

3.2.2. Espectropolarimetria de dicroísmo circular

As análises de estrutura secundária dos mutantes foram realizadas utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-815 com um sistema Peltier PFD 425S acoplado, para controle de temperatura, e cubeta de 1 mm. Os espectros varrem em um intervalo de 260 a 195 nm em uma velocidade de 50 nm.min⁻¹ e, dessa forma, foi subtraído o sinal emitido pelo tampão TK (pH 7,5), nas mesmas condições de medida. Em seguida, foram transformados em elipticidade molar residual média ($[\theta]$), utilizando a seguinte equação:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MM}{C \cdot l \cdot n}$$

onde MM é Massa Molar da proteína em kDa; C , concentração molar de proteína; l , caminho ótico da cubeta em cm; e n , o número de resíduos da proteína. O cálculo estimado das estruturas secundárias foi realizado pelo *software* CDNN Deconvolution (Bohm *et al.*, 1992).

3.2.3. Espectroscopia de Emissão por Fluorescência

A análise da estrutura terciária foi executada por meio da fluorescência intrínseca do Triptofano em um Espectrofotômetro de Fluorescência HITACHI F-4500. As amostras foram analisadas em tampão TK (pH 7,5) e obtiveram uma concentração de 2,5 μM, com excitação em 295 nm, obtendo-se espectros de fluorescência no intervalo de 310 a 420 nm, para a proteína enovelada e na presença de 6 M de cloridrato de guanidina (GndHCl).

3.2.4. Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC)

Propriedades hidrodinâmicas dos mutantes foram avaliadas por aSEC (do inglês *analytical Size Exclusion Chromatography*), a fim de verificar aspectos de sua estrutura terciária e avaliar a potencial presença de estrutura quaternária. As cromatografias foram realizadas empregando uma coluna *Superdex 200 10/300 GL* (GE *Healthcare LifeSciences*) analítica previamente equilibrada com tampão TK (pH 7,5).

O perfil das amostras dos mutantes foi comparado aos perfis de proteínas padrão globulares com MM e raio de Stokes (R_s) conhecidos, apresentadas na Tabela 4. As correlações obtidas permitiram determinar a MM aparente (MM_{app}), o raio de Stokes (R_s) e a razão friccional (f/f_0) das proteínas recombinantes.

Tabela 4. Proteínas globulares padrão.

Proteína Padrão	MM (kDa)	R _s (Å)
Apoferritina	480	67
γ-globulina	160	48
BSA	67	36
Anidrase Carbônica	30	24
Citocromo C	12,3	14

A MM_{app} é dada pela relação linearizada

$$K_{AV} = -a (\log MM) + b,$$

onde a e b são obtidos por meio de uma curva de calibração construída com os padrões moleculares e o coeficiente de partição (K_{AV}) obtido pela razão:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

Sendo que V_e é dado pelo volume de eluição, V_0 pelo volume da fase móvel e V_t pelo volume total da coluna. Os valores obtidos foram comparados aos valores teóricos de MM para a estrutura monomérica e dimérica dos mutantes, calculadas pelo *software* SEDNTERP (PHILO, 1997). O R_s foi obtido pelo ajuste linearizado entre os R_s das proteínas padrões e o $-\log(K_{AV}^{1/2})$ dado por

$$R_s = a (-\log K_{AV}^{1/2}) + b$$

A f/f_0 foi então calculada pela razão entre R_s determinado experimentalmente e o teórico, estimado pelo *software* SEDNTERP.

3.3. Análise da estabilidade

3.3.1. Estabilidade temporal

Para avaliar a integridade estrutural dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e da proteína hHep1Δmts em função do tempo a 4°C, foram coletadas amostras em diferentes tempos (0h, 24h, 48h e 72h) após o processo de purificação que foram analisadas por meio de SDS-PAGE em tampão Tris/Tricina e gel de poli-acrilamida 12%.

3.3.2. Estabilidade química

As análises de estabilidade química foram executadas por meio da avaliação das variações da estrutura terciária dos mutantes, em que serão monitoradas por espectroscopia de emissão de fluorescência intrínseca do W (triptofano) em um espectrofotômetro de fluorescência HITACHI F-4500. As amostras de proteínas foram desnaturadas com cloridrato

de guanidina (GndHCl). Os espectros obtidos foram utilizados para o cálculo do centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$), utilizando a equação abaixo, e para encontrar os λ_{\max} por meio do *software* Origin.

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

O perfil do processo de desnaturação dos mutantes foi avaliado na presença do agente caotrópico GndHCl. Foi preparada uma solução estoque em tampão TK (pH 7,5). A concentração foi aferida pela variação na viscosidade da solução, verificada pelas mudanças nos índices refratários entre o tampão e a solução (Δn). A correlação entre o Δn e a concentração de GndHCl foram determinadas por Pace, Shirley e Thomson (1989), descritas por:

$$[\text{GndHCl}] = 57,147(\Delta n) + 38,68(\Delta n)^2 + 91,60(\Delta n)^3$$

Amostras dos mutantes foram tratadas com concentrações crescentes do agente caotrópico GndHCl, com intervalos de 0,5 M em um intervalo de 0 a 6 M, em que foi obtida a concentração média de transição (C_m) a fim de verificar a estabilidade química desta proteína mutante. Para isso foram realizados experimentos na presença de concentrações crescentes de GndHCl, sobre a proteína, em que a excitação da sonda ocorreu em 295 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos mutantes

4.1.1. Indução à expressão

A Figura 6 apresenta a avaliação por SDS-PAGE das condições de indução à expressão da hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel que foram testadas e as respectivas frações de proteína obtidas de forma solúvel após a lise celular. Para ambas as concentrações de IPTG utilizadas (0,2 mM e 0,4 mM), observou-se uma expressão substancial das proteínas recombinantes, exceto no caso do mutante hHep1-Cdel com 0,2 mM de IPTG, onde a expressão foi relativamente menor. Os rendimentos mais significativos foram alcançados com a concentração de 0,4 mM. Diante disso, com o objetivo de maximizar o rendimento do processo de indução, optou-se por utilizar a concentração de 0,4 mM para condução deste estudo.

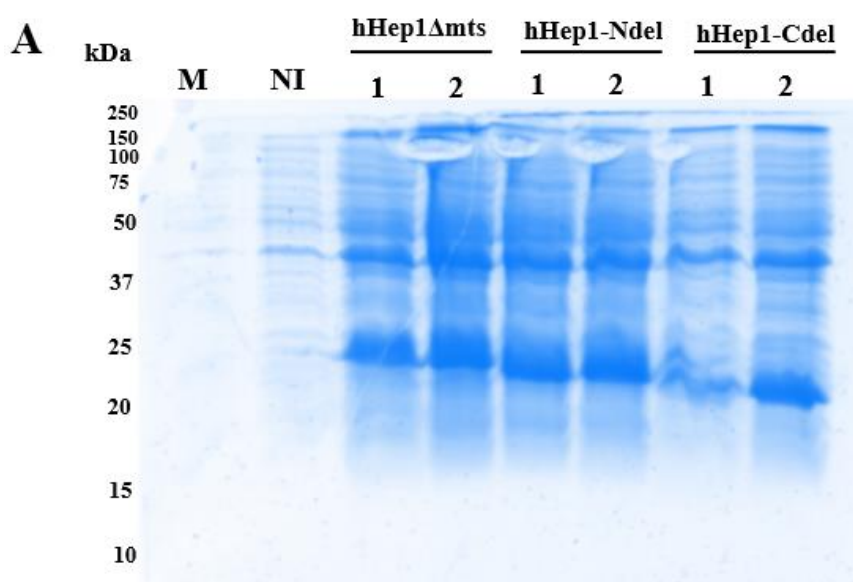


Figura 6. Análise das condições de indução à expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE. (M) marcador de peso molecular; (NI) pellet não induzido; (1) construções induzidas com 0,2 mM de IPTG; (2) construções induzidas com 0,4 mM de IPTG.

Fonte: autoria própria.

4.1.2. Processo de purificação

É importante destacar que a purificação do mutante hHep1-Cdel foi inicialmente conduzida nas mesmas condições empregadas para as proteínas hHep1-Ndel e hHep1 Δ mts, visando testar um possível protocolo contendo as mesmas condições para todos os mutantes truncados. Entretanto, devido ao ponto isoelétrico mais básico deste mutante, uma nova estratégia de purificação foi necessária, resultando em ajustes nos valores de pH dos tampões utilizados (conforme indicado na Tabela 3). Além dessas informações, é válido ressaltar que

tudo o processo de purificação foi inicialmente realizado com os tampões contendo 20 mM de Na_3PO_4 . O fosfato é altamente utilizado em protocolos de purificação de proteínas recombinantes, visto que desempenha várias funções cruciais em um tampão, incluindo a regulação do pH, a modulação da força iônica, a redução de agentes e a estabilização conformacional, contribuindo assim para um processo eficiente e bem-sucedido de purificação de proteínas. No entanto, posteriormente, foi necessária a remoção desse componente do tampão utilizado para as diálises e exclusão molecular, visto que a estabilidade do mutante hHep1-Cdel e hHep1-Core (atestado anteriormente pela mestranda do grupo), estava sendo comprometida (ver detalhes adiante).

a) 1ª Condição: presença de íons fosfato e pH 7,5 para todos os mutantes truncados

As amostras eluídas e coletadas durante todo o processo de purificação para a primeira condição foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 7). Na Figura 7A observa-se a partir do perfil (T), correspondente à amostra coletada após o período de incubação da hHep1 Δ mts com a enzima trombina, uma diminuição de massa da banda de interesse, equivalente à perda da His tag (2 kDa). Além disso, em todo o processo, desde a lise celular até a diálise, é possível identificar uma banda referente a proteína hHep1 Δ mts, correspondente à 15 kDa com a cauda de histidina e 13 kDa sem essa cauda.

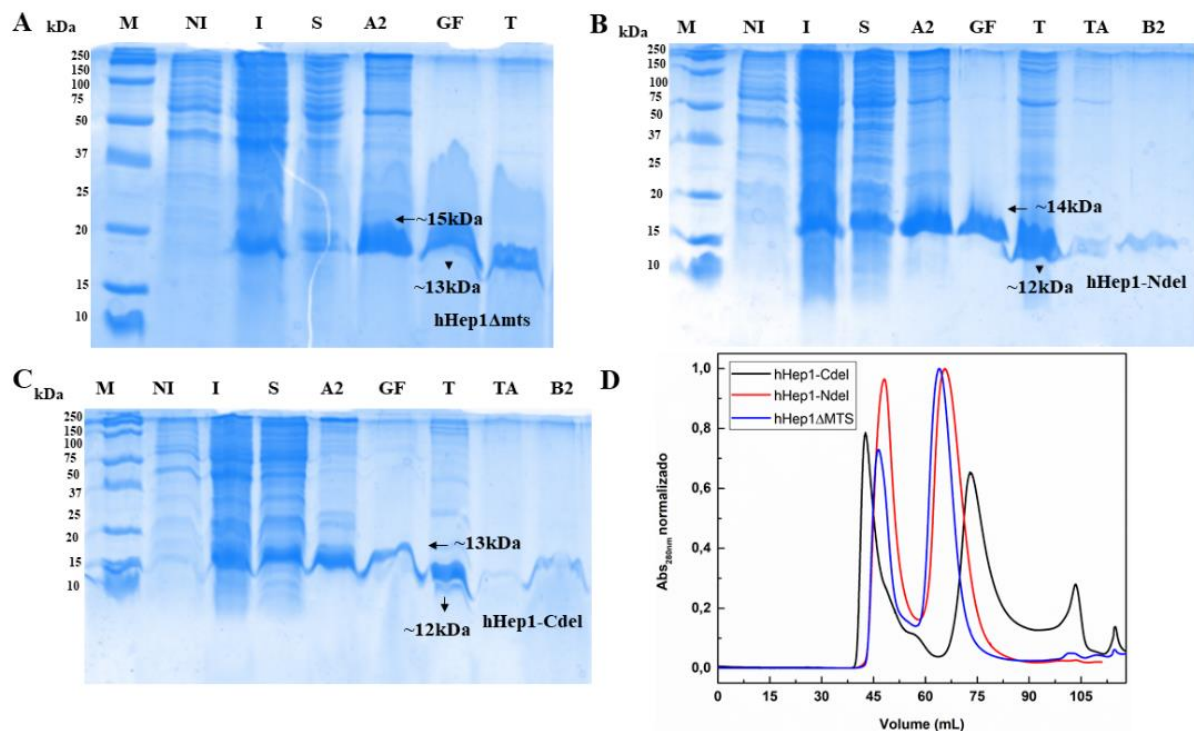


Figura 7. Etapas do processo de purificação realizados na primeira condição para as proteínas hHep1 Δ mts. (A), hHep1-Ndel (B) e hHep1-Cdel (C).

(A), (B) e (C) SDS-PAGE das amostras de (NI) células não induzidas; (I) as mesmas células induzidas com 0,4 mM de IPTG; (S) sobrenadante após centrifugação; (A2) fração eluída em 500 mM de imidazol na 1^o

cromatografia de afinidade ao níquel; (GF) fração obtida na cromatografia de exclusão por tamanho preparativa; (T) fração após diálise na presença de trombina para clivagem da His tag. Para as construções hHep-Ndel e hHep1-Cdel são apresentadas a mais amostras referentes à (TA) fração eluída em tampão 0 mM na 2ª cromatografia de afinidade; (B2) fração eluída em 75 mM de imidazol na 2ª cromatografia de afinidade. **(D)** Perfil obtido da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa das proteínas hHep1-Cdel (preto), hHep1-Ndel (vermelho) e hHep1 Δ mts (azul).

Fonte: autoria própria.

O processo de clivagem das His tags demonstrou-se eficaz para as outras duas construções, hHep1-Ndel (Figura 7B) e hHep1-Cdel (Figura 7C), conforme evidenciado pela migração da banda referente à diálise (T), a qual se posicionou a uma posição mais baixa em relação à obtida antes da incubação com a enzima trombina. Além disso, observa-se a presença de uma banda nas canaletas (TA) e (B2), embora com menor intensidade, correspondente a esses mutantes sem a His tag, indicando sua eluição em 75 mM de imidazol durante a segunda cromatografia de afinidade. Essa redução na concentração de imidazol em comparação com a utilizada na primeira cromatografia de afinidade sugere a ocorrência da clivagem. No entanto, é perceptível que essas proteínas recombinantes ainda mantêm uma certa afinidade residual aos íons Ni^{2+} . Tal fenômeno é atribuído à presença do par de histidinas vicinais (106 e 107) na região Core. Provavelmente, esses resíduos apresentam suas cadeias laterais (grupos imidazol) orientadas para fora da estrutura, expostas ao solvente e, conseqüentemente, prontas para interagir com os íons Ni^{2+} presentes na resina da coluna de afinidade.

A fração das proteínas recombinantes eluídas com 75 mM de imidazol (B2) foi submetida a uma cromatografia de exclusão por tamanho, conforme apresentado na Figura 7D. O perfil cromatográfico obtido para as proteínas hHep1-Cdel, hHep1-Ndel e hHep1 Δ mts revelou a presença de dois picos distintos. O primeiro pico, observado no volume morto da coluna, sugere a presença de oligômeros ou agregados da proteína alvo, enquanto o segundo representa a proteína recombinante em sua forma monomérica. No caso do mutante hHep1-Cdel, entre 90 e 110 mL, observou-se a formação de picos inespecíficos ao final da corrida, indicando possíveis sinais de degradação. Essa degradação foi corroborada não apenas pelo cromatograma, mas também pela precipitação observada durante a diálise para troca do tampão. Dessa forma, torna-se evidente que essa condição experimental é mais adequada para os mutantes hHep1-Ndel e para a proteína hHep1 Δ mts, enquanto para o hHep1-Cdel, outra condição se faz necessária visando garantir sua estabilidade e evitar a degradação durante o processo.

b) 2ª Condição: presença de íons fosfato e pH ideal para hHep1-Cdel

O processo de purificação do mutante hHep1-Cdel realizado na segunda condição experimental, foi detalhadamente descrito nas Figuras 8 e 9. A Figura 8 apresenta um resumo das etapas de cromatografia de afinidade, bem como o perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras coletadas até a primeira cromatografia de afinidade. Foram realizadas eluições com concentrações crescentes de imidazol (20 mM, 75 mM, 150 mM, 300 mM e 500 mM) para determinar a concentração ideal para a eluição da proteína em ambas as cromatografias.

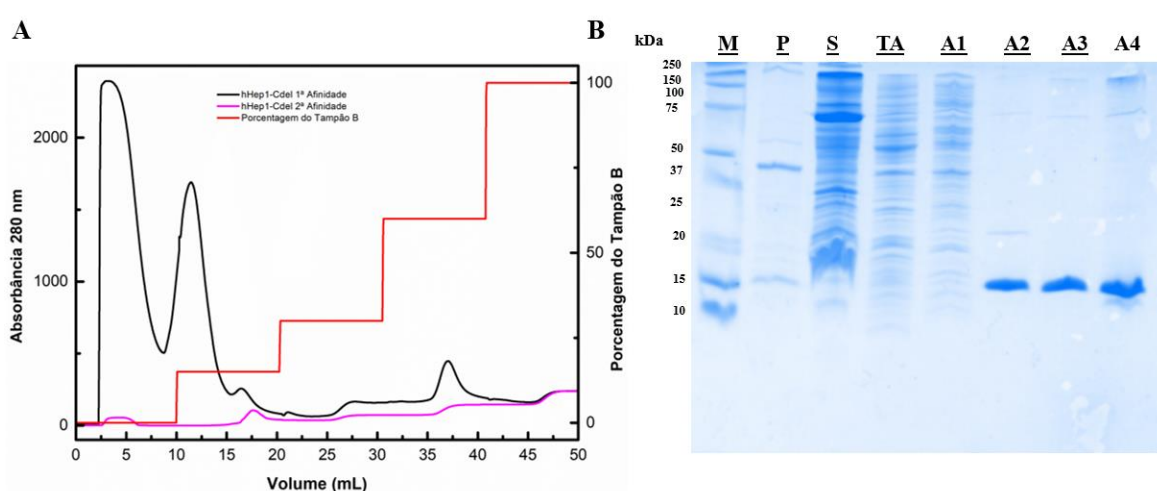


Figura 8. Primeira e segunda cromatografia de afinidade do mutante hHep1-Cdel.

(A) e a análise por SDS-PAGE. (A) Primeira e segunda cromatografia de afinidade é apresentada em preto e magenta, respectivamente; em vermelho é apresentado o aumento da concentração do tampão B. (B) SDS-PAGE das amostras do (P) pellet obtido após centrifugação; (S) sobrenadante após centrifugação; (TA) amostra eluída em 20 mM de imidazol; (A1) amostra eluída em 75 mM de imidazol; (A2) amostra eluída em 150 mM de imidazol; (A3) amostra eluída em 300 mM de imidazol; (A4) amostra eluída em 500 mM de imidazol.

Fonte: autoria própria.

Na primeira cromatografia, representada em preto na Figura 8A, observou-se a eluição de parte dos contaminantes retidos na coluna, por meio de interações eletrostáticas inespecíficas, empregando-se uma baixa concentração de imidazol (20 mM), enquanto a fração de interesse foi obtida com 300 mM de imidazol, evidenciando a formação de um pico referente à hHep1-Cdel. Em concentrações superiores (500 mM), não foi observado sinal de absorvância referente à eluição proteica no cromatograma. O perfil de SDS-PAGE (Figura 8B) revelou o aparecimento de três bandas distintas: A2 corresponde à amostra eluída em 150 mM de imidazol, A3 à amostra eluída em 300 mM de imidazol, e A4 à amostra eluída em 500 mM de imidazol, sugerindo que a proteína é principalmente eluída em 300 mM de imidazol.

Após a incubação da amostra coletada em 300 mM de imidazol com a enzima trombina, foi realizada uma segunda cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} , com o objetivo de selecionar os mutantes hHep1-Cdel cujas His tags tenham sido clivadas. Os resultados desta etapa são apresentados em magenta na Figura 8A, evidenciando uma maior fração de proteína eluída em 75 mM de imidazol quando comparada à eluição em tampão sem imidazol. Não foram observadas eluições de proteínas em concentrações superiores, sugerindo uma alta eficiência na clivagem da His tag.

A análise da pSEC e do perfil de SDS-PAGE das amostras coletadas ao longo do processo de purificação está documentada na Figura 9. A fração eluída com 300 mM da primeira cromatografia de afinidade foi submetida à pSEC para comparar o perfil cromatográfico entre os mutantes com e sem a His tag, como ilustrado na Figura 9A em vermelho.

O mutante hHep1-Cdel foi submetido à diálise com trombina e, posteriormente, a uma segunda cromatografia de afinidade. A fração eluída com 75 mM de imidazol foi aplicada em uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho, cujo perfil cromatográfico está representado em preto na Figura 9A. O cromatograma revela a presença de frações eluídas, formando dois picos centrados, um em 40 mL (volume morto da coluna) e outro em 70 mL (C). A amostra coletada referente ao segundo pico foi submetida à análise de SDS-PAGE, cujos perfis eletroforéticos são apresentados na Figura 9B e 9C.

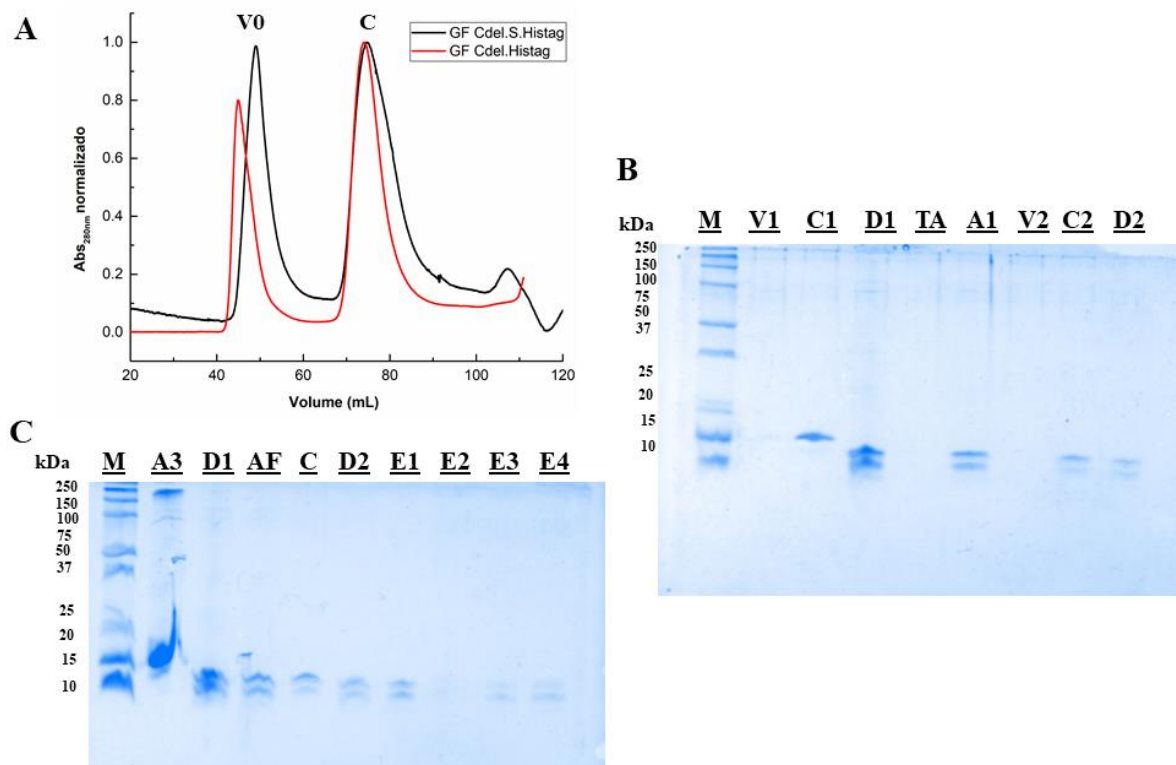


Figura 9. Cromatografia de exclusão por tamanho preparativa e o padrão por SDS-PAGE do mutante hHep1-Cdel.

(A) Perfil cromatográfico da exclusão molecular da hHep1-Cdel com e sem histidina. (B) SDS-PAGE das amostras da (V1) fração do volume morto da cromatografia de exclusão por tamanho da hHep1-Cdel com histidina; (C1) fração eluída entre 70 e 80 mL da cromatografia de exclusão por tamanho da hHep1-Cdel com histidina; (D1) fração após diálise na presença de trombina; (TA) fração eluída em 20 mM na 2ª afinidade; (A1) fração eluída em 75 mM da 2ª afinidade; (V2) fração do volume morto da cromatografia de exclusão por tamanho da hHep1-Cdel sem histidina; (C2) fração eluída entre 70 e 80 mL da cromatografia de exclusão por tamanho da hHep1-Cdel sem histidina; (D2) 2ª diálise da amostra C2. (C) SDS-PAGE das amostras da (A3) fração eluída em 300 mM na 1ª afinidade; (D1) fração após diálise na presença de trombina; (AF) fração eluída em 75 mM na 2ª afinidade; (C) fração eluída entre 70 e 80 mL da cromatografia de exclusão por tamanho da hHep1-Cdel sem a cauda de histidina; (D2) 2ª diálise da amostra C para troca de tampão; (E1), (E2), (E3) e (E4) frações coletadas da D2 após 24 h, 48 h, 72 h e 78 h, respectivamente.

Fonte: autoria própria

A avaliação das amostras coletadas ao longo da primeira cromatografia de afinidade, segunda cromatografia de afinidade, diálise com a enzima trombina, pSEC e estabilidade da amostra ao longo de aproximadamente quatro dias está documentada na Figura 9B. A análise desse perfil sugere a degradação da proteína em todos os passos cromatográficos, incluindo a fração A3, referente à amostra coletada na primeira cromatografia de afinidade eluída com 300 mM de imidazol.

As amostras da hHep1-Cdel coletadas após a primeira afinidade, diálise com a enzima trombina, segunda cromatografia de afinidade ao níquel, exclusão por tamanho e diálise para troca de tampão foram submetidas à análise de SDS-PAGE (Figura 9C). Observou-se que a proteína hHep1-Cdel com a His tag (caneleta C1, Figura 9B) não apresentava sinais de degradação. No entanto, para as bandas referentes às canaletas D1, A1, C2 e D2, a proteína

hHep1-Cdel sem a cauda de histidina demonstrou algum grau de degradação, evidenciado pela formação de uma banda abaixo do esperado.

c) **3ª Condição: ausência de íons fosfato e pH ideal para o mutante hHep1-Cdel**

Conforme observado por uma mestranda do grupo para o mutante hHep1-Core (dados não publicados), a presença de íons fosfato no tampão TKP pode interferir na estabilidade desse mutante, levando à sua degradação, o que pode ocorrer também com o mutante hHep1-Cdel. Portanto, uma nova condição foi testada, na qual o fosfato foi removido do tampão TKP, resultando no tampão denominado TK, composto por 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de NaCl, 5 mM de KCl e 2 mM de β -mercaptoetanol.

O perfil cromatográfico da primeira e segunda cromatografia de afinidade, bem como a cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, está documentado na Figura 10. Este processo de purificação, realizado em tampão TK, livre de íons fosfato, indicou que o mutante hHep1-Cdel manteve o perfil durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade, sendo eluído em 300 mM e 75 mM de imidazol, respectivamente. As frações coletadas foram avaliadas por SDS-PAGE e estão representadas na Figura 11.

Na pSEC, observaram-se dois picos distintos (Figura 10B), uma fração eluindo o volume morto (provavelmente uma forma agregada da proteína, descartada) e a proteína monomérica. Essas frações foram coletadas e tiveram sua composição avaliada por SDS-PAGE, cujos perfis eletroforéticos são apresentados na Figura 11.

Com base nos cromatogramas e nos perfis eletroforéticos fornecidos, é evidente que o mutante hHep1-Cdel foi obtido em sua forma solúvel e monomérica. Portanto, essa condição se revela ideal para a purificação desta proteína, uma vez que a ausência dos íons fosfato contribui para sua estabilidade. A peculiaridade observada na instabilidade temporal em presença de íons fosfato na proteína hHep1-Core (dados não mostrados) e para a hHep1-Cdel contrasta com a alta estabilidade manifestada pela variante hHep1 Δ mts sob essas mesmas condições. Conforme discutido por Hunter (2012), os íons fosfato, devido às suas propriedades de alta densidade negativa e extensa camada de solvatação, têm a capacidade de interagir com nove resíduos de aminoácidos específicos (serina, treonina, tirosina, arginina, lisina, histidina, cisteína, aspartato e glutamina). Essa interação promove a formação de ligações de hidrogênio e pontes salinas tanto intra quanto intermoleculares. Assim, a instabilidade observada para esses mutantes pode ser atribuída à disponibilidade desses resíduos de aminoácidos, que, na ausência das regiões truncadas, não conseguem realizar suas interações naturais e podem interagir com

os íons fosfato, resultando em perturbações em sua estrutura e facilitando o processo de degradação. Apesar da presença de uma banda abaixo do esperado ao longo do processo de purificação, sugerindo uma possível degradação, esta representa menos de 10% da amostra total, não comprometendo a realização das caracterizações estruturais.

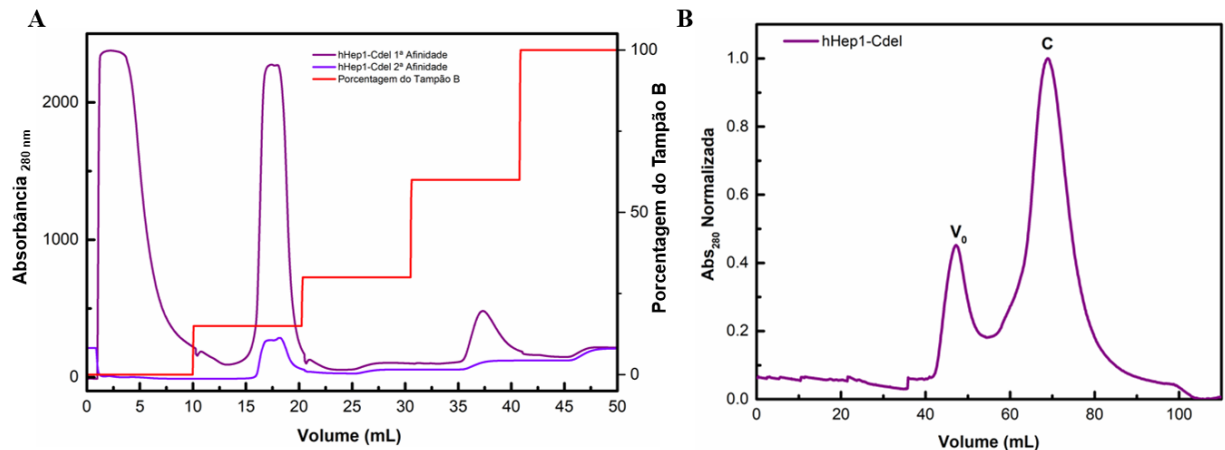


Figura 10. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade (A) e a exclusão por tamanho preparativa (B) na ausência de fosfato e pH ideal.

Fonte: autoria própria.

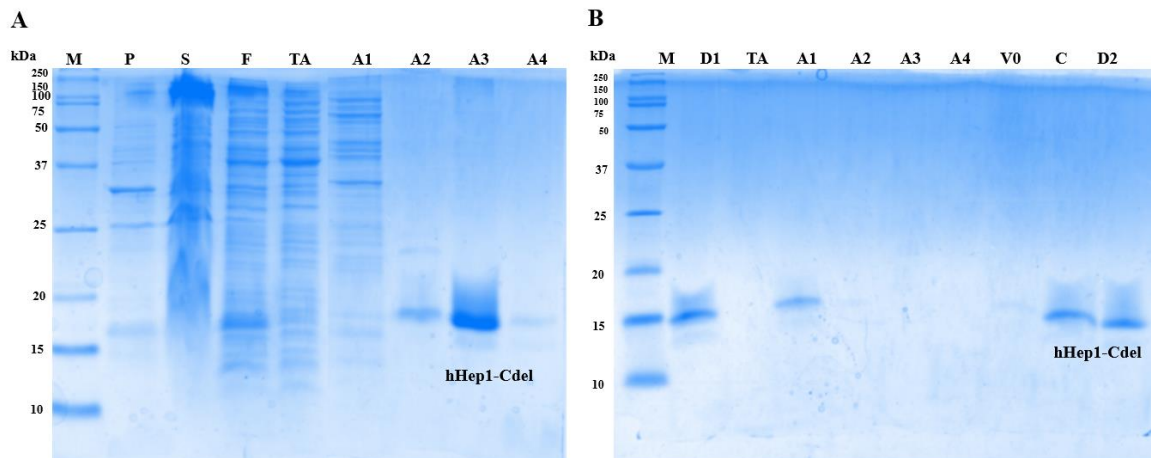


Figura 11. Perfil eletroforético do mutante hHep1-Cdel obtido durante as etapas de purificação.

(A) SDS-PAGE das amostras da (P) fração do pellet; (S) fração sobrenadante; (F) fração após filtração; (TA) fração eluída em 20 mM de imidazol; (A1) fração eluída em 75 mM de imidazol; (A2) fração eluída em 150 mM de imidazol; (A3) fração eluída em 300 mM de imidazol; (A4) fração eluída em 500 mM de imidazol. (B) SDS-PAGE das amostras da (D1) fração após diálise com trombina; (TA) fração amostra eluída em 20 mM de imidazol na 2ª afinidade; (A1) fração eluída em 75 mM; (A2) fração eluída em 150 mM de imidazol; (A3) fração eluída em 300 mM de imidazol; (A4) fração eluída em 500 mM de imidazol; (V0) fração do volume morto; (C) fração eluída da cromatografia de exclusão por tamanho no intervalo 70 e 80 mL; (D2) fração após diálise para troca de tampão.

Fonte: autoria própria.

Dado que as caracterizações estruturais devem ser conduzidas em tampão TK, esta condição será mantida para as construções abordadas neste estudo, incluindo hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e hHep1Δmts, a fim de possibilitar uma análise comparativa. Dessa forma, foi realizada a purificação da hHep1Δmts e hHep1-Ndel na ausência de fosfato e com seu respectivos pH (ver Tabela 4).

Os cromatogramas e os perfis eletroforéticos da proteína hHep1 Δ mts foram detalhadamente analisados e estão apresentados na Figura 12. Na Figura 12A, destacada em azul escuro e azul claro, são delineadas as etapas da primeira e segunda cromatografia de afinidade ao níquel, respectivamente. É possível observar que uma fração dos contaminantes, retida na coluna devido a interações eletrostáticas não específicas, é eluída com uma concentração inicialmente baixa de imidazol, enquanto a fração desejada é obtida com uma concentração de 300 mM de imidazol, similarmente ao observado para a proteína hHep1-Cdel. Após a etapa de incubação da amostra com a enzima trombina, foi conduzida uma segunda cromatografia de afinidade ao Ni²⁺, cujos resultados são exibidos na Figura 12A, em azul claro, evidenciando uma maior fração de proteína eluída em 75 mM de imidazol em comparação com a eluição em tampão sem imidazol. O processo de clivagem das His tags demonstrou ser eficiente, conforme indicado pela menor concentração de imidazol necessária para a eluição da maior fração de proteína em comparação com a primeira cromatografia de afinidade.

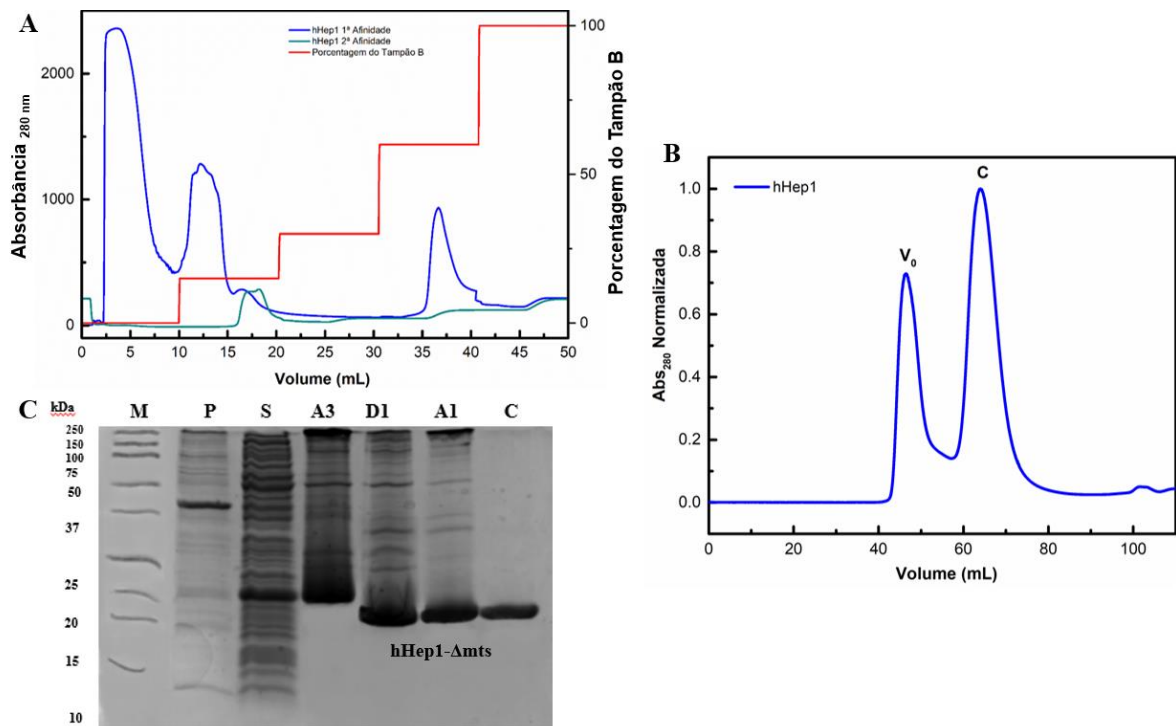


Figura 12. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade da proteína hHep1 Δ mts (A), exclusão por tamanho preparativa (B) e o perfil eletroforético coletado durante as etapas de purificação (C). (C) SDS-PAGE das amostras da (P) fração do pellet; (S) fração sobrenadante; (A3) fração eluída em 500 mM de imidazol na primeira afinidade; (D1) fração após diálise com trombina; (A1) fração eluída em 75 mM segunda afinidade; (C) fração eluída da cromatografia de exclusão por tamanho.

Fonte: autoria própria.

As amostras obtidas ao longo dos processos de cromatografia de afinidade inicial e subsequente, diálise utilizando trombina e cromatografia de exclusão molecular, foram minuciosamente analisadas em relação ao seu perfil eletroforético, como ilustrado na Figura

12C. A eliminação dos íons fosfato dos tampões de purificação resultou em um processo consideravelmente mais eficiente, evidenciado pelo aumento do rendimento, estabilidade e obtenção das proteínas recombinantes de forma solúvel, monomérica e sem sinais de degradação.

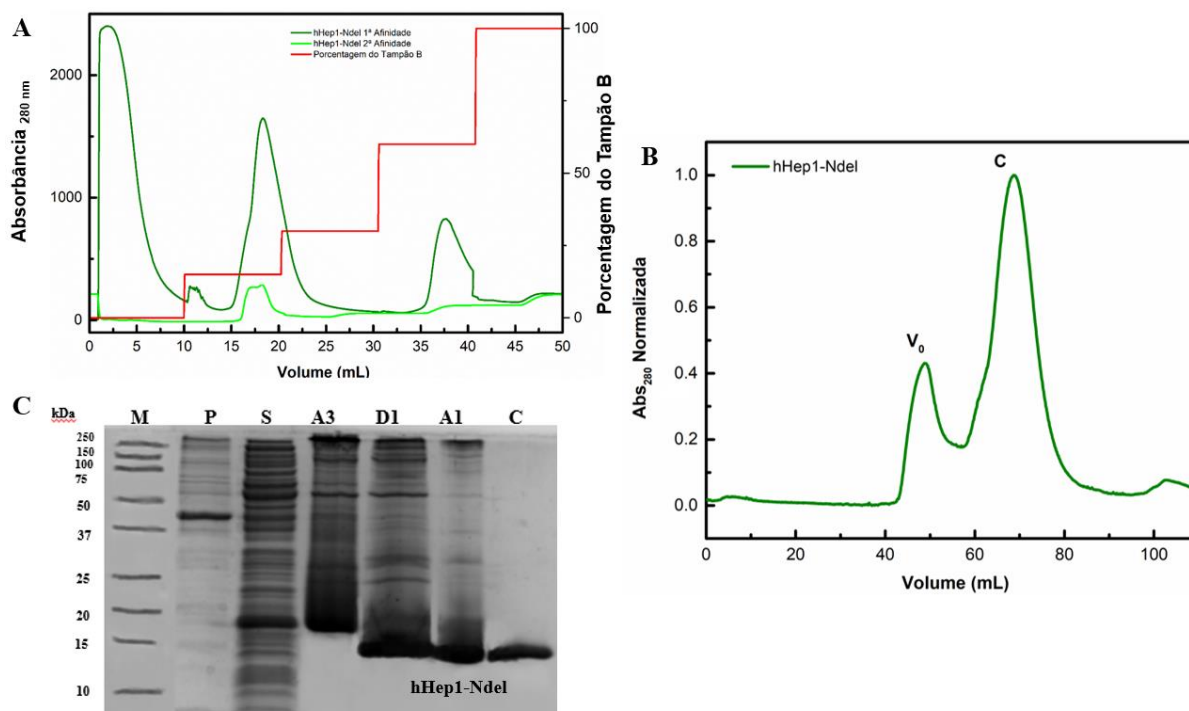


Figura 13. Perfil obtido durante a primeira e segunda cromatografia de afinidade do mutante hHep1-Ndel. (A), exclusão por tamanho preparativa (B) e o perfil eletroforético coletado durante as etapas de purificação (C). (C) SDS-PAGE das amostras da (P) fração do pellet; (S) fração sobrenadante; (A3) fração eluída em 500 mM de imidazol na primeira afinidade; (D1) fração após diálise com trombina; (A1) fração eluída em 75 mM segunda afinidade; (C) fração eluída da cromatografia de exclusão por tamanho.

Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos para a proteína hHep1-Ndel seguem um padrão semelhante aos observados para a hHep1Δmts, como demonstrado nos cromatogramas e perfis eletroforéticos detalhadamente analisados e apresentados na Figura 13. Assim como na hHep1Δmts, a primeira e segunda cromatografia de afinidade ao níquel revelaram uma eluição eficaz dos contaminantes, seguida pela obtenção da fração desejada com uma concentração de 300 mM de imidazol. Após a etapa de incubação com a enzima trombina, a segunda cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ também resultou em uma maior fração de proteína eluída em 75 mM de imidazol em comparação com a eluição em tampão sem imidazol, indicando a eficácia do processo de clivagem das His tags. Esses resultados corroboram com a eficiência e consistência do método de purificação aplicado, garantindo a obtenção de proteínas solúveis e monoméricas.

4.2. Análise estrutural

4.2.1. Análise estrutural pelo AlphaFold

A determinação da estrutura tridimensional (3D) dos mutantes truncados da proteína hHep1 foi conduzida por meio da aplicação do *software AlphaFold*. Este estudo buscou analisar e compreender as características estruturais dessas variantes, visando elucidar potenciais modificações conformacionais resultantes das mutações introduzidas.

Inicialmente, procedeu-se o alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes às estruturas das variantes mutantes, conforme ilustrado na Figura 14. Este alinhamento permitiu a identificação de regiões de similaridade e diferença entre as sequências analisadas. A partir do alinhamento das sequências, tornou-se possível discernir padrões de conservação e divergência entre as variantes mutantes estudadas, evidenciada pela área delimitada na caixa azul na referida figura. Esse processo é crucial para compreender as implicações funcionais das mutações observadas, uma vez que as alterações na estrutura de uma proteína podem afetar diretamente sua função biológica.

hHep1-Ndel	- - - - -	0
hHep1-Core	- - - - -	0
hHep1	M L R T A L R G A P R L L S R V Q P R A P C L R R L W G R G A R P E V A G R R R A W A W G W R R S	49
hHep1deltamts	- - - - -	G S H M 4
hHep1-Cdel	- - - - -	G S H M 4
hHep1-Ndel	- - - - - G S H M	E A A H Y Q L V Y T C K V C G T R S S K R I S K L A Y H Q G V V I V 38
hHep1-Core	- - - - - G S H M	E A A H Y Q L V Y T C K V C G T R S S K R I S K L A Y H Q G V V I V 38
hHep1	S S E Q G P G P A A A L G R V	E A A H Y Q L V Y T C K V C G T R S S K R I S K L A Y H Q G V V I V 98
hHep1deltamts	S S E Q G P G P A A A L G R V	E A A H Y Q L V Y T C K V C G T R S S K R I S K L A Y H Q G V V I V 53
hHep1-Cdel	S S E Q G P G P A A A L G R V	E A A H Y Q L V Y T C K V C G T R S S K R I S K L A Y H Q G V V I V 53
hHep1-Ndel	T C P G C Q N H H I I A D N L G W F S D L N G K R N I E E I L T A R G E Q V H R V A G E G A L E L	87
hHep1-Core	T C P G C Q N H H I I A D N L G W F S D L N G K R N I E E I L T A R G E Q V H R V A G E G A L E L	87
hHep1	T C P G C Q N H H I I A D N L G W F S D L N G K R N I E E I L T A R G E Q V H R V A G E G A L E L	147
hHep1deltamts	T C P G C Q N H H I I A D N L G W F S D L N G K R N I E E I L T A R G E Q V H R V A G E G A L E L	102
hHep1-Cdel	T C P G C Q N H H I I A D N L G W F S D L N G K R N I E E I L T A R G E Q V H R V A G E G A L E L	102
hHep1-Ndel	V L E A A G A P T S T A A P E A G E D E G P P S P G K T E P S	118
hHep1-Core	V L E A A G A P T S T A A - - - - -	100
hHep1	V L E A A G A P T S T A A P E A G E D E G P P S P G K T E P S	178
hHep1deltamts	V L E A A G A P T S T A A P E A G E D E G P P S P G K T E P S	133
hHep1-Cdel	V L E A A G A P T S T A A - - - - -	115

Figura 14. Alinhamento das sequências da hHep1 completa, hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core, realizado pelo *software The UniProt Consortium: the Universal Protein Knowledgebase in 2023*.

Fonte: autoria própria

Essas sequências foram submetidas no *software AlphaFold* e o resultado da predição das estruturas tridimensionais dos mutantes truncados da hHep1 podem ser encontrados na Figura 15A, em que suas estruturas foram alinhadas utilizando o *software Chimera*. A partir dessa predição, podemos identificar que os truncamentos não acometeram a estrutura secundária e terciária da região com função conhecida (Core). Esse dado corrobora com os dados aqui apresentados para os experimentos de Dicroísmo Circular e de Espectroscopia de Emissão por Fluorescência, em que a remoção das regiões não afeta sua estrutura diretamente.

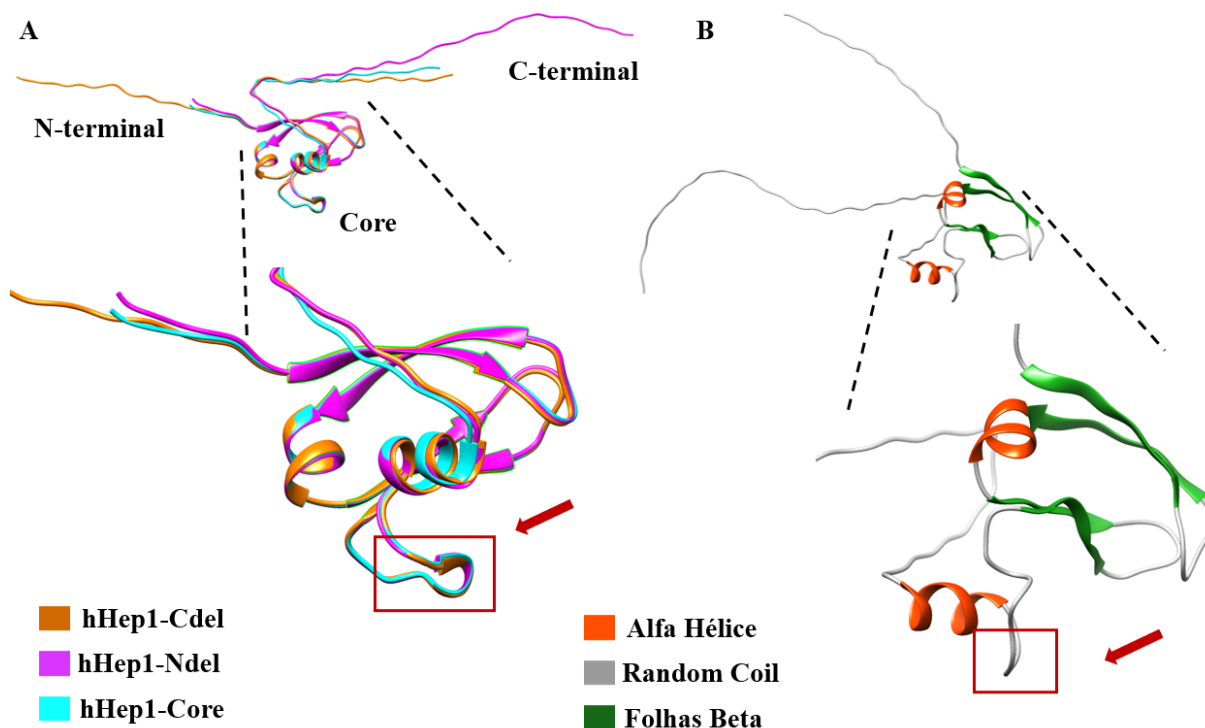


Figura 15. (A) Alinhamento das estruturas hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core obtidas pelo software AlphaFold e realizado no Chimera. (B) Estrutura da hHep1 Δ mts indicando as estruturas secundárias. Estrutura hélice α indicada pela seta em vermelho.

Fonte: autoria própria.

No entanto, a análise comparativa das estruturas tridimensionais dos mutantes truncados da proteína hHep1 em relação à hHep1 Δ mts (proteína completa), esta última caracterizada pela ausência de quaisquer truncamentos, revelou diferenças mínimas na similaridade estrutural e espacial entre essas variantes. Ao realizar o alinhamento das estruturas dos mutantes com a hHep1 Δ mts, conforme representado na Figura 16, observou-se uma baixa congruência estrutural e espacial. Além disso, para uma análise em 360°, acesse a estrutura da hHep1 Δ mts em forma de [vídeo](#).

Tal disparidade provavelmente decorre da remoção das regiões terminais nas variantes mutantes, o que resulta em alterações na conformação da proteína. Em particular, a remoção dessas regiões terminais é associada à emergência de uma alfa-hélice no núcleo proteico, como indicado pela seta vermelha na Figura 15A. Além disso, é possível identificar na Figura 15B que essa alfa-hélice não se faz presente na estrutura da hHep1 Δ mts. A presença dessa alfa-hélice no Core da proteína influencia substancialmente as características estruturais e, consequentemente, a predição da sua conformação espacial. Essas observações sugerem que os truncamentos introduzidos nos mutantes da hHep1 provocam essas modificações na estrutura do Core, no entanto por se tratar de um *software* de predição, é difícil inferir que isso realmente

aconteça. Dessa forma, é necessária a realização das caracterizações por meio de técnicas com acurácia bem estabelecida como as técnicas aqui utilizadas.

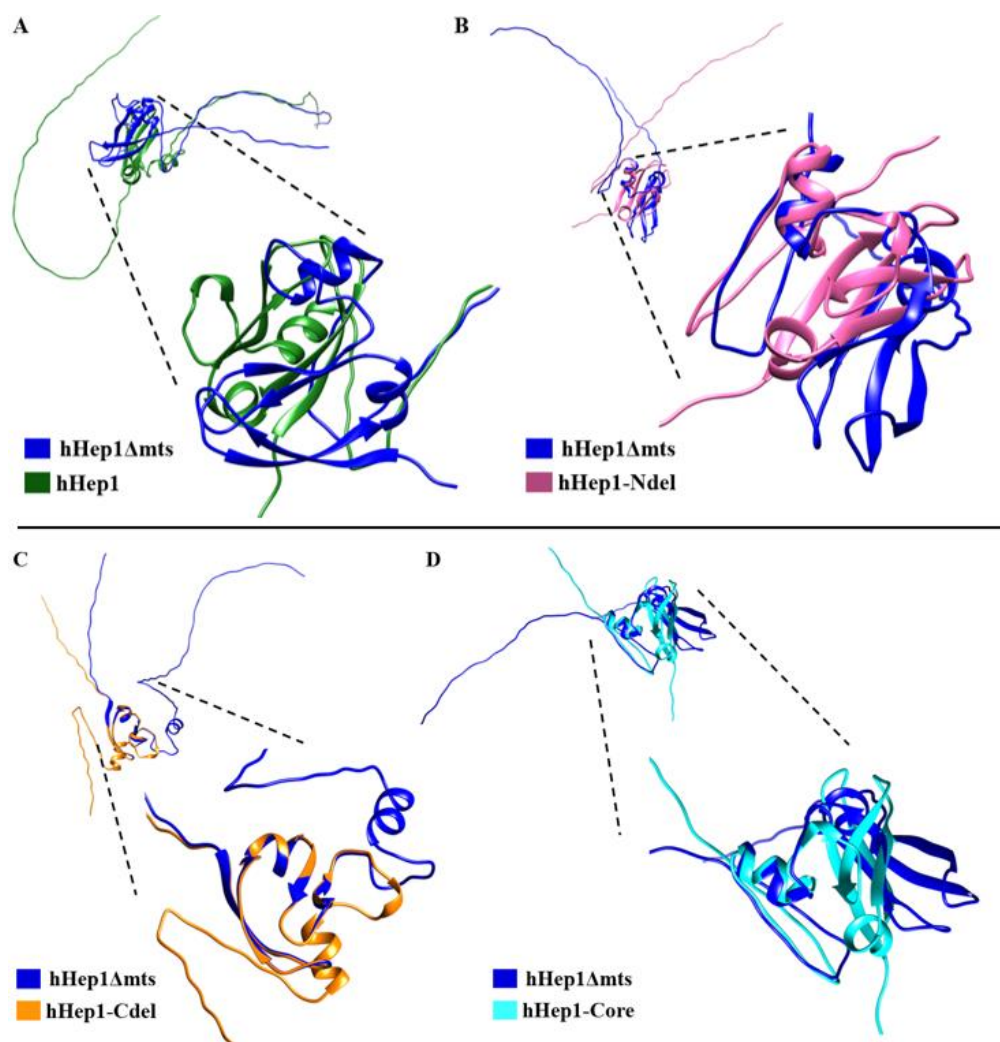


Figura 16. Alinhamento das estruturas hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core com a hHep1Δmts obtidas pelo software AlphaFold e realizado no Chimera.

Fonte: autoria própria.

4.2.2. Dicroísmo circular e Espectroscopia de emissão por fluorescência

O perfil da variação da elipticidade molar em função do comprimento de onda dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1Δmts é apresentado na Figura 17. Para fins comparativos, os espectros das proteínas recombinantes (Figura 17A), obtidos separadamente, foram sobrepostos, como é apresentado na Figura 17B. O espectro do mutante hHep1-Cdel (magenta) e a hHep1-Core (cinza) tiveram praticamente o mesmo perfil, o qual possui um sinal mínimo em 218 nm, indicando a presença de estruturas em folha- β . Também é possível notar um ombro em 210 nm e uma banda negativa de menor intensidade em 200 nm, que apontam a presença de estruturas hélices α e *random coils*, respectivamente.

Essa semelhança estrutural também foi avaliada para o mutante hHep1-Ndel (vermelho) e hHep1 Δ mts (azul), em que o espectro detém bandas mais negativas em 205-208 nm.

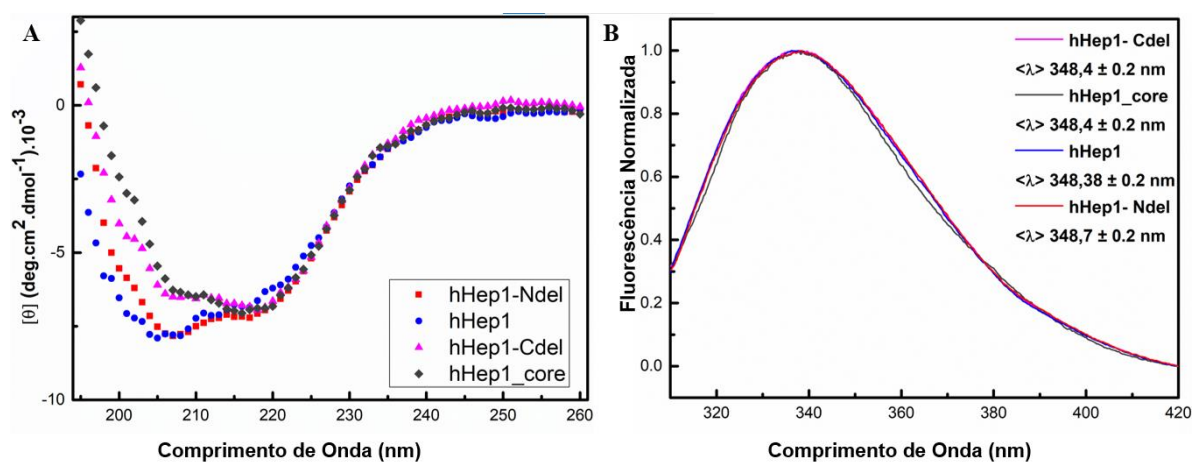


Figura 17. Caracterização estrutural das proteínas recombinantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1 Δ mts por espectropolarimetria de CD na janela de 260 a 195 nm.

(A) Espectros para cada uma das proteínas recombinantes. (B) Espectros das proteínas recombinantes sobrepostos.

Fonte: autoria própria.

Os dados obtidos nas medidas de espectropolarimetria de CD foram utilizados para realizar um cálculo de deconvolução, empregando o *software CDNN Deconvolution*, o qual é apresentado na Tabela 5. Para realizar a comparação entre os mutantes, vale ressaltar que essas análises são referentes a porcentagem de estrutura secundária, no entanto, por se tratar de proteínas recombinantes que foram truncadas, eles possuem quantidades de resíduos de aminoácidos divergentes (Tabela 2). A comparação dos dados na Tabela 5 indica uma diminuição de folhas β para o mutante hHep1-Ndel em relação à hHep1 Δ mts, indicando que a remoção do N-terminal colabora para esse decréscimo. Além disso, houve um aumento de estruturas Hélices α para esse mutante quando comparado com a hHep1 Δ mts. No entanto, a deconvolução sugere que a remoção das regiões N- e C- terminais não afetam significativamente a estrutura do Core.

Tabela 5. Comparativo entre a Deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD para os mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1 Δ mts.

Deconvolução dos sinais de espectropolarimetria de CD				
	hHep1 Δ mts (%)	hHep1-Ndel (%)	hHep1-Cdel (%)	hHep1-core(%)
Hélice α	9	13	11	11
Folhas β	36	28	32	35
Voltas	21	22	21	20
Random Coils	34	37	36	35

4.2.3. Cromatografia de exclusão por tamanho analítica (aSEC)

As propriedades hidrodinâmicas das proteínas hHep1-Core, hHep1-Cdel e hHep1 foram submetidas à avaliação por aSEC, cujo cromatograma resultante é apresentado na Figura 18. O

perfil observado revela picos localizados em 18 mL, 17 mL e 16 mL, correspondentes aos mutantes hHep1-Core, hHep1-Cdel e hHep1, respectivamente, sugerindo a presença de sistemas monodispersos em todos os casos. Por meio da construção de uma curva analítica com padrões de massa molecular (MM), foi possível determinar as massas moleculares aparentes (MM_{app}) para estas estruturas, resultando em valores de 19 ± 3 kDa, 25 ± 3 kDa e 39 ± 4 kDa, respectivamente. A relação entre os raios de sedimentação (RS) dos padrões moleculares em função de seus valores de $-\log(K_{AV} 1/2)$ permitiu a estimativa dos raios de sedimentação para a hHep1-Core de 20 Å, para a hHep1-Cdel de 23 Å, e para a hHep1 de 27 Å. Esses dados experimentais foram compilados na Tabela 6, juntamente com os dados teóricos para o raio hidrodinâmico de uma esfera de mesma massa molecular e densidade, calculados pelo *software* SEDNTERP.

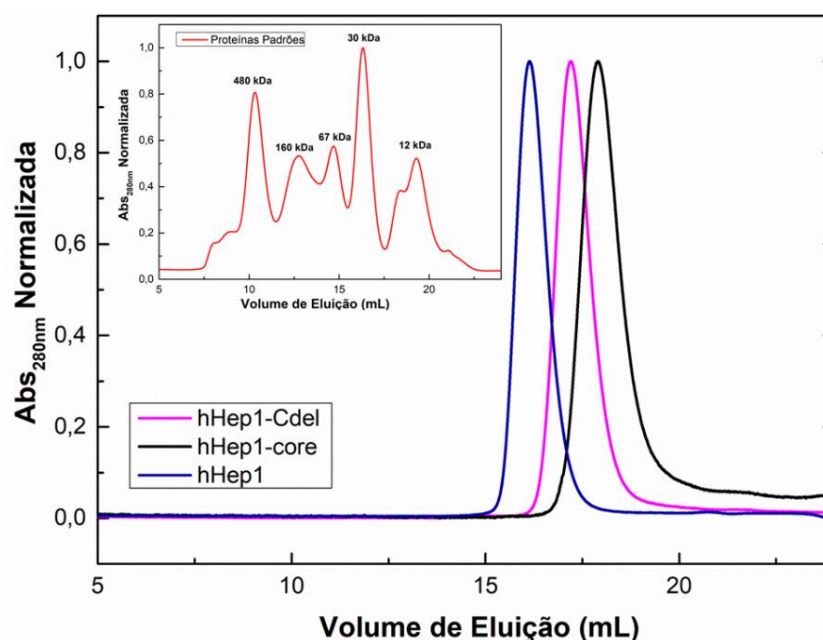


Figura 18. Cromatograma de aSEC, com ênfase no intervalo de eluição dos mutantes truncados. Na parte superior é indicado os volumes de eluição dos padrões de MM: apoferritina (480 kDa, 67Å), γ -globulina (160 kDa, 48 Å), BSA (67 kDa, 36 Å), anidrase carbônica (30 kDa, 24 Å) e citocromo c (12,3 kDa, 14 Å).
Fonte: autoria própria.

Tabela 6. Comparativo entre os dados hidrodinâmicos dos mutantes hHep1, hHep1-Core e hHep1-Cdel.

	Propriedades Hidrodinâmicas					
	<i>hHep1</i>	<i>hHep1-Core</i>	<i>hHep1-Cdel</i>	<i>hHep1</i>	<i>hHep1-Core</i>	<i>hHep1-Cdel</i>
		MM_{app} (kDa)			R_s (Å)	
Monômero	13,8	10,7	12,1	16,1	14,8	15,4
Experimental	39 ± 4	19 ± 3	25 ± 3	27 ± 1	20 ± 1	23 ± 1
<i>f/f₀</i>	-	-	-	$1,67 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,07$

A análise comparativa entre os dados teóricos obtidos através do *software* SEDNTERP e os dados experimentais provenientes da cromatografia de exclusão por tamanho (aSEC) revela que a massa molecular aparente (MM_{app}) determinada experimentalmente é maior do que a MM calculada para um monômero globular teórico, enquanto o valor do raio de sedimentação (RS) é superior ao de um monômero. Essas características hidrodinâmicas sugerem que os mutantes estão presentes predominantemente na forma monomérica, uma vez que a MM_{app} determinada não é suficientemente elevada para indicar a existência de um dímero. O maior valor de RS é justificado pelo cálculo do f/f_0 , que indica que a hHep1-Core é predominantemente monomérica e levemente alongada. Por sua vez, o mutante hHep1-Cdel é mais alongado em comparação com a hHep1-Core, mas ainda se mantém predominantemente monomérico, assim como a hHep1.

As análises hidrodinâmicas conduzidas por Dores-Silva *et al.* (2013) sugerem que a hHep1 Δ mts (contendo vicinais His tag) assume predominantemente uma conformação monomérica alongada em solução, com um fator de forma (f/f_0) de 1,4. A comparação desses resultados indica que a hHep1-Core possui uma estrutura tridimensional ligeiramente mais globular do que a hHep1 Δ mts, o que está em concordância com a ausência das regiões N e C-terminais, que foram truncadas. A eliminação da região C-terminal sugere que essa construção é menos compacta e globular do que a região desprovida de ambas as extremidades. É razoável inferir que o mutante hHep1-Ndel apresente um perfil mais alongado e semelhante à proteína completa. Esses dados, em conjunto, indicam que as regiões N- e C-terminais são flexíveis e não possuem uma estrutura organizada definida.

4.3. Análise da estabilidade

4.3.1. Estabilidade temporal

Os resultados das análises de integridade estrutural ao longo do tempo para os mutantes em estudo são apresentados na Figura 19. Na Figura 19A, é mostrado o perfil eletroforético da hHep1 Δ mts, evidenciando uma estabilidade temporal de até 72 h a 4°C. Essa mesma estabilidade é observada nos mutantes hHep1-Cdel, hHep1-Ndel e hHep1-Core (dados obtidos pela mestranda do grupo), indicando que na ausência de íons fosfato, essas proteínas não sofrem degradação significativa ao longo de 72 h.

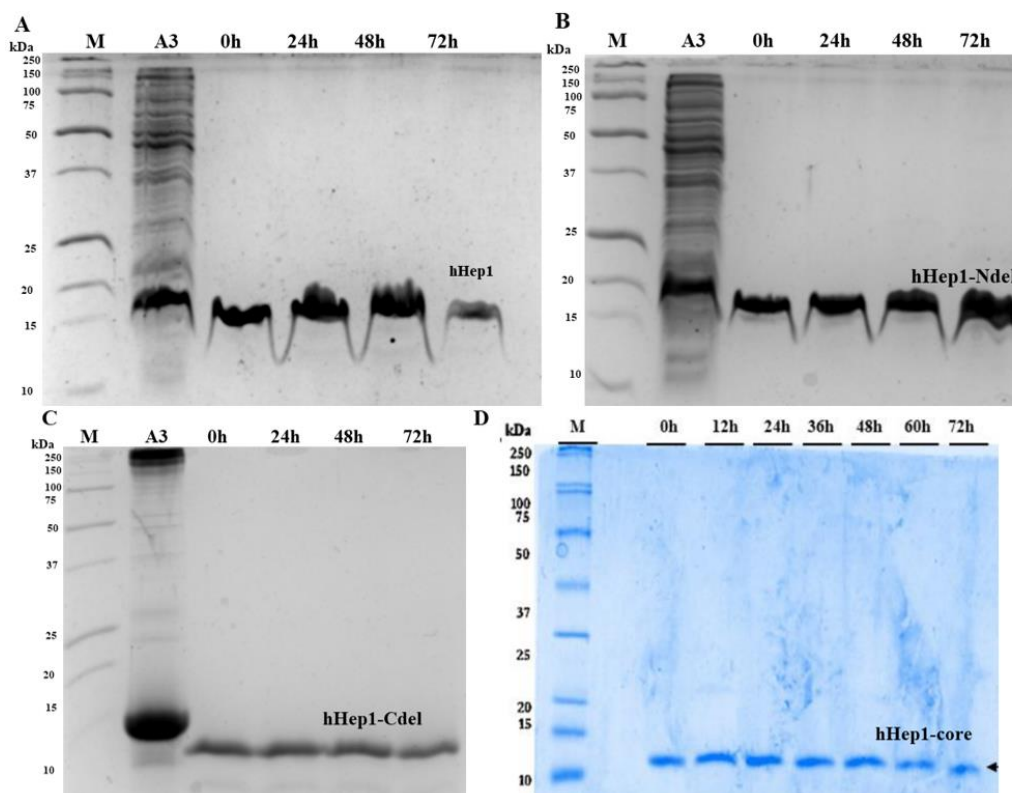


Figura 19. Avaliação da integridade estrutural dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-Core e a proteína hHep1Δmts em função do tempo.

(A) SDS-PAGE das amostras em comparação aos padrões de MM (M) eluato da primeira cromatografia de afinidade ao níquel (A3) para a proteína hHep1Δmts e a amostra após a exclusão molecular. Em (B) e (C) são as mesmas amostras para os mutantes hHep1-Ndel e hHep1-Cdel, respectivamente. (D) SDS-PAGE das amostras em comparação aos padrões de MM (M), de células não induzidas (NI) e induzidas (I) para o mutante hHep1-Core (dados representativos).

Fonte: (A), (B) e (C) de autoria própria, (D) adaptado de dados não publicados pelo grupo.

4.3.2. Estabilidade química

O perfil do processo de desnaturação dos mutantes da hHep1 foi avaliado na presença do agente caotrópico GndHCl e para a proteína hHep1 também foi avaliado na presença de ureia. Foram preparadas soluções estoque de ambos os agentes em tampão TK (pH 7,4). As concentrações foram aferidas pela variação na viscosidade da solução, verificada pelas mudanças nos índices refratários entre o tampão e a solução (Δn). A correlação entre o Δn e a concentração de GndHCl foi determinada por Pace, Shirley e Thomson (1989), descritas por:

$$[\text{GndHCl}] = 57,147(\Delta n) + 38,68(\Delta n)^2 + 91,60(\Delta n)^3$$

Amostras do mutante hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1 foram tratadas com concentrações crescentes do agente caotrópico GndHCl, com intervalos de 0,5 M. Para o experimento com GndHCl, aplicou-se um intervalo de 0 a 6 M, em que foi obtida a concentração média de transição (C_m) a fim de verificar a estabilidade química desta proteína

mutante. Para isso foram realizados experimentos na presença de concentrações crescentes de GndHCl, sobre a proteína, em que a excitação da sonda ocorreu em 295 nm.

As alterações estruturais causadas por cada concentração deste agente foram monitoradas pela variação no ambiente da sonda intrínseca do W115 por meio de análises de emissão de fluorescência. Foram analisados três aspectos: os espectros obtidos, o $\langle \lambda \rangle$ destes espectros e de seus $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão. Os perfis obtidos são apresentados na Figura 20, onde as curvas representadas em 1A são referentes aos espectros das proteínas para as concentrações 0 M (preto), 1,5 M (vermelho) e 6 M (azul) do agente caotrópico GndHCl.

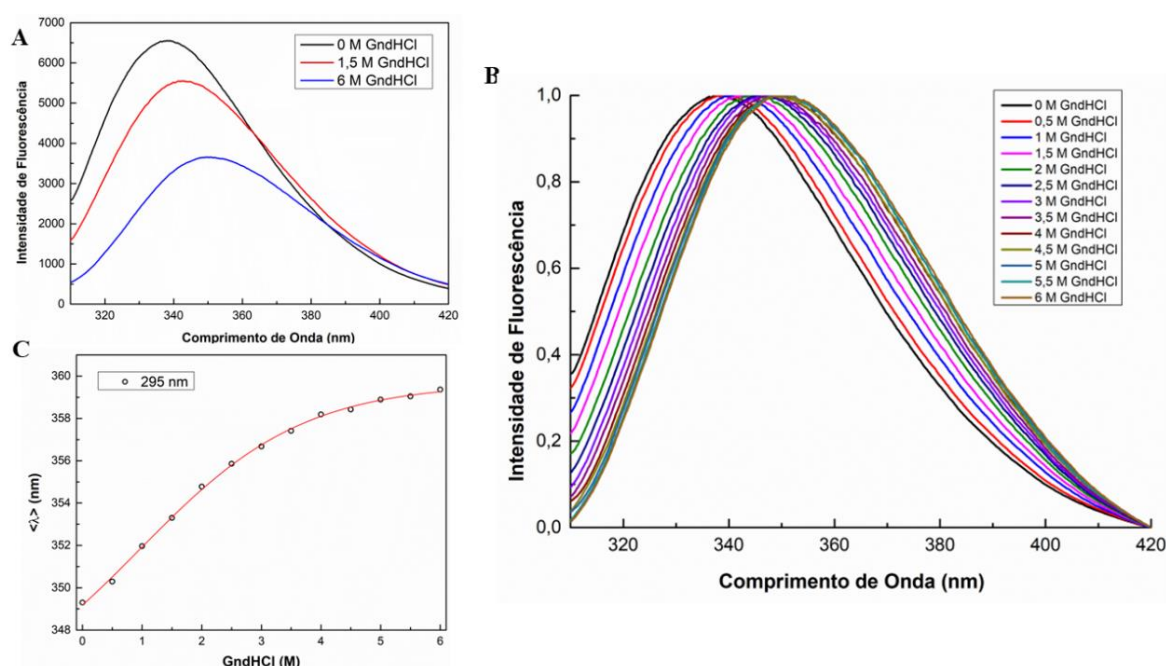


Figura 20. Avaliação da estabilidade química da hHep1-Ndel frente ao agente desnaturante GndHCl. Em (A) é apresentado o espectro de emissão de fluorescência para a proteína envelada (preto), na C_m do agente desnaturante (vermelho) e em concentração saturante (azul). Em (B) são mostrados os espectros normalizados para as concentrações crescentes de GndHCl. Em (C) são apresentadas as variações nos $\langle \lambda \rangle$ em função da concentração de GndHCl.

Fonte: autoria própria.

O perfil desses espectros indica que ocorre um deslocamento para maiores valores λ conforme há um aumento na concentração do agente desnaturante, concomitantemente, há uma diminuição na intensidade de fluorescência. Esse deslocamento também pode ser identificado na Figura 20B, em que com o aumento da concentração de GndHCl a sonda fluorescente está sendo exposta ao solvente e, por isso, sendo deslocada para o vermelho. O perfil da variação do $\langle \lambda \rangle$ em função das concentrações de GndHCl pode ser encontrado na Figura 20C. A partir dessa curva foi estimado a concentração média de transição de 1,4 M, por isso a representação do espectro da concentração 1,5 M em vermelho na Figura 1A. Por meio dessa curva, é possível

analisar que em concentrações acima de 3,5 M de GndHCl o $\langle\lambda\rangle$ dessa proteína manteve uma constância, indicando uma estabilização.

Nas Figuras 21A e B são comparados os espectros obtidos em três condições da hHep1-Core e hHep1-Cdel enovelada, na ausência de agente caotrópico; aproximadamente na C_m destes agentes, estimada empregando os dados de $\langle\lambda\rangle$; e na concentração máxima de agentes caotrópicos utilizadas. Os perfis dos espectros em diferentes concentrações mostram um deslocamento para maiores valores de λ conforme há o aumento nas concentrações do agente caotrópico. Esse perfil também foi observado para a hHep1-Ndel.

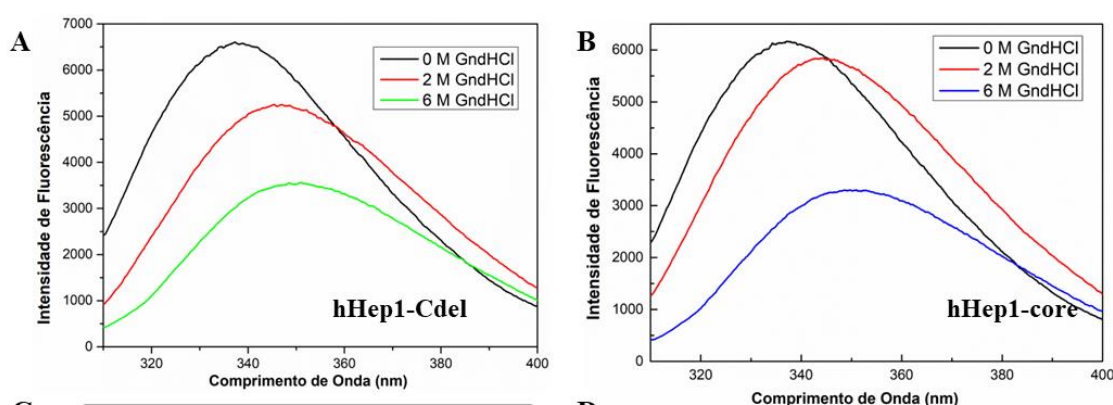


Figura 21. Avaliação da estabilidade química dos mutantes hHep1-Core e hHep1-Cdel frente ao agente desnaturante GndHCl.

Em (A) e (B) é apresentado o espectro de emissão de fluorescência para a proteína enovelada (preto), na C_m do agente desnaturante (vermelho) e em concentração saturante (verde e azul).

Fonte: autoria própria.

O perfil da variação da média do comprimento de onda ($\langle\lambda\rangle$) em relação às concentrações de GndHCl foi analisado para os mutantes hHep1-Cdel e hHep1-Core. Com base nessas curvas, foi estimada uma concentração média de transição de 1,5 M para a hHep1-Core e de 1,9 M para a hHep1-Cdel. Observou-se que em concentrações superiores a 3,5 M de GndHCl, o centro de massa espectral desses mutantes permaneceu estável, semelhante ao observado para a hHep1-Ndel, indicando estabilização e constância.

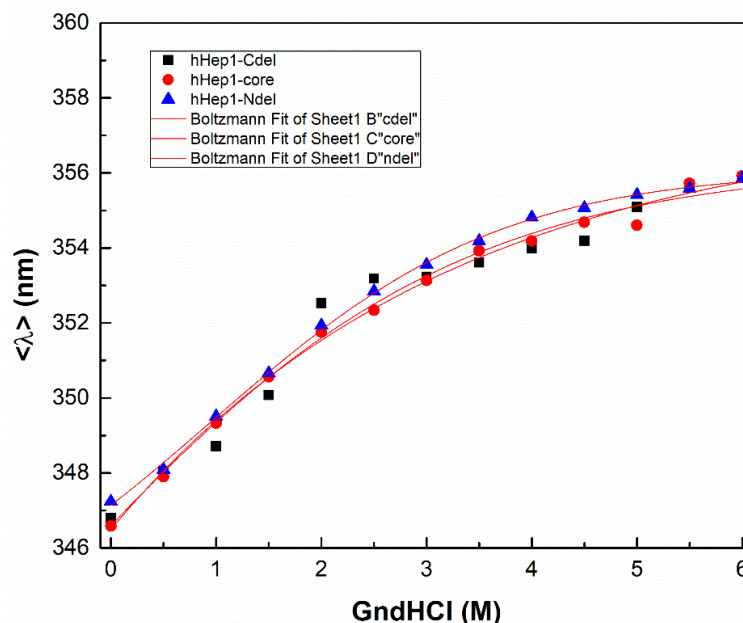


Figura 22. Curva do ajuste por Boltzmann das variações nos $\langle \lambda \rangle$ em função da concentração de GndHCl para os mutantes hHep1-Cdel, hHep1-Core e hHep1-Ndel sobrepostos.

Fonte: autoria própria.

Com o propósito de análise comparativa, os perfis de variação do parâmetro $\langle \lambda \rangle$ em função das concentrações de guanidina hidrocloreto (GndHCl) foram sobrepostos para os mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core, conforme ilustrado na Figura 22. A interpretação dos espectros resultantes sugere uma similaridade no processo de desnaturação desses mutantes. Entretanto, devido à natureza gradual dos perfis de variação do indicador $\langle \lambda \rangle$, a determinação precisa da concentração média na qual ocorre a desnaturação, representada pelo valor de C_m , não pôde ser realizada de forma conclusiva. Conseqüentemente, a caracterização detalhada da transição de desnaturação está sendo conduzida através da utilização do agente desnaturante ureia, embora os dados relacionados a essa abordagem ainda estejam em fase de análise e não tenham sido finalizados.

Essa abordagem complementar permitirá uma compreensão mais abrangente e precisa dos mecanismos de desnaturação química das proteínas em estudo. Esses resultados são fundamentais para uma análise aprofundada das propriedades estruturais e termodinâmicas dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core.

5. CONCLUSÃO

Os mutantes foram desenhados com regiões N- e C-terminais truncadas, bem como um mutante contendo apenas o domínio "dedo de zinco" (hHep1-Core), com o objetivo de identificar as principais regiões responsáveis por sua função. Experimentos foram realizados para analisar a estrutura secundária e terciária usando difração circular e espectroscopia de fluorescência, respectivamente. Os resultados indicaram similaridades estruturais entre hHep1-Ndel e hHep1 Δ mts, assim como entre hHep1-Cdel e hHep1-Core. Além disso, foi observada uma estabilidade temporal das proteínas por até 72 horas a 4°C, bem como sua estabilidade química frente ao agente desnaturante GndHCl, com valores de Cm de 1,4 M, 1,9 M e 1,5 M para hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-Core, respectivamente. As propriedades hidrodinâmicas dos mutantes foram determinadas por cromatografia de exclusão por tamanho analítica, evidenciando que todas as proteínas são monoméricas, com hHep1-Core mostrando uma estrutura mais globular em comparação com a estrutura completa. Esses resultados sugerem que os protocolos e condições utilizados são adequados para a expressão, purificação e caracterização dessas proteínas recombinantes, representando um avanço significativo nesta área de estudo.

Em virtude dos resultados apresentados, esta pesquisa obteve êxito significativos na expressão, purificação e caracterização estrutural dos mutantes truncados da proteína hHep1, abordando aspectos cruciais para a compreensão de sua estrutura e importância na manutenção da homeostase celular. Por meio de uma análise metódica das propriedades das proteínas recombinantes, englobando sua estabilidade temporal, estabilidade química e características hidrodinâmicas, foram delineados protocolos e condições ótimas para a condução desses experimentos. Os resultados obtidos não apenas enriquecem nossa compreensão acerca da estrutura da proteína hHep1, mas também representam um avanço científico significativo, com potencial para orientar futuras pesquisas nesta área de estudo. Consequentemente, é possível concluir que os achados deste estudo proporcionam uma base sólida para o contínuo progresso e a conclusão bem-sucedida desta linha de pesquisa, consolidando assim sua relevância e contribuição para o avanço do conhecimento em bioquímica e biologia molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, M. M. T.; SCHNAPP, G. Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In: **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, p. 411–432, 2007. doi:10.1016/b0-08-045044-x/00092-4

BLAMOWSKA, Marta. et al. ATPase Domain and Interdomain Linker Play a Key Role in Aggregation of Mitochondrial Hsp70 Chaperone Ssc1. **J. Biol. Chem.**, [S.L.], v. 285, n. 7, p. 4423-4431, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.061697>.

BLAMOWSKA, Marta; NEUPERT, Walter; HELL, Kai. Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone. **J. Cell. Biol.**, [S.L.], v. 199, n. 1, p. 125-135, 24 set. 2012. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201205012>.

BLATCH, G.; EDKINS, A. The Networking of Chaperones by Co-chaperones: Control of Cellular Protein Homeostasis. **Editora Blatch ISBN: 978-3-319-11730-0**. doi:10.1007/978-3-319-11731-7 (jan. de 2015).

BOHM, G., et al. Quantitative Analysis of Protein Far UV Circular Dichroism Spectra by Neural Networks. **Protein Eng.**, v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992.

BOLENDER, Natalia. et al. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. **EMBO Rep.**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 42-49, jan. 2008. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7401126>.

BORGES, Júlio C.; RAMOS, Carlos H.I. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Arch. Biochem. Bioph.**, [S.L.], v. 452, n. 1, p. 46-54, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.006>.

BREHMER, Dirk. et al. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. **Nat. Struct. Biol.**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 427-432, 1 maio 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/87588>.

BUKAU, Bernd; HORWICH, Arthur L. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. **Cell**, [S.L.], v. 92, n. 3, p. 351-366, fev. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80928-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80928-9).

BYWATER, R. P. Why twenty amino acid residue types suffice(d) to support all living systems. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0204883, 15 out. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0204883. PMID: 30321190; PMCID: PMC6188899.

CHACINSKA, Agnieszka. et al. Importing Mitochondrial Proteins: machineries and mechanisms. **Cell**, [S.L.], v. 138, n. 4, p. 628-644, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>.

CHATTERJEE, Suman; BURNS, Timothy F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: a promising therapeutic approach. **Int. J. Mol. Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 1978, 15 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091978>.

DAUGAARD, Mads; ROHDE, Mikkel; JÄÄTTELÄ, Marja. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **Febs Lett**, [S.L.], v. 581, n. 19, p. 3702-3710, 25 maio 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>.

DEOCARIS, Custer C.; KAUL, Sunil C.; WADHWA, Renu. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. **Cell Stress Chaperones**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 116, 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1379/csc-144r.1>.

DORES-SILVA, P. R. et al. 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**, [S.L.], v. 182, p. 772-784, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.048>.

DORES-SILVA, P.R. et al. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein – Hep1 – of *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Biol. Macromol**, [S.L.], v. 79, p. 903-912, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.042>.

DORES-SILVA, P.R. et al. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: an essential mortalin co-chaperone. **Int. J. Biol. Macromol**, [S.L.], v. 56, p. 140-148, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.009>.

EVANS, Christopher G.; CHANG, Lyra; GESTWICKI, Jason E.. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug

GOSWAMI, Arvind Vittal; CHITTOOR, Balasubramanyam; D'SILVA, Patrick. Understanding the Functional Interplay between Mammalian Mitochondrial Hsp70 Chaperone Machine Components. **J. Biol. Chem**, [S.L.], v. 285, n. 25, p. 19472-19482, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.105957>

HARTL, F. Ulrich; BRACHER, Andreas; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, [S.L.], v. 475, n. 7356, p. 324-332, jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10317>.

<http://dx.doi.org/10.1021/jm100054f>

JIN, Jinghua. et al. Proteomic Identification of a Stress Protein, Mortalin/mthsp70/GRP75. **Mol. Cell. Proteomics**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. 1193-1204, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.m500382-mcp200>.

JUMPER, J., EVANS, R., PRITZEL, A. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature** **596**, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

KAMPINGA, Harm H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 105-111, 29 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>.

KAMPINGA, Harm H.; CRAIG, Elizabeth A.. The HSP70 chaperone machinery: j proteins as drivers of functional specificity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 579-592, ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2941>.

KANG, Pil-Jung. et al. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. **Nature**, [S.L.], v. 348, n. 6297, p. 137-143, nov. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/348137a0>.

KARLIN, Samuel; BROCCIERI, Luciano. Heat Shock Protein 70 Family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. **J. Mol. Evol.**, [S.L.], v. 47, n. 5, p. 565-577, nov. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/pl00006413>.

KIM, Taek-Keun. et al. Heat shock protein 70-1A is a novel angiogenic regulator. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, [S.L.], v. 469, n. 2, p. 222-228, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.125>.

KIM, Yujin E. et al. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. **Annu. Rev. Biochem.**, [S.L.], v. 82, n. 1, p. 323-355, 2 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>.

KIRALY, Vanessa T.R. et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. **Int. J. Biol. Macromol.**, [S.L.], v. 146, p. 320-331, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.236>.

KUMAR, Sanjay. et al. Targeting Hsp70: a possible therapy for cancer. **Cancer Lett.**, [S.L.], v. 374, n. 1, p. 156-166, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>.

LACKIE, R. E. et al. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. **Front. Neurosci.**, v. 11, n. MAY, p. 1–23, 2017.

LARBURU, Natacha. et al. Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response. **Open Biol. J.**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 200089, ago. 2020. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200089>.

LEE, Jehan. et al. Insertion and Deletion Mutagenesis by Overlap Extension PCR. **Methods Mol. Biol.**, [S.L.], p. 137-146, 2010. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8_10.

LIBEREK, Krzysztof; LEWANDOWSKA, Agnieszka; ZIĘTKIEWICZ, Szymon. Chaperones in control of protein disaggregation. **EMBO J.**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 328-335, 23 jan. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601970>.

LONDONO, Carolina. et al. Mortalin, Apoptosis, and Neurodegeneration. **Biomolecules**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 143-164, 1 mar. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom2010143>.

MACHIUS, M., et al. Structural biology: a high-tech tool for biomedical research. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 12, n. 4, p. 431-438, jul. 2003. doi: 10.1097/00041552-200307000-00012. PMID: 12815340.

MATTOS, Eduardo P. de. et al. Protein Quality Control Pathways at the Crossroad of Synucleinopathies. **J. Parkinsons Dis.**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 369-382, 3 abr. 2020. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jpd-191790>.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.**, [s.l.], v. 62, n. 6, p. 670-684, mar. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>.

MOMOSE, Takaki. et al. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. **EMBO Rep**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 664-670, 15 jun. 2007. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400990>.

MURPHY, M. E.. The HSP70 family and cancer. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1181-1188, 4 abr. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgt111>.

MILENE N.O. MORITZ et al. Human HSP70-escort protein 1 (hHep1) interacts with negatively charged lipid bilayers and cell membranes, **Cell Stress and Chaperones**, Volume 28, Issue 6, 2023, Pages 1001-1012, ISSN 1355-8145, <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01394-1>.

NELSON, D. L. L.; NELSON, A. L. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**; 8428214107; Cox, Michael M.: 2006.

NEUPERT, Walter; BRUNNER, Michael. The protein import motor of mitochondria. **Nat. Rev. Mol Cell Biol**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 555-565, ago. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm878>.

NYAKUNDI, David O. et al. Plasmodium falciparum Hep1 Is Required to Prevent the Self Aggregation of PfHsp70-3. **PloS One**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 0156446, 2 jun. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156446>.

OLIVEIRA, C., DOMINGUES, L. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, p. 81–92, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>

POLISSI, Alessandra; GOFFIN, Laurence; GEORGOPOULOS, Costa. The Escherichia coli heat shock response and bacteriophage λ development. **FEMS Microbiol. Rev**, [S.L.], v. 17, n. 1-2, p. 159-169, ago. 1995. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00198.x>.

RADONS, Jürgen. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?. **Cell Stress Chaperones**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 379-404, 10 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>.

RITOSSA, F.. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 571-573, dez. 1962. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02172188>.

ROUX, Kyle J. et al. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. **J. Cell. Biol**, [S.L.], v. 196, n. 6, p. 801-810, 12 mar. 2012. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201112098>.

SANTORO, M.Gabriella. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem. Pharmacol**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 55-63, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00299-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00299-3).

SICHTING, Martin. et al. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. **EMBO J**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 1046-1056, 17 fev. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600580>.

SILVA, Kelly P. da; BORGES, Julio C.. The Molecular Chaperone Hsp70 Family Members Function by a Bidirectional Heterotrophic Allosteric Mechanism. **Protein Pept. Lett.**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 132-142, 1 fev. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986611794475057>.

SZKLARZ, Luiza K. Sanjuán, et al., Inactivation of the Mitochondrial Heat Shock Protein Zim17 Leads to Aggregation of Matrix Hsp70s Followed by Pleiotropic Effects on Morphology and Protein Biogenesis. **J. Mol. Biol.**, [S.L.], v. 351, n. 1, p. 206-218, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.068>.

Target. **J. Med. Chem.**, [S.L.], v. 53, n. 12, p. 4585-4602, 24 jun. 2010. American Chemical Society (ACS).

THOMSON JA, SHIRLEY BA, GRIMSLEY GR, PACE CN. Conformational stability and mechanism of folding of ribonuclease T1. **J Biol Chem.** 1989 Jul 15;264(20):11614-20. PMID: 2745409.

VU, Michael T. et al. The DNLZ/HEP zinc-binding subdomain is critical for regulation of the mitochondrial chaperone HSPA9. **Protein Sci**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 258-267, 4 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2012>.

WITKIN, S. S.; KANNINEN, T. T.; SISTI, G. The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function. v. 222, p. 117–127, 2017.

ZHAI, Peng. et al. A conserved histidine in human DNLZ/HEP is required for stimulation of HSPA9 ATPase activity. **Biochem. Bioph. Res. Commun**, [S.L.], v. 408, n. 4, p. 589-594, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.066>.

ZHAI, Peng. et al. The Human Escort Protein Hep Binds to the ATPase Domain of Mitochondrial Hsp70 and Regulates ATP Hydrolysis. **J. Biol. Chem.**, [S.L.], v. 283, n. 38, p. 26098-26106, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m803475200>.

ZHEYING SUN, ROY J. BLACKBURN, LAURA J. BLAIR, AND J. K. I. Hsp70-Family Proteins and Neurodegenerative Diseases. **Book HSP70 in Human Diseases and Disorders**, v. 14, p. 205–222, 2018.