

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Karine Minari

Estudos comparativos da interação de Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina e caracterização da Aha4 de *Plasmodium falciparum*

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Karine Minari

Estudos comparativos da interação de Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina e caracterização da Aha4 de *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos
2018




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular


Folha de Aprovação

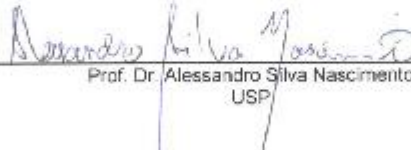
Assinaturas dos membros de comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Kanne Minari, realizada em 31/07/2018:


Prof. Dr. Julio Cesar Borges
USP


Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes
UFSCar


Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar


Profa. Dra. Ana Paula Uliari de Araújo
USP


Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento
USP

Dedico este trabalho aos meus pais Walda e Alfredo por me ajudarem a alçar voos cada vez mais altos, mas sempre mostrando que há um porto seguro onde pousar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Júlio César Borges pela oportunidade que tive de realizar a iniciação científica e, posteriormente, o doutorado em seu grupo de pesquisa. Agradeço imensamente as oportunidades, ensinamentos, disponibilidade e sua dedicação a minha formação durante todos estes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida através do Processo FAPESP 2013/25646-0. Também pelo auxílio financeiro oriundo dos processos 2011/23110-0, 2012/50161-8, 2014/07206-6 e 2017/07335-9.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do processo 471415/2013-8. Também agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv).

Ao Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos, também à Central de Análises Químicas Instrumentais e ao Prof. Dr. Marcel Tabak por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a conclusão do trabalho.

Ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto) por fornecer a estrutura necessária aos experimentos de RMN.

Ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas- SP), pela estrutura disponibilizada para realizarmos as coletas de SAXS.

Aos professores Dr. Alessandro Nascimento e Dr. Fernando Melo por contribuírem de forma significativa com alguns dos resultados deste trabalho. Sendo assim, também agradeço a aluna Érika Chang pelo auxílio na parte das dinâmicas moleculares. Agradeço também ao Dr. Fábio Moraes pela ajuda tanto na parte experimental quanto na análise de dados da ressonância magnética nuclear.

Aos meus pais Walda e Alfredo, que sempre tentam me guiar pelo melhor caminho. Obrigada por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Palavras de agradecimento nunca serão suficientes.

Ao meu irmão Victor, pelo apoio, amizade, preocupação e companheirismo de sempre.

Aos alunos mais antigos do grupo, em especial ao Dr. Paulo Roberto, por me dar suporte do primeiro ao último dia de LBBP, mesmo que o resultado disto tenha sido o

fim da minha ingenuidade (haha). Agradeço também à Amanda Coto, pela amizade, conselhos sinceros nos melhores e piores dias, por todo apoio e ajuda. Ao Dr. Thiago Seraphim pela ajuda na parte experimental e, principalmente, pelo companheirismo no melhor congresso de todos os tempos. Marcella Paganelli, você também fez a diferença em vários momentos. Obrigada por se fazer presente quando eu precisava.

Agradeço também à Vanessa Kiraly, por ter aparecido e tornado alguns dias inesquecíveis. Obrigada pela disponibilidade e pela imensa ajuda com os experimentos em todos os momentos em que precisei. Agradeço também ao Sérgio Ramos, pelas ótimas jantas, por todas as ajudas tecnológicas e pela paciência com a minha exclusão digital. Marcela Torricillas, obrigada por sua generosidade e por toda a ajuda nos experimentos.

Agradeço também aos atuais membros do LBBP: Noeli, Laudimir, Nicole, Arthur, Louis, Leonardo e Carlos. Cada um de vocês contribuiu direta ou indiretamente com esse trabalho.

Ao Cleyton Nascimento Makara, por ter me encontrado no momento certo e mudado algumas das minhas visões de mundo. Obrigada por me ajudar a manter a fé nas oportunidades, pelo carinho, suporte, incentivo e companheirismo.

RESUMO

As Hsp90 (do inglês “*heat shock protein of 90 kDa*”) estão entre as proteínas mais abundantes nas células não submetidas a estresses. Elas interagem com proteínas que não estão no estado nativo, corrigindo o seu enovelamento incorreto, participam de vias de transdução de sinal, apoptose e também estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento celular, maturação e ativação de proteínas, entre outras. Em protozoários como *Plasmodium falciparum* e *Leishmania braziliensis*, as Hsp90 participam do crescimento, desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência dos parasitas. Deste modo, elas tornam-se alvos atrativos para o tratamento de doenças como malária, leishmaniose e câncer. As Hsp90s não atuam sozinhas e estão envolvidas em uma rede complexa com outras proteínas, principalmente as co-chaperonas. A proteína Aha (*Activator of the Hsp90-ATPase Activity*) é uma co-chaperona que ativa a atividade ATPásica da Hsp90. Ela é composta por dois domínios canônicos localizados no N-terminal e C-terminal, respectivamente, que se ligam nas interfaces do dímero de Hsp90. Esta interação também é alvo para o tratamento de doenças. Os objetivos do primeiro capítulo deste trabalho foram realizar um estudo comparativo para caracterizar a interação das proteínas Hsp90 de *S. cerevisiae*, *L. braziliensis*, *P. falciparum*, *Saccharum* sp. e isoformas α e β humanas com os nucleotídeos adenosina ATP e ADP através de calorimetria de titulação isotérmica, ressonância magnética nuclear e dinâmica molecular. A avaliação da atividade ATPásica das proteínas Hsp90 de *P. falciparum* e *L. braziliensis*, bem como a avaliação da inibição da mesma por inibidores clássicos de Hsp90 (geldanamicina e radicicol) também foi realizada. Paralelamente, a proteína PfAha4 (Aha tipo 4 de *P. falciparum*), foi estudada, e foram realizados estudos estruturais como espectropolarimetria de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, ultracentrifugação analítica e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (mostrados no capítulo 2 desta tese). Para a os ensaios de interação, foram realizados experimentos de ITC para testar a interação dela com a proteína Hsp90 de *P. falciparum* (PfHsp90). Os experimentos mostraram que o modo de interação das Hsp90 com ATP e ADP são diferentes, provavelmente devido aos microestados que os ligantes experimentam no sítio de interação. Deste modo, apesar da alta similaridade de sequências de que estas proteínas apresentam, a inibição seletiva pode ser alcançada. Para a PfAha4, que é composta pelo domínio C-terminal canônico das Ahas, os resultados mostraram que ela apresenta

propriedades similares com outras Ahas. Ela é um monômero globular em solução e interage com alta afinidade com a PfHsp90 com estequiometria de 2:1.

ABSTRACT

Hsp90 (heat shock protein of 90 kDa) are among the most abundant proteins in non-stressed cells. They interact with proteins that are not in the native state, correcting their incorrect folding, they participate in signal transduction pathways, apoptosis and they are also involved in cell growth and development, protein maturation and activation, among others. In protozoa such as *Plasmodium falciparum* and *Leishmania braziliensis*, Hsp90 participate in the growth, development, differentiation and survival of the parasites. In this way, they become attractive targets for treatment of diseases such as malaria, leishmaniasis and cancer. Hsp90 do not act alone because they are involved in a complex network with other proteins, especially the co-chaperones. Aha protein (Activator of the Hsp90-ATPase Activity) is a co-chaperone that activate the ATPase activity of Hsp90, which is composed by two canonical domains localized at the N- and C-terminus, respectively, binding at the chaperone dimer interfaces. This interaction is also targeted for the treatment of diseases. The objectives of the first chapter of this work were to perform a comparative study to characterize the interaction of yeast, *L. braziliensis*, *P. falciparum*, sugarcane and human α and β isoforms with nucleotides adenosine ATP and ADP by isothermal titration calorimetry, nuclear magnetic resonance and molecular dynamics. The estimation of the ATPase activity of the Hsp90 proteins of *P. falciparum* and *L. braziliensis*, as well as the evaluation of the inhibition of Hsp90 by classical inhibitors of Hsp90 (geldanamycin and radicicol) were also performed. In parallel, for PfAha4 protein (Aha type 4 of *P. falciparum*), structural studies such as circular dichroism spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, analytical ultracentrifugation and small angle X-ray scattering (SAXS) were performed (shown in chapter 2 of this thesis). For the interaction characterization, ITC experiments were performed in order to test the PfAha4 interaction with *P. falciparum* Hsp90 protein (PfHsp90). The experiments showed that the mode of interaction of Hsp90 with ATP and ADP are different, probably due to the microstates that the binders experience at the interaction site. Thus, despite the high sequence similarity of these proteins, selective inhibition can be achieved. For PfAha4, which is composed by the canonical C-terminal Aha domain, the results showed that it has similar properties with other Ahas. It is a globular monomer in solution and showed high affinity for PfHsp90 in a stoichiometry of 2:1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Esquema representativo da estrutura geral de uma Hsp90.	5
Figura 2- Estruturas conformacionais da Hsp90.	6
Figura 3- Ciclo biológico do <i>P. falciparum</i>	8
Figura 4 - Interação de GA e radicicol no sítio de ligação de nucleotídeos da Hsp90 de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 5- Fluxograma representativo das etapas de expressão, purificação e ensaios para caracterização estrutural e de interação das proteínas com nucleotídeos adenosina.	17
Figura 6 - Alinhamento das proteínas Hsp90 de <i>L. braziliensis</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , isoformas α e β humanas e <i>Saccharum sp.</i>	27
Figura 7 - Cromatogramas das eluições na coluna de cromatografia de exclusão molecular das proteínas e os DNTs	29
Figura 8 - SDS-PAGE das frações das purificações das proteínas.	30
Figura 9 - Análise da estrutura secundária por espectropolarimetria de dicroísmo circular.	31
Figura 10- Espectroscopia de fluorescência das proteínas	33
Figura 11 - Isotermogramas obtidos através da calorimetria de titulação isotérmica para diferentes proteínas.....	35
Figura 12- Assinaturas termodinâmicas das proteínas e DNTs com os nucleotídeos adenosina ATP e ADP.....	43
Figura 13 - Mapa de interação das interações entre os nucleotídeos adenosina e as proteínas LmHsp90N e hHsp90 α N.	46
Figura 14 - Avaliação da ligação de ATP e ADP com as proteínas hHsp90 β N, yHsp82N e LbHsp90N por RMN.	48
Figura 15- Energias de interação computadas entre os complexos por dinâmica molecular.	53
Figura 16- Regiões de entropia desfavorável para a yHsp82N	55
Figura 17- Mobilidade do ligante no local de interação dos nucleotídeos durante o tempo de simulação.	56
Figura 18- Principais interações das proteínas com os ligantes ADP e ATP durante as simulações de dinâmica molecular.	56
Figura 19- Gráficos do RMSD para os ligantes versus energia de ligação.	58
Figura 20- Atividade ATPásica das proteínas PfHsp90 e LbHsp90	59

Figura 21- Inibição das proteínas por GA	61
Figura 22- Inibição das proteínas por radicicol	62
Figura 23- O heterocomplexo foldossoma	65
Figura 24- Estrutural tridimensional da PfAha4 (PDB ID 3NI8), PfAha2 (PDB ID 3N72) e yAha1 (PDB ID 1USU).	67
Figura 25- Representação esquemática de como as proteínas yAha1, yAha3, PfAha2 e PfAha4 são estruturalmente organizadas.....	73
Figura 26- Alinhamento de sequência entre as proteínas utilizando o programa <i>Clustal omega</i>	74
Figura 27- Cromatograma da purificação da PfAha4.....	76
Figura 28- SDS-PAGE 15% da purificação da PfAha4	76
Figura 29- Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular no UV distante... 77	
Figura 30 - Estrutural tridimensional da PfAha4 (PDB ID 3NI8).....	78
Figura 31- Avaliação da estrutura terciária por espectroscopia de fluorescência para a proteína PfAha4.....	78
Figura 32- Desnaturação térmica da PfAha4 monitorada por dicroísmo circular.....	80
Figura 33- Ultracentrifugação analítica da PfAha4.....	81
Figura 34- Análise de dados de SAXS da PfAha4	82
Figura 35- Interação entre a PfAha4 e a PfHsp90 por ITC.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plasmídeos utilizados para a obtenção das proteínas recombinantes.....	15
Tabela 2 - Condições de indução para as diferentes proteínas	15
Tabela 3 -Condições experimentais detalhadas das titulações das proteínas completas e DNTs com ATP	21
Tabela 4 -Condições experimentais detalhadas das titulações das proteínas completas e DNTs com ADP	21
Tabela 5 - Referências das estruturas usadas para as análises de dinâmica molecular ..	24
Tabela 6 - Análise comparativa dos parâmetros encontrados pelo <i>Sednterp</i> para as proteínas.	26
Tabela 7- Identidade de sequências entre as Hsp90 de diferentes organismos.	28
Tabela 8 - Identidade de sequências do DNT da Hsp90 de <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i> e isoforma β humana.....	28
Tabela 9 – Resultados da deconvolução dos espectros de CD.	32
Tabela 10- Espectroscopia de fluorescência para as proteínas na ausência de Gnd-HCl com excitação em 280 nm	34
Tabela 11 - Espectroscopia de fluorescência para as proteínas na presença de 5 M de Gnd-HCl com excitação em 280 nm.	34
Tabela 12- Parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica para as interações das diferentes proteínas com ATP.....	41
Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica para as interações das diferentes proteínas com ADP	42
Tabela 14- Sinais de magnetização obtidos nos experimentos de ressonância magnética nuclear.	50
Tabela 15 - Sinais de magnetização obtidos nos experimentos de ressonância magnética nuclear para as proteínas hHsp90 α , hHsp90 β , LbHsp90 e yHsp82	51
Tabela 16- Média das energias de interação computadas pelo MMPBSA.py.	54
Tabela 17- Número de moléculas de água encontradas na primeira e segunda camada de solvatação dos ligantes que estão interagindo nos DNTs das Hsp90 ortólogas.	54
Tabela 18 - Parâmetros cinéticos obtidos através dos ensaios de atividade ATPásica para as proteínas LbHsp90 e PfHsp90.....	59
Tabela 19 - Parâmetros cinéticos obtidos através de diferentes ensaios de atividade ATPásica para Hsp90 de diferentes organismos.	60

Tabela 20- Identidade de sequências entre as proteínas PfAha4, PfAha2, yAha1 e yAha3.	73
Tabela 21- Parâmetros encontrados pelo <i>Sednterp</i> para a proteína PfAha4.....	75
Tabela 22- Valores de λ_{MAX} e $\langle\lambda\rangle$ observados para a PfAha4 na espectroscopia de fluorescência.....	79
Tabela 23- Parâmetros termodinâmicos da interação entre a PfAha4 e a PfHsp90 em diferentes temperaturas.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E	Coeficiente de extinção molar, em $M^{-1}.cm^{-1}$
λ_{max}	Comprimento de onda máximo, em nanômetros
$[\theta]$	Elipticidade molar residual
$\langle\lambda\rangle$	Centro de massa espectral, em nanômetros
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros (10^{-6} L)
μM	Micromolar (10^{-6} M)
ADP	Difosfato de adenosina, do inglês “ <i>adenosine di-phosphate</i> ”
Aha	Proteína ativadora da atividade ATPásica da Hsp90, do inglês “ <i>activator of Hsp90 ATPase</i> ”
ATP	Trifosfato de adenosina, do inglês “ <i>adenosine tri-phosphate</i> ”
AUC	Ultracentrifugação analítica, do inglês “ <i>analytical ultracentrifugation</i> ”
CD	Dicroísmo circular, do inglês “ <i>circular dichroism</i> ”
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
Cm	Concentração média de agente desnaturante
D.O.	Densidade óptica
DNT	Domínio N-terminal
f/f_0	Razão entre o coeficiente friccional experimental e o coeficiente friccional de uma esfera rígida de igual massa molecular da proteína de interesse
Gnd-HCl	Cloridrato de guanidina
hHsp90	Hsp90 de <i>Homo sapiens</i>
Hsp	Proteína de choque térmico, do inglês “ <i>heat shock protein</i> ”
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica; do inglês “ <i>isothermal titration calorimetry</i> ”
K_A	Constante de associação
K_D	Constante de dissociação
kDa	Quilodalton, equivalente a mil daltons

K_M	Constante de Michaelis-Menten
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LbHsp90	Hsp90 de <i>Leishmania braziliensis</i>
MM	Massa molecular
MM_{app}	Massa molecular aparente
N	Estequiometria de reação em experimentos de calorimetria de titulação isotérmica
PfHsp90	Hsp90 de <i>Plasmodium falciparum</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, do inglês “ <i>small angle X-ray scattering</i> ”
STD	Diferença de transferência de saturação, do inglês “ <i>Saturation transfer difference</i> ”
ScHsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa de <i>Saccharum sp.</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> ”
T_M	Temperatura média de transição
U.A.	Unidade arbitrária
yHsp82	Hsp90 de <i>S. cerevisiae</i>
ΔC_{papp}	Variação da capacidade calorífica aparente
ΔH_{app}	Variação de entalpia aparente
ΔS_{app}	Variação de entropia aparente
ΔT_{app}	Variação de temperatura aparente

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
CAPÍTULO 1: Interação das proteínas Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina	4
1.1 INTRODUÇÃO	4
1.1.1 CHAPERONAS MOLECULARES	4
1.1.2 Hsp90	4
1.1.3 Malária	7
1.1.4 Leishmaniose	9
1.1.5 Câncer e inibidores de Hsp90	10
1.2 OBJETIVOS GERAIS	12
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1.4 MATERIAL E MÉTODOS	13
1.4.1 Bioinformática	13
1.4.2 Expressão e purificação para os ensaios de calorimetria	14
1.4.3 Purificação para os ensaios de atividade ATPásica	17
1.4.4 Quantificação das proteínas	18
1.4.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular no UV distante.....	18
1.4.6 Espectroscopia de fluorescência	19
1.4.7 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica	19
1.4.8 Mapas de interação.....	22
1.4.9 Experimentos de STD-RMN.....	23
1.4.10 Simulações de dinâmica molecular.....	24
1.4.11 Ensaios de atividade ATPásica para a LbHsp90 e PfHsp90.....	25
1.4.12 Inibição da atividade ATPásica por GA e radicicol.....	25
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
1.5.1 Bioinformática	26

1.5.2	Expressão e purificação	28
1.5.3	Espectropolarimetria de dicroísmo circular	31
1.5.4	Espectroscopia de fluorescência	32
1.5.5	Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica	35
1.5.6	Mapas de interação (<i>Ligplot</i>)	44
1.5.7	Avaliação das interações através de STD- RMN.....	46
1.5.8	Simulações de dinâmica molecular	52
1.5.9	Atividade ATPásica	58
1.5.10	Atividade ATPásica da PfHsp90 e LbHsp90.....	58
1.5.11	Inibição das atividades ATPásicas por GA.....	60
1.5.12	Inibição das atividades ATPásicas por radicicol.....	62
1.6	CONCLUSÕES	63
CAPÍTULO 2: Caracterização estrutural da Aha4 de <i>Plasmodium falciparum</i> .		64
2.1	INTRODUÇÃO	64
2.1.1	Co-chaperonas da Hsp90	64
2.1.2	Proteínas Aha	66
2.2	OBJETIVO GERAL	67
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	68
2.4.1	Bioinformática	68
2.4.2	Expressão e purificação	68
2.4.3	Espectropolarimetria de dicroísmo circular	69
2.4.4	Espectroscopia de fluorescência	69
2.4.5	Desnaturação térmica	70
2.4.6	Desnaturação química por cloridrato de guanidina.....	70
2.4.7	Desnaturação química por ureia.....	71
2.4.8	Experimentos de ultracentrifugação analítica	71
2.4.9	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	71
2.4.10	Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica	72
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
2.5.1	Análises de sequência	72
2.5.2	Expressão e purificação	75

2.5.3	Dicroísmo circular no UV distante	77
2.5.4	Espectroscopia de fluorescência	78
2.5.5	Desnaturação térmica	79
2.5.6	Experimentos de ultracentrifugação analítica	80
2.5.7	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	81
2.5.8	Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica	83
2.6	CONCLUSÕES	84
2.7	REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO 1: Interação das proteínas Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 CHAPERONAS MOLECULARES

As proteínas são as moléculas mais abundantes e versáteis da natureza, possuindo diversas funções: podem ser hormônios, enzimas, receptores, catalisadores de reações, transportadores, elementos estruturais, entre outras. Porém, para o seu correto funcionamento, devem alcançar a sua estrutura nativa, que é representada pelo conjunto de conformações que coexistem em um equilíbrio sob determinadas condições. Uma vez que essa estrutura não é atingida (através de diferentes tipos de estresses: térmico, por radiação e mudanças genéticas, por exemplo), elas apresentam eficácia reduzida ou até mesmo ausente (Biamonte *et al.*, 2010; Da Silva e Borges, 2011; Manta *et al.*, 2011).

Um dos efeitos observados nas células quando as proteínas não atingem a estrutura enovelada é a agregação proteica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Com a agregação, culminam desordens que podem ser extremamente prejudiciais para o organismo, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e fibrose cística (Manta *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2015; Sahasrabudhe *et al.*, 2017).

A evolução selecionou ao longo do tempo uma classe de proteínas conservadas denominadas chaperonas moleculares, que atuam no processo de controle de qualidade das proteínas. Nesta classe, existem algumas famílias de proteínas de choque térmico ou Hsps, (do inglês *heat shock protein*”), classificadas pela massa molecular que possuem, sendo algumas delas: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e pequenas Hsps. Essas proteínas apresentam um nível de expressão basal nas células, constituindo cerca de 5% a 10% de proteínas celulares totais, porém, em situações estressantes como diferenças de temperatura e pH, por exemplo, o nível de expressão é aumentado (Biamonte *et al.*, 2010; Saibil, 2013; Smith *et al.*, 2015).

1.1.2 Hsp90

As Hsp90 são proteínas que compõem uma família de chaperonas moleculares, cujos membros são essenciais para a manutenção da homeostase celular, realizando funções variadas dentro das células, entre elas: sinalização, translocação, maturação e/ou ativação de proteínas, controle do ciclo celular, epigenética, entre outras. Elas representam aproximadamente 2% do conteúdo de proteínas solúveis presentes em

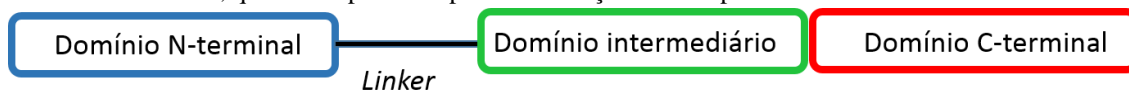
células não submetidas a estresses e estão envolvidas em uma rede complexa de proteínas para realizarem as suas funções (Wandinger *et al.*, 2008; Sahasrabudhe *et al.*, 2017).

As Hsp90 interagem com proteínas-cliente pertencentes a diversas classes como receptores de hormônios corticoides (como exemplo pode-se citar receptores de progesterona e estrogênio), proteínas quinases, proteínas não relacionadas, co-chaperonas e cofatores (McLaughlin *et al.*, 2002). Atualmente são conhecidas mais de 300 proteínas-cliente, inclusive oncoproteínas e supressores tumorais (Posfai *et al.*, 2018). Estas proteínas estão envolvidas em vias de transdução de sinais, doenças neurodegenerativas, infecciosas e câncer (Forsberg *et al.*, 2018). O site “*Hsp90 interactors*” fornece uma lista crescente com as proteínas-cliente da chaperona (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>) (Janin, 2010; Sahasrabudhe *et al.*, 2017).

As Hsp90 também atuam no crescimento e diferenciação de parasitas, progressão do ciclo celular e apoptose, entre outros (Zhao *et al.*, 2005). Por estarem presentes em tantas vias importantes, elas são apontadas como alvo terapêutico para o tratamento de doenças como malária e leishmaniose. Porém, a alta similaridade entre proteínas ortólogas é um desafio para o desenho racional de fármacos (Wegele *et al.*, 2004; Pearl e Prodromou, 2006).

A Hsp90 é uma proteína homodimérica, com cada protômero sendo dividido em três domínios: o N-terminal (~25 kDa) que contém o sítio de interação com ATP e ADP, algumas proteínas-cliente e co-chaperonas. É neste domínio que o ATP sofre hidrólise permitindo que a Hsp90 seja capaz de realizar suas funções. O domínio intermediário (~35 kDa) é conectado ao domínio N por um *linker* flexível carregado positivamente cujo tamanho e composição de aminoácidos é variável entre diferentes espécies. Estudos apontam que este *linker* está relacionado com a regulação da atividade ATPásica destas proteínas (Hainzl *et al.*, 2009). Por último, o domínio C-terminal fornece uma interface para a dimerização dos protômeros da proteína (Zhao *et al.*, 2005; Forsberg *et al.*, 2018). Um esquema representativo da estrutura desta proteína pode ser observado na Figura 1.

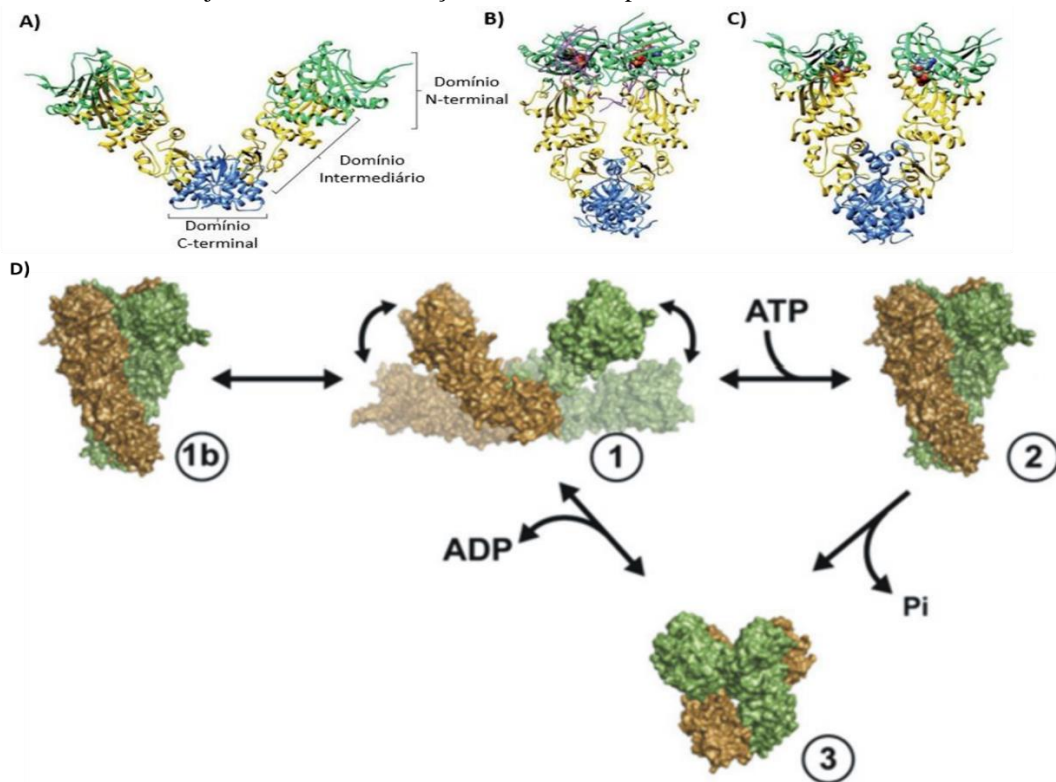
Figura 1-Esquema representativo da estrutura geral de uma Hsp90. A figura mostra o domínio N-terminal de uma Hsp90, que é ligado ao domínio intermediário por meio de um *linker* flexível carregado positivamente que varia em tamanho entre as Hsp90 ortólogas. O domínio intermediário é conectado ao domínio C-terminal, que é o responsável pela dimerização de dois protômeros.



Fonte: Autoria própria.

Esta chaperona existe como um equilíbrio de múltiplos estados conformacionais, que são afetados pela presença de nucleotídeos adenosina, co-chaperonas e modificações pós-traducionais (Street *et al.*, 2011). Elas podem apresentar-se no estado aberto (forma em que estão dimerizadas pelo domínio C-terminal dos dois protômeros) ligadas ou não a ATP ou ADP (Figura 2). A interação do domínio N-terminal com ATP tende a levar a proteína ao estado fechado, em que acontece uma segunda dimerização, agora através dos dois domínios N-terminais. Estes domínios dimerizam-se e aproximam-se do domínio intermediário (Zhang *et al.*, 2015). A hidrólise do ATP faz com que a proteína alcance o estado chamado compacto, no qual a arginina catalítica do domínio M (Arg380 em γ Hsp82) coordena o grupo fosfato γ de forma a estabilizá-lo como grupo abandonador. Finalizada a hidrólise, a saída de ADP e Pi faz com que a proteína volte novamente ao estado aberto e que a proteína-cliente seja liberada após ser enovelada, estabilizada e/ou ativada (Southworth e Agard, 2008; Batista *et al.*, 2015; Schopf *et al.*, 2017).

Figura 2- Estruturas conformacionais da Hsp90. A Hsp90 existe como um equilíbrio de muitos estados conformacionais. A) Conformação aberta mostrando a localização dos domínios N-terminal (verde), intermediário (amarelo) e C-terminal (azul). B) Estrutura fechada com as moléculas de ATP (vermelho) no domínio N-terminal. C) Estrutura após a hidrólise do ATP para a liberação do ADP (vermelho). D) Em (1) pode ser observado o estado aberto dimerizado pelo C-terminal, que pode eventualmente estar dimerizado também pelo domínio N-terminal (1b), ficando assim a Hsp90 no estado fechado. Na presença de ATP, este equilíbrio tende a ser deslocado para o estado fechado (2). O estado compacto (3) é alcançado durante a hidrólise do ATP, cujo resultado é a liberação de Pi, ADP e proteína-cliente, reiniciando o ciclo.



Fonte: Adaptado de (Southworth e Agard, 2008; Saibil, 2013).

Porém, o ciclo da Hsp90 é diferente para diferentes espécies, apesar da alta identidade de sequências entre elas (maior do que 65%). Para a HtpG (Hsp90 de bactéria), existem flutuações naturais de movimento no domínio N-terminal, que são randômicas e dirigidas termicamente. Nesta proteína, Ratzke e colaboradores (Ratzke, Nguyen, *et al.*, 2012) reportam que quando a proteína encontra-se no estado fechado é que o ATP se liga, sendo posteriormente hidrolisado. Fenômeno diferente ocorre com a yHsp82 (Hsp90 de *S. cerevisiae*), que apresenta mudanças de conformação fracamente afetadas pelos nucleotídeos. Para esta proteína, observa-se que o movimento conformacional acontece por flutuações térmicas, que geram muitos estados conformacionais. Também ocorre a ligação dos nucleotídeos tanto no estado aberto como no fechado (Ratzke, Nguyen, *et al.*, 2012). Portanto, durante a evolução, a ciclagem desta proteína tornou-se menos dependente dos nucleotídeos. Este fato pode ser devido à necessidade de um controle mais sofisticado para este sistema, em que uma proteína apresenta funções variadas. Este controle é feito pelas chamadas co-chaperonas (Ratzke *et al.*, 2014), que serão apresentadas com mais detalhes no capítulo 2 desta tese.

Portanto, no geral, a ligação de ATP ou ADP pode resultar em um equilíbrio de diferentes estados conformacionais nas diferentes Hsp90 (Krukenberg *et al.*, 2011; Schopf *et al.*, 2017; Seraphim *et al.*, 2017). Vale ressaltar que ela permanece mais tempo na conformação aberta do que nas conformações fechadas para a ativação das proteínas-cliente de maneira mais eficiente (Zierer *et al.*, 2016).

As Hsp90 possuem baixa atividade ATPásica e a taxa de hidrólise do ATP é um ponto crítico e precisa ser altamente regulado para permitir que a proteína-cliente permaneça ligada à Hsp90 pelo tempo suficiente de ativação/maturação (McLaughlin *et al.*, 2002). Desta forma, a atividade ATPásica tem papel de direcionar o ciclo funcional da Hsp90.

Diferentemente de outras famílias de chaperonas, as Hsp90 não participam do enovelamento quando as proteínas estão sendo produzidas nos ribossomos, mas sim em um estágio mais tardio, quando as proteínas-cliente oferecem regiões para a ligação mais estruturadas, porém ainda sendo instáveis (Seraphim *et al.*, 2014).

1.1.3 Malária

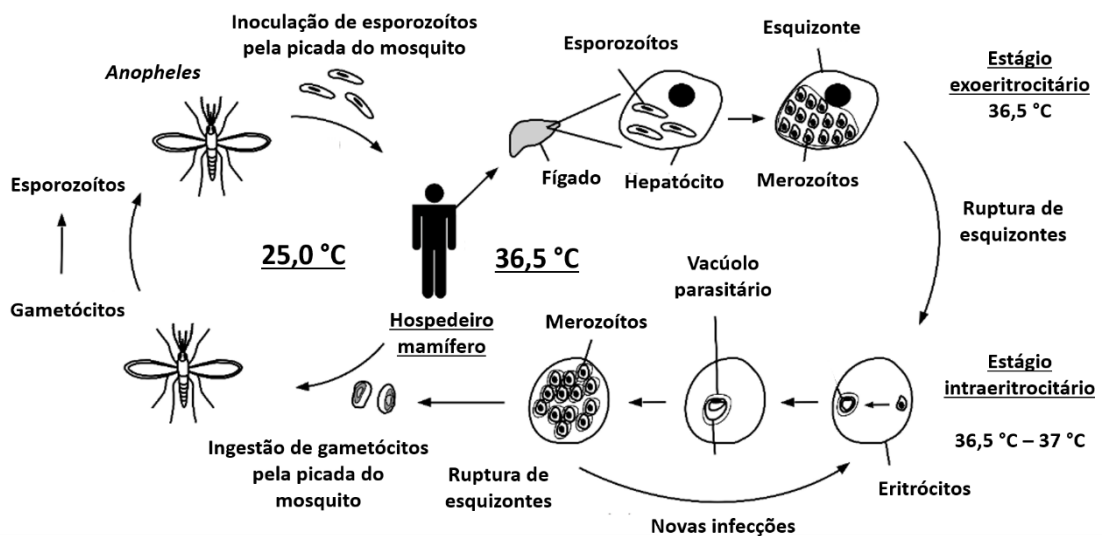
A malária é uma doença típica de regiões tropicais e subtropicais cujo agente etiológico é um parasita do gênero *Plasmodium*. As espécies causadoras são: *Plasmodium vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. falciparum*, sendo que esta última normalmente é a

causadora dos casos graves da doença, que é transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles*.

A doença infecta aproximadamente 200 milhões de pessoas por ano e leva a óbito aproximadamente 2% destes (Posfai *et al.*, 2018). Ela coloca em risco aproximadamente 40% da população mundial em mais de 100 países (Gomes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2018). Somente no Brasil, são cerca de 300 mil novos casos anuais. Nos infectados, alguns dos sinais e sintomas observados são: convulsões, alterações de consciência, edema pulmonar, hemorragias, icterícia e oligúria. As alterações laboratoriais incluem anemia, hipoglicemia, insuficiência renal, entre outras (Gomes *et al.*, 2011).

A Figura 3 mostra o ciclo biológico do parasita, que possui um ciclo de vida complexo, com mais de 28 fases, que, resumidamente, se inicia com a picada da fêmea infectada da mosquito do gênero *Anopheles*. Os esporozoítas infectados ou são destruídos pelo sistema imunológico ou penetram nos hepatócitos, local em que ocorre intensa multiplicação. Após certo período, os esporozoítas dão origem aos merozoítas, os quais caem na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos. Dentro destes, os merozoítas transformam-se em trofozoítas, que após a esquizogonia, originarão novamente os merozoítas. As células infectadas se rompem e liberam os merozoítas. É neste momento em que ocorrem os picos febris, em que a temperatura corporal aumenta até 41 °C. Desta forma, o ciclo recomeça (Gomes *et al.*, 2011; Seraphim *et al.*, 2014).

Figura 3- Ciclo biológico do *P. falciparum*. Durante o ciclo, ocorrem momentos de choque térmico: na passagem do *Anopheles*, onde a temperatura é cerca de 25 °C, para o hospedeiro mamífero, que, no caso dos humanos, apresenta temperatura corporal de 36,5 °C. Além disto, durante a febre, a temperatura corporal aumenta ainda alguns graus célsius.



Fonte: Adaptado de (Seraphim *et al.*, 2014).

Um dos maiores problemas para o tratamento da doença é a resistência que o parasita está adquirindo aos medicamentos existentes (Gomes *et al.*, 2011). Sabendo que o protozoário muda de hospedeiro durante seu ciclo de vida, com conseqüente mudança de temperatura, condição em que a Hsp90 passa de um nível de expressão basal para uma expressão aumentada, a proteína passa a se tornar um alvo promissor, uma vez que é importante para o crescimento, desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência do parasita (Posfai *et al.*, 2018). Geldanamicina (GA) inibe, em cultura, o crescimento de *P. falciparum*, *L. donovani*, entre outros. Acredita-se que a inibição ocorra devido à interação do antibiótico com a Hsp90 (; Corbett e Berger, 2010).

1.1.4 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença negligenciada presente em regiões tropicais e subtropicais. Ela é prevalente em 88 países, afetando aproximadamente 14 milhões de pessoas (Alvar *et al.*, 2006). Em 2014, mais de 90% dos casos ocorreram em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>, acessado em 12/06/2018). Ela é causada por mais de 20 espécies e é transmitida por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Silva *et al.*, 2013). São diversos os hospedeiros que podem ser afetados, incluindo animais domésticos (Alvar *et al.*, 2006).

Apesar da baixa mortalidade que apresenta, a doença provoca profundos impactos sociais nos indivíduos que contraem a doença, visto que muitos convivem com as sequelas deixadas na forma de úlceras na pele (Seraphim *et al.*, 2014).

A leishmaniose é dividida em mucocutânea, cutânea, cutânea difusa e visceral. A *L. braziliensis* causa a mucocutânea, que é caracterizada pela destruição da mucosa, cartilagem da boca e faringe seguidas pelo tecido facial (Alvar *et al.*, 2006).

A transmissão acontece quando um flebotomíneo (fêmea do mosquito-palha, gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) infectada pica um hospedeiro mamífero e inocula os promastigotas metacíclicos na corrente sanguínea. Dentro do hospedeiro ocorre a fagocitose dos parasitas através de, por exemplo, macrófagos. Com a alteração de pH e temperatura, entre outros, ocorre a diferenciação em amastigotas, que se reproduzem e voltam ao inseto quando este pica um hospedeiro mamífero infectado. Dentro do flebotomíneo, ocorre no tubo digestivo a diferenciação dos parasitas em promastigotas, reiniciando o ciclo (Seraphim *et al.*, 2014).

Cabe ressaltar que, durante a passagem do vetor para o hospedeiro, o parasita enfrenta diferentes condições de temperatura, nutricionais, de pH, entre outros. Então as Hsp90 também são alvos potenciais para o tratamento da leishmaniose, visto que assim como para a malária, os agentes etiológicos também apresentam resistência aos fármacos usuais, que apresentam efeitos tóxicos para os pacientes, precisam ser combinados para a obtenção de melhores resultados e devem ser administrados por um longo período de tempo (Alvar *et al.*, 2006; Amato *et al.*, 2007).

1.1.5 Câncer e inibidores de Hsp90

Em humanos, a expressão das Hsp90 está associada com muitos tipos de tumor, incluindo câncer de mama, leucemia e lúpus eritematoso sistêmico. Em condições normais elas representam cerca de 1-2% das proteínas celulares solúveis, porém o nível de expressão aumenta de 2 a 10 vezes em células tumorais. Em muitos casos, as proteínas-cliente das Hsp90 estão mutadas ou ativadas nestas células. Então, frequentemente a inibição das Hsp90 é mostrada como uma importante plataforma para terapia antineoplásica (Chen *et al.*, 2005; Tsutsumi e Neckers, 2007).

Nestes organismos, duas isoformas de Hsp90 citosólicas são encontradas: isoformas α e β . A isoforma β é constitutivamente expressa, diferentemente da isoforma α , que é induzível. Além disto, esta última é expressa extracelularmente, apresenta propriedades inesperadas e interage com moléculas no ambiente extracelular, estando diretamente relacionada com a invasividade e motilidade de células cancerígenas (Eustace *et al.*, 2004; Tsutsumi e Neckers, 2007). Estudos mostram que elas podem estar relacionadas com resistência adquirida a algumas formas de quimioterapia. Estas isoformas são o resultado de uma duplicação gênica que ocorreu há aproximadamente 500 milhões de anos (Chen *et al.*, 2005).

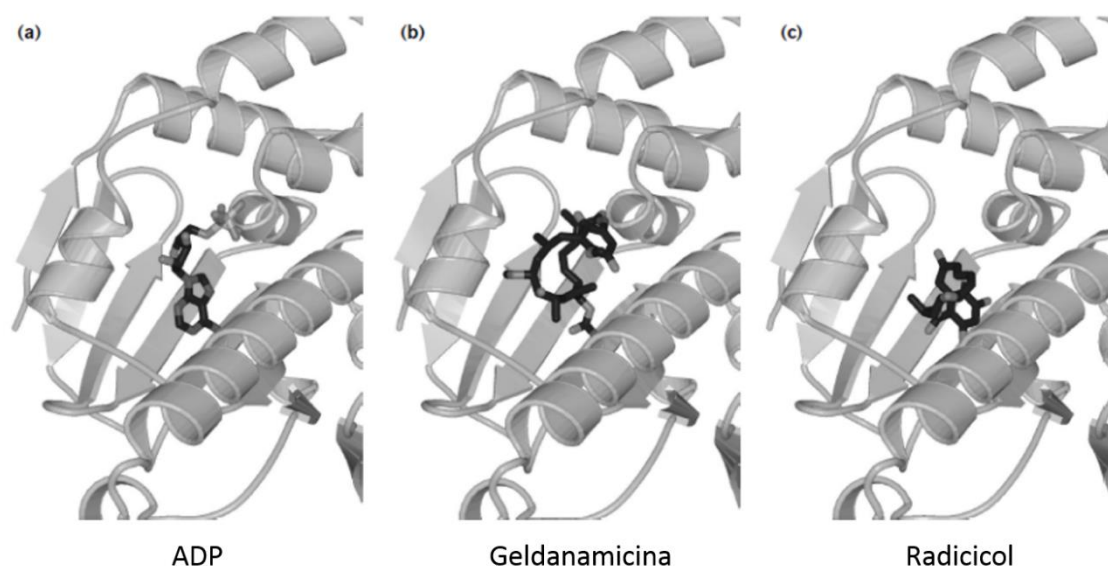
Como dito anteriormente, devido ao fato de as Hsp90 estarem envolvidas em diversas vias de transdução de sinais, elas são alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de câncer, como o de próstata, por exemplo (Yan *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018). Se a proteína é inibida, as suas funções são perdidas, o que normalmente resulta em degradação das proteínas-cliente e desbalanço de inúmeros processos celulares, afetando até mesmo o crescimento e progressão de tumores. Portanto, é grande o interesse para descoberta/síntese de compostos que modulem a atividade desta proteína. Alguns compostos naturais foram identificados como sendo inibidores da Hsp90, como a GA e o radicicol. Como possuem alta toxicidade, eles são utilizados como modelo para a

engenharia e síntese de análogos com propriedades farmacológicas mais desejáveis (Zhao *et al.*, 2010; Singh e Atri, 2013).

O radicicol é um antibiótico natural que possui a capacidade de se ligar ao sítio de ligação do ATP nas Hsp90, impedindo a hidrólise de ATP e consequentemente inibindo a atividade da proteína. Como possui alta toxicidade, ele é usado como molde para a síntese de análogos com propriedades farmacológicas desejadas, como por exemplo, menor toxicidade e maior potência e estabilidade, que possam vir a ser utilizados clinicamente. Estudos cristalográficos apontam que a interação entre o antibiótico e a proteína ocorre principalmente por ligações de hidrogênio com os aminoácidos do sítio de ligação do ATP no domínio N-terminal da Hsp90 (Figura 4) (Zubrienê *et al.*, 2010).

A GA é, além de um antibiótico da classe das ansamicinas, um agente antitumoral ligante de Hsp90. Assim como o radicicol, a GA também é inibidora da atividade ATPásica das Hsp90 por competir pelo sítio de ligação do ATP (Figura 4). Logo, tanto GA como radicicol são inibidores competitivos da atividade ATPásica da Hsp90. Estudos estruturais apontam que existe semelhança destes antibióticos com o nucleotídeo tanto em relação à forma de complementariedade como pelo tipo de interação com a proteína e moléculas de água presentes no sítio de interação ao nucleotídeo (Janin, 2010).

Figura 4 - Interação de GA e radicicol no sítio de ligação de nucleotídeos da Hsp90 de *S. cerevisiae*. (A) representa a ligação de ADP, (B) representa a ligação da GA e (C) representa a ligação de radicicol. Os ligantes são mostrados em preto e o sítio de ligação aos nucleotídeos da proteína está representado em cinza.



Fonte: Adaptado de (Pearl e Prodromou, 2000).

Ao longo do tempo foram sendo selecionadas diversas abordagens na utilização de moléculas que são inibidoras de Hsp90 para o tratamento de câncer. A maioria dos estudos visa modificar moléculas que se ligam tanto no domínio N-terminal como no C-terminal, com o objetivo de desenvolver moléculas que sejam mais específicas, solúveis e menos hepatotóxicas (Janin, 2010; Yan *et al.*, 2017). Levando-se em consideração que existem diferenças entre as Hsp90 de protozoários e a humana, é interessante que se estude a sensibilidade destas proteínas frente aos inibidores já conhecidos e seus análogos, os quais vêm sendo sintetizados e prospectados. Entendendo a diferença entre estas interações, teoricamente seria possível aperfeiçoar a interação proteína-inibidor, culminando na síntese de inibidores patógeno-seletivos para o tratamento de doenças causadas por protozoários, as quais são normalmente negligenciadas (Corbett e Berger, 2010; Wang *et al.*, 2014).

As Hsp90 são proteínas de extrema importância para a homeostase celular, participando de inúmeras vias de sinalização intracelulares. Elas são conservadas, mostrando alta identidade de sequência de aminoácidos entre os seus membros. Por este motivo, repetidamente são mostradas como alvos terapêuticos potenciais, porém, difíceis, uma vez que os inibidores normalmente possuem afinidades semelhantes para as Hsp90 ortólogas. Por esse motivo, um estudo comparativo entre elas pode realçar ou não a possibilidade de inibição seletiva. Para esta família de proteínas, a Hsp82 (Hsp90 de *S. cerevisiae*) é considerada uma proteína modelo, que já foi exaustivamente estudada em vários aspectos. Deste modo, ela também foi alvo de estudo nesta tese para efeitos comparativos, uma vez que a motivação do trabalho foi comparar Hsp90 de diferentes organismos em relação a suas interações com nucleotídeos adenosina ATP e ADP. Para representar a Hsp90 em plantas, foi escolhida a Hsp90 de *Saccharum sp.*.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste capítulo são caracterizar a interação das proteínas Hsp90 de *S. cerevisiae*, *L. braziliensis*, *P. falciparum*, *Saccharum sp.* e isoformas α e β humanas com os nucleotídeos adenosina ATP e ADP através de calorimetria de titulação isotérmica, ressonância magnética nuclear e dinâmica molecular. Também constituem objetivos a avaliação da atividade ATPásica das proteínas Hsp90 de *P. falciparum* e *L. braziliensis*, bem como a avaliação da inibição das mesmas por GA e radicicol.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar, de forma heteróloga, as proteínas Hsp90 dos organismos: *S. cerevisiae*, *L. braziliensis*, *P. falciparum*, *Saccharum sp.* e isoformas α e β humanas;
- Expressar o DNT da Hsp90 de *L. braziliensis*, isoforma β humana e *S. cerevisiae*;
- Otimizar o mesmo protocolo de purificação para todas as proteínas, tanto para os ensaios de calorimetria de titulação isotérmica quanto para os de atividade ATPásica;
- Realizar o controle de qualidade das proteínas através de espectropolarimetria de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência;
- Realizar experimentos de calorimetria de titulação isotérmica entre as proteínas e os ligantes ATP e ADP para a obtenção de parâmetros termodinâmicos experimentais das interações (assinatura termodinâmica);
- Avaliar a ressonância magnética nuclear do tipo *saturation transfer difference* (STD) para a complementação dos dados experimentais da calorimetria;
- Avaliar a dinâmica molecular para a complementação dados experimentais da calorimetria;
- Avaliar a atividade ATPásica e inibição dela por GA a e radicicol para as proteínas Hsp90 de *P. falciparum* e *L. braziliensis*.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Bioinformática

Inicialmente, foi feita uma busca para identificar a sequência das proteínas usando o *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), são elas: XP_001348998.1 (Hsp90 de *P. falciparum*), XP_001567804.1 (Hsp90 de *L. braziliensis*), NP_005339.3 e NP_031381.2 (isoformas α e β humanas, respectivamente), AGC60019.1 (Hsp90 de *Saccharum sp.*), NP_015084.1 (Hsp90 de *S. cerevisiae*). Em seguida, foi feita uma análise comparativa de alguns parâmetros, como o coeficiente de extinção molar, ponto isoelétrico, massa molecular e número de aminoácidos presentes na sequência, fornecidos pelo *software Sednterp* (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>). Tanto as sequências completas como a dos DNTs foram alinhadas globalmente utilizando o programa *Clustal omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

1.4.2 Expressão e purificação para os ensaios de calorimetria

As Hsp90 recombinantes de *P. falciparum*, *L. braziliensis*, *S. cerevisiae*, *Saccharum sp.* e isoformas α e β humanas, além dos domínios N-terminais de *L. braziliensis*, *S. cerevisiae* e humana (isoforma β) foram obtidas após a transformação dos plasmídeos (Tabela 1) em diferentes cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) e posterior inóculo das colônias em meio LB. As culturas bacterianas foram crescidas a 37 °C e 200 rpm até atingirem D.O._{600nm} variando entre 0,6-0,8 U.A. Nesse momento, IPTG foi adicionado e as condições de indução estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1- Plasmídeos utilizados para a obtenção das proteínas recombinantes.

Proteína	Organismo	Código Genbank	Plasmídeo	Origem
PfHsp90	<i>P. falciparum</i>	XP_001348998.1	pET28a::PfHsp90	(Silva <i>et al.</i> , 2018)
LbHsp90	<i>L. braziliensis</i>	XP_001567804.1	pET28a::LbHsp90	(Silva <i>et al.</i> , 2013)
hHsp90 α	<i>H. sapiens</i>	NP_005339.3	pProEx-HTa::hHsp90 α	Doado pelo Prof. Walid A. Houry, Universidade de Toronto, CA
hHsp90 β	<i>H. sapiens</i>	NP_031381.2	pProEx-HTa::hHsp90 β	Doado pelo Prof. Jason C. Young, Universidade de McGill, CA
ScHsp90	Cana-de-açúcar (espécie híbrida derivada de <i>Saccharum officinarum</i> e <i>S. spontaneum</i>)	AGC60019.1	pET28a::ScHsp90	(Da Silva <i>et al.</i> , 2013)
yHsp82	<i>S. cerevisiae</i>	NP_015084.1	pProEx-HTa::yHsp82	Doado pelo Prof. Walid A. Houry, Universidade de Toronto, CA
LbHsp90N	<i>L. braziliensis</i>	XP_001567804.1 (resíduos 1-221)	pET28a::LbHsp90N	(Silva <i>et al.</i> , 2013)
hHsp90 β N	<i>H. sapiens</i>	NP_031381.2 (resíduos 1-223)	pET28a::hHsp90 β N	Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas
yHsp82N	<i>S. cerevisiae</i>	NP_015084.1 (resíduos 1-220)	p11::yHsp82N	Doado pelo Prof. Walid A. Houry, Universidade de Toronto, CA

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Tabela 2 - Condições de indução para as diferentes proteínas.

Proteína	Cepa de <i>E. coli</i>	Vetor de expressão	Canamicina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ampicilina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cloranfenicol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[IPTG] (mmol.L^{-1})	Temperatura de indução ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de indução (h)
PfHsp90	BL21 (DE3)	pET28a	30	-	-	0,4	20	18
LbHsp90	BL21 (DE3)	pET28a	30	-	-	0,4	30	4
hHsp90α	BL21 (DE3)	pProEx-HTa	-	50	-	0,4	18	18
hHsp90β	BL21 (DE3)	pProEx-HTa	-	50	-	0,4	18	18
yHsp82	BL21 (DE3) pRIL	pProEx-HTa	-	50	34	0,4	18	18
ScHsp90	BL21 (DE3) pLysS	pET28a	30	-	34	0,5	37	5
LbHsp90N	BL21 (DE3)	pET28a	30	-	-	0,4	30	4
hHsp90βN	BL21 (DE3)	pET28a	30	-	-	0,4	37	4
yHsp82N	BL21 (DE3)	p11	-	50	-	0,4	30	4

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

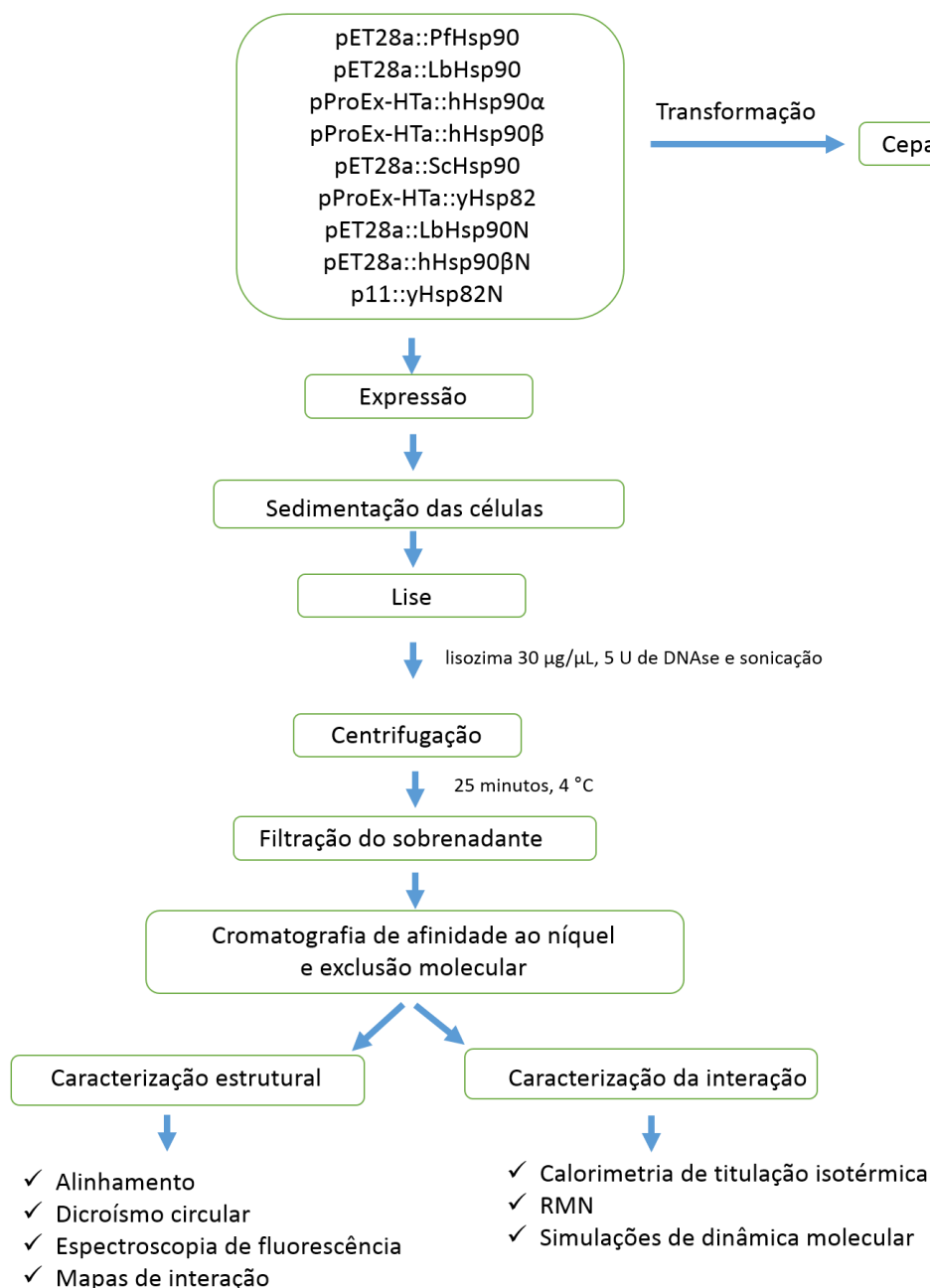
Depois da indução, os meios foram centrifugados a 13.600 g por 10 min a 4 °C e os *pellets* foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,5) contendo NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Foram adicionados 30 µg.mL⁻¹ de lisozima (sigma) e 5 U de DNase (Sigma) e incubados em gelo por 40 minutos e, em seguida, as células foram lisadas por sonicação seguida de centrifugação a 15.700 g por 25 minutos a 4 °C e filtrados em membranas de 0,45 µm.

As proteínas foram purificadas de acordo com (Silva *et al.*, 2013) com algumas modificações. As purificações ocorreram através de dois passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel usando uma coluna *HisTrap* (GE Healthcare Life Sciences) seguida de cromatografia de exclusão molecular usando a coluna *Superdex 200 26/60* (GE Healthcare Life Sciences) acoplada ao *Akta Prime Plus* (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrados com tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM.

A eficiência das purificações foi avaliada por SDS-PAGE 10% para as proteínas completas e SDS-PAGE 15% para os domínios. As concentrações foram aferidas espectrofotometricamente usando os coeficientes de extinção molar a 280 nm de acordo com (Pace *et al.*, 1995) obtidos utilizando o *Protparam* (bo.expasy.org/tools/protparam.html).

A Figura 5 mostra um fluxograma de como foram expressas e purificadas as proteínas Hsp90 de diferentes organismos e os ensaios que foram feitos posteriormente para a realização da caracterização estrutural e de interação delas com os nucleotídeos adenosina.

Figura 5- Fluxograma representativo das etapas de expressão, purificação e ensaios para caracterização estrutural e de interação das proteínas com nucleotídeos adenosina.



Fonte: Autoria própria.

1.4.3 Purificação para os ensaios de atividade ATPásica

Foram feitos ensaios de atividade ATPásica e de inibição desta com geldanamicina para as proteínas LbHsp90 e PfHsp90. Porém, como as atividades mostraram-se mais altas do que as relatadas na literatura e como estas proteínas não eram inibidas pelo ligante, os passos de purificação foram alterados. Então, para evitar possíveis contaminantes que poderiam interferir nos ensaios de atividade ATPásica, a

purificação das proteínas PfHsp90 e LbHsp90 ocorreu por meio de três passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel, resina hidroxiapatita CHT™ tipo II e cromatografia de exclusão molecular. A coluna utilizada para afinidade foi a *Hitrap Chelating* de 5 mL (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando o equipamento *AKTA Prime plus* (*GE Healthcare Lifesciences*).

A coluna de afinidade ao níquel foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo KCl 100 mM. Em seguida, o sobrenadante do lisado celular foi injetado na coluna e ela foi lavada com mais 40 mL desse tampão. A eluição das proteínas ocorreu com a passagem do tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo KCl 100 mM e imidazol 500 mM.

Em seguida, as proteínas ficaram em diálise em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) durante 4 horas e foram injetadas na coluna de hidroxiapatita previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição das proteínas ocorreu com a passagem de um gradiente de tampão de fosfato de sódio 10-500 mM (pH 7,4) pela coluna.

A terceira cromatografia foi a de exclusão molecular preparativa (CEM). A coluna utilizada foi a *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Prime plus* (*GE Healthcare Lifesciences*) previamente equilibrado em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM. Após a purificação, as proteínas foram dialisadas *overnight* em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM. A eficácia das purificações foi avaliada por SDS-PAGE 10%.

1.4.4 Quantificação das proteínas

A concentração das proteínas foi medida por espectrofotometria a 280 nm, de acordo com a lei de Beer-Lambert (Equação 1). O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi estimado utilizando a sequência de aminoácidos da proteína no programa *Protparam*.

$$A = \epsilon \times l \times C \quad (\text{Equação 1})$$

em que A representa a absorbância medida, l é o passo óptico da cubeta e C é a concentração da proteína.

1.4.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular no UV distante

Para avaliar o conteúdo de estruturas secundárias e garantir o controle de qualidade das proteínas, foram feitos ensaios de espectropolarimetria de dicroísmo circular. O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro J-815 (*Jasco*). Foi utilizada

cubeta circular de quartzo de 0,2 mm contendo 15 μM de proteínas (concentração de monômero), velocidade de 50 nm/min e 30 acumulações. O comprimento de onda monitorado variou de 260 a 193 nm. Os dados obtidos foram analisados e normalizados para elipticidade residual molar média (Corrêa e Ramos, 2009), com o auxílio do *software OriginPro 8.0*, através da Equação 2:

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

em que $[\theta]$ representa a elipticidade molar residual média ($\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), MM é a massa molecular da proteína em Da, C é a concentração, l representa o caminho óptico da cubeta (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína. Para a deconvolução dos espectros, o *software CDNN Deconvolution* (<http://gerald-boehm.de/download/cdnn>) foi utilizado.

1.4.6 Espectroscopia de fluorescência

Para avaliar a estrutura terciária local de onde estão inseridos os triptofanos nas proteínas, elas (20 μM , concentração de monômero) foram colocadas em microplaca de PS com 96 poços, fundo plano, preto (*Greiner Bio-One*). Em seguida, a placa foi colocada no equipamento *Varioskan Lux* (*Thermo Scientific*) e o comprimento de onda de excitação escolhido foi 280 nm. Os comprimentos de onda de emissão selecionados variaram de 298 nm a 420 nm para todas as proteínas. Para garantir a qualidade do enovelamento das proteínas, elas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com 5 M do agente desnaturante Gnd-HCl. Do sinal obtido, foram subtraídos os valores dos sinais encontrados para 5 M do agente desnaturante incubado com o tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM.

Para cada concentração do agente desnaturante foi calculado o centro de massa espectral, $\langle \lambda \rangle$, através da Equação 3:

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

em que λ_i representa o comprimento de onda e F_i a intensidade de fluorescência no ponto.

1.4.7 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica

Para os testes de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), foi utilizado o equipamento *MicroCal™ iTC200 system* (*GE Healthcare*). Resumidamente, as proteínas (em torno de 15 μM de Hsp90, concentração de dímero, e 50 μM para os DNTs) foram dialisadas por 3 horas após saírem da CEM, em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo

KCl 100 mM. Esse mesmo tampão foi usado para o preparo das soluções estoque de ATP e ADP (Sigma). Estes estoques foram preparados todas as vezes em que os ensaios eram realizados, deste modo, estas soluções eram usadas sempre frescas. O ϵ utilizado para quantificação dos nucleotídeos adenosina foi $15400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Todos os experimentos foram feitos no dia da purificação das proteínas, para evitar a perda de atividade que poderia ocorrer depois de passados alguns dias.

Esses nucleotídeos adenosina em concentrações variando de 1 a 2 mM foram adicionados na seringa e titulados nas proteínas (que estavam na cela), concomitantemente com concentrações variáveis de MgCl_2 . No geral, foram feitas 19 titulações em temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando 1000 rpm e intervalos variando de 120 a 150 segundos. Os controles foram feitos usando titulações de ATP e ADP em tampão.

As condições de interação foram, quando possível, as mais semelhantes e estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 -Condições experimentais detalhadas das titulações das proteínas completas e DNTs com ATP.

ATP	PfHsp90	LbHsp90	hHsp90α	hHsp90β	yHsp82	ScHsp90	LbHsp90N	hHsp90βN	yHsp82N
[Proteína] μM	15	17	15	15	17	15	50	50	50
[MgCl₂] mM	2	5	2	2	5	5	5	5	5
[ATP] mM	1,5	2	1	0,75	2	2	2	2	2
Volume de injeção (μL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Duração da injeção (s)	2	4	4	2	2	2	2	2	2
Espaçamento entre injeções (s)	150	120	150	150	150	150	150	150	150
Número de injeções	19	19	19	19	19	19	19	19	19

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Tabela 4 -Condições experimentais detalhadas das titulações das proteínas completas e DNTs com ADP.

ADP	PfHsp90	LbHsp90	hHsp90α	hHsp90β	yHsp82	ScHsp90	LbHsp90N	hHsp90βN	yHsp82N
[Proteína] μM	15	15	15	15	15	15	50	50	50
[MgCl₂] mM	2	2	2	2	2	2	5	2	2
[ADP] mM	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume de injeção (μL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Duração da injeção (s)	2	2	2	0,8	2	2	2	2	2
Espaçamento entre injeções (s)	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Número de injeções	19	19	19	19	19	19	19	19	19

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Os isotermogramas foram analisados com o *software Microcal Origin 7.0* fornecido com o equipamento, usando o modelo “*one set of sites*”. O calor da interação (Q) foi determinado a partir da integração das áreas dos picos a cada injeção ($\mu\text{cal}/\text{seg}$), que são proporcionais ao volume da célula (V_{cel}), concentração de ligante ($[L]$) e variação de entalpia aparente (ΔH_{app}). O calor de diluição do ligante foi determinado usando a linha de base no final das titulações e subtraído dos dados. O Q obtido por mol de ligante injetado foi analisado em função da razão molar entre titulante/titulado e os valores de ΔH , n e K_A foram estimados pelo ajuste dos dados, realizado com auxílio do programa *Origin Microcal 7.0*, segundo a equação 4 abaixo:

$$Q = \left(\frac{n[M]\Delta H_{V_{\text{cel}}}}{2} \right) \left\{ 1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} - \sqrt{\left[\left(1 + \frac{[L]}{(n[M])} + \frac{1}{(nK_A[M])} \right)^2 - \frac{4[L]}{(n[M])} \right]} \right\} \quad (\text{Equação 4})$$

onde, $[M]$ é a concentração molar do titulado e ΔH é a variação de entalpia, em $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$. O programa de análise opera supondo valores para a estequiometria (n), constante de associação (K_A) e ΔH_{app} , calculando a variação do calor (ΔQ) em cada injeção e comparando-os com o calor obtido experimentalmente para cada injeção. Os valores de n , K_A e ΔH foram então otimizados progressivamente por melhoria na discrepância (Chi^2) entre a curva simulada e a experimental (Pierce *et al.*, 1999; Leavitt e Freire, 2001).

A constante de dissociação (K_D) foi calculada como sendo o inverso de K_A e a variação da energia de Gibbs aparente (ΔG_{app}) e variação de entropia aparente (ΔS_{app}) foram encontradas utilizando a Equação 5:

$$\Delta G = -RT\ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 5})$$

em que T é a temperatura absoluta (Kelvin) e R é a constante dos gases ($\text{cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Os dados mostrados representam a média de pelo menos três titulações independentes.

1.4.8 Mapas de interação

O programa LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) foi utilizado para a construção do mapa de interação entre as proteínas e os ligantes. Deste modo, foram gerados diagramas 2D baseados nas coordenadas dos arquivos contidos no *Protein Data Bank* (PDB). Os aminoácidos que interagem com os ligantes por ligações de hidrogênio ou contatos hidrofóbicos são mostrados, bem como os que são equivalentes quando dois modelos são superpostos. Foram utilizadas as estruturas 1BYQ e 3T0Z para a análise da proteína hHsp90N α , complexada com ADP e ATP. Também foram testadas as estruturas 3U67 e 3H80 correspondentes à proteína Hsp90 de *L. major* complexada com ADP e AMPPNP.

Estas estruturas foram utilizadas porque para ambas as proteínas se encontravam no PDB estruturas em complexo tanto com ADP quanto com ATP/AMPPNP com boa resolução.

1.4.9 Experimentos de STD-RMN

Os experimentos de STD-RMN foram feitos pelo Prof. Dr. Fernando Melo e Dr. Fábio Moraes utilizando a estrutura do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto).

As interações de ATP e ADP com as proteínas hHsp90βN, yHsp82N e LbHsp90N foram investigadas por uma técnica baseada em ressonância magnética nuclear, chamada diferença de transferência de saturação (STD- do inglês *Saturation Transfer Difference*) (Mayer e Meyer, 1999) na presença e ausência de 800 μM MgCl₂. Esses experimentos foram feitos em um espectrômetro 600 MHz 1H Bruker AVANCE III HD (Bruker, Alemanha), alocado no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do IBILCE/UNESP (São José do Rio Preto, SP).

As proteínas, após a purificação na cromatografia de exclusão molecular, foram dialisadas *overnight* em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,4) contendo KCl 100 mM e concentradas até 20 μM. Elas foram adicionadas com os nucleotídeos adenosina (800 μM) na presença e ausência de MgCl₂ em tubos que foram levados para o equipamento.

A sequência de pulsos STDDIFFESGP.3, padrão do Bruker, foi utilizada para a aquisição de dados da supressão do sinal da água. Uma *off*-ressonância em 20 ppm foi feita e a saturação seletiva da proteína foi encontrada irradiando a proteína em 4 ppm por 2 segundos com espaçamento de 3 segundos. A supressão da proteína foi feita utilizando-se o filtro *spin-lock* de 30 ms. Cada espectro 1D passou por transformada de Fourier usando o *TopSpin 3.2*, e aplicando-se um alargamento de linhas de 2 Hz. Os mesmos fatores de fase foram usados para cada par de espectro *off* e *on* ressonância. Os fatores de amplificação (FA) foram calculados de acordo com a Equação 6:

$$AF = \frac{(I_{OFF} - I_{ON})}{I_{OFF}} \quad (\text{Equação 6})$$

em que I_{OFF} e I_{ON} representam as integrais para cada sinal dos ligantes nos experimentos de *off* e *on* ressonância.

Posteriormente, também foram feitos experimentos de STD com quatro proteínas completas: hHsp90α, hHsp90β, yHsp82 e LbHsp90. As proteínas foram usadas nas concentrações de 10 μM, com 800 μM dos nucleotídeos, também na presença e ausência de 800 μM de MgCl₂.

1.4.10 Simulações de dinâmica molecular

As estruturas cristalográficas dos DNTs da Hsp90 de *S. cerevisiae*, *L. major* e isoforma α humana foram simuladas com ADP e ATP (Tabela 5). Por não existir uma estrutura cristalográfica para o DNT de *L. braziliensis*, foi gerado pelo Prof. Dr. Alessandro Nascimento (IFSC/USP), um modelo molecular por homologia usando o *software Modeller* (Sali e Blundell, 1993) e partindo-se da estrutura cristalográfica do DNT de *L. major* como modelo (PDB ID 3H80). A validação deste modelo foi feita pelos programas *DOPE-score* (Shen e Sali, 2006) e *SAVS* (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Nas dinâmicas moleculares, todas as estruturas foram parametrizadas de acordo com o campo de força *AMBER FF14SB* (Maier *et al.*, 2015) e os ligantes foram parametrizados com os parâmetros do campo de força *AMBER* (Meagher *et al.*, 2003). Para cada um dos complexos, o protocolo de simulação foi baseado na minimização de energia da estrutura inicial em 500 *steps* do algoritmo de descida e 500 *steps* do gradiente conjugado, seguido pelo aquecimento do sistema a 26,85 °C em 50 ps, mantendo o volume do sistema constante.

Tabela 5 - Referências das estruturas usadas para as análises de dinâmica molecular. Estruturas cristalográficas dos DNTs da isoforma α humana, *L. major*, *S. cerevisiae* e *L. braziliensis* com diferentes ligantes utilizados para as análises estruturais e dinâmicas moleculares, bem como o PDB ID e resolução estrutural de cada uma delas.

Organismo	Ligantes na estrutura cristalográfica	PDB ID	Resolução estrutural	Referência
<i>H. sapiens</i> (hHsp90 α N)	ADP + Mg ²⁺	1BYQ	1,50 Å	(Obermann <i>et al.</i> , 1998)
	ATP + Mg ²⁺	3T0Z	2,19 Å	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. major</i> (LmHsp90N)	ADP + Mg ²⁺	3U67	1,77 Å	(Pizarro <i>et al.</i> , 2013)
	AMPPNP + Mg ²⁺	3H80	2,00 Å	(Pizarro <i>et al.</i> , 2013)
<i>S. cerevisiae</i> (yHsp82N)	ADP	1AMW	1,85 Å	(Prodromou <i>et al.</i> , 1997)
<i>L. braziliensis</i> (LbHsp90N)	ADP	Modelo por homologia	-	Dados não publicados
	ATP	Modelo por homologia	-	Dados não publicados

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Em seguida, a densidade do sistema foi equilibrada a 1 g.cm⁻³ em 50 s com pressão constante em 1 atm. Durante o passo de minimização de energia, equilíbrio do calor e densidade, restrições harmônicas foram aplicadas nas proteínas, ligantes e íons de Mg²⁺ (quando eles estavam presentes), com peso de 2 kcal.mol⁻¹.Å⁻². Por último, o sistema foi

equilibrado durante 500 ps sem as restrições e as simulações para cada complexo foram feitas durante 100 ns.

As simulações do equilíbrio foram analisadas com o *CPPTRAJ* (Roe e Cheatham, 2013) e com o programa *AmberEnergy* (<http://github.com/alessandronascimento/amberenergy>), para o cálculo das energias de interação baseadas nas simulações de dinâmica molecular. O “*Grid Inhomogeneous Solvation Theory*” (*GIST*) foi utilizado para analisar o papel da solvatação das moléculas de água durante as simulações (Ramsey *et al.*, 2016).

1.4.11 Ensaios de atividade ATPásica para a LbHsp90 e PfHsp90

Os ensaios de atividade ATPásica foram feitos em placas *Greiner UV-Star* com as proteínas a 2 μM (concentração de monômero). Foram adicionados MgCl_2 5 mM e ATP, cuja concentração variou de 0 a 4 mM. O tampão da diálise foi adicionado para completar um volume total de 200 μL . As placas foram incubadas a 37 °C durante 90 minutos e o kit *EnzChek® Phosphate Assay Kit E-6646 (Molecular Probes)* foi usado para a aferição do fosfato liberado. Através desse kit, o MESG (2-amino-6-mercaptopurina-7-metil purina ribosídeo) reage com o fosfato liberado pela da hidrólise do ATP e é convertido a ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercaptopurina pela ação da enzima PNP (purina nucleosídeo fosforilase). Dessa forma, a atividade ATPásica das Hsp90 de *P. falciparum* e *L. braziliensis* foi avaliada através da análise da concentração de fosfato liberado pela hidrólise do ATP por minuto e a leitura foi realizada no leitor de placa *Varioskan Lux (Thermo Scientific)* no comprimento de onda de 360 nm.

Através de uma curva padrão, com quantidades conhecidas de Pi, pôde-se determinar a quantidade liberada de fosfato. O valor do branco (ausência de Hsp90) foi descontado das duplicatas. Os valores de K_M e V_{MAX} foram obtidos utilizando-se um *fitting* não linear da categoria sigmoideal e função Hill, através do programa *OriginPro 8,0*. A constante catalítica (K_{CAT}) foi determinada dividindo-se o valor de V_{MAX} pela quantidade de enzima total.

1.4.12 Inibição da atividade ATPásica por GA e radicicol

Os ensaios de inibição da atividade ATPásica tanto por GA quanto por radicicol foram realizados nas placas *Greiner UV-Star* com as proteínas na concentração de 1 μM (concentração de monômero), MgCl_2 5 mM, inibidores com concentração variando de 0 a 25 μM e a concentração de DMSO (no caso da GA) e etanol (radicicol) foram fixadas a 2% (v/v). Inicialmente, foi feita a incubação da proteína com os inibidores por 30

minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mM de ATP e outra incubação de 2 horas a 37 °C foi realizada. O kit *EnzChek® Phosphate Assay Kit E-6646 (Molecular Probes)* foi usado para a aferição do fosfato liberado. Os dados foram fitados como uma função dose-resposta pelo programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do IC₅₀ (concentração inibitória 50%).

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 Bioinformática

Primeiramente, as sequências de aminoácidos de todas as proteínas envolvidas neste trabalho foram encontradas utilizando o *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em seguida, foi feita uma análise comparativa utilizando o programa *Sednterp*, que evidenciou parâmetros como ϵ em 280 nm, pI e massa molecular destas proteínas. Esta análise comparativa pode ser observada na Tabela 6.

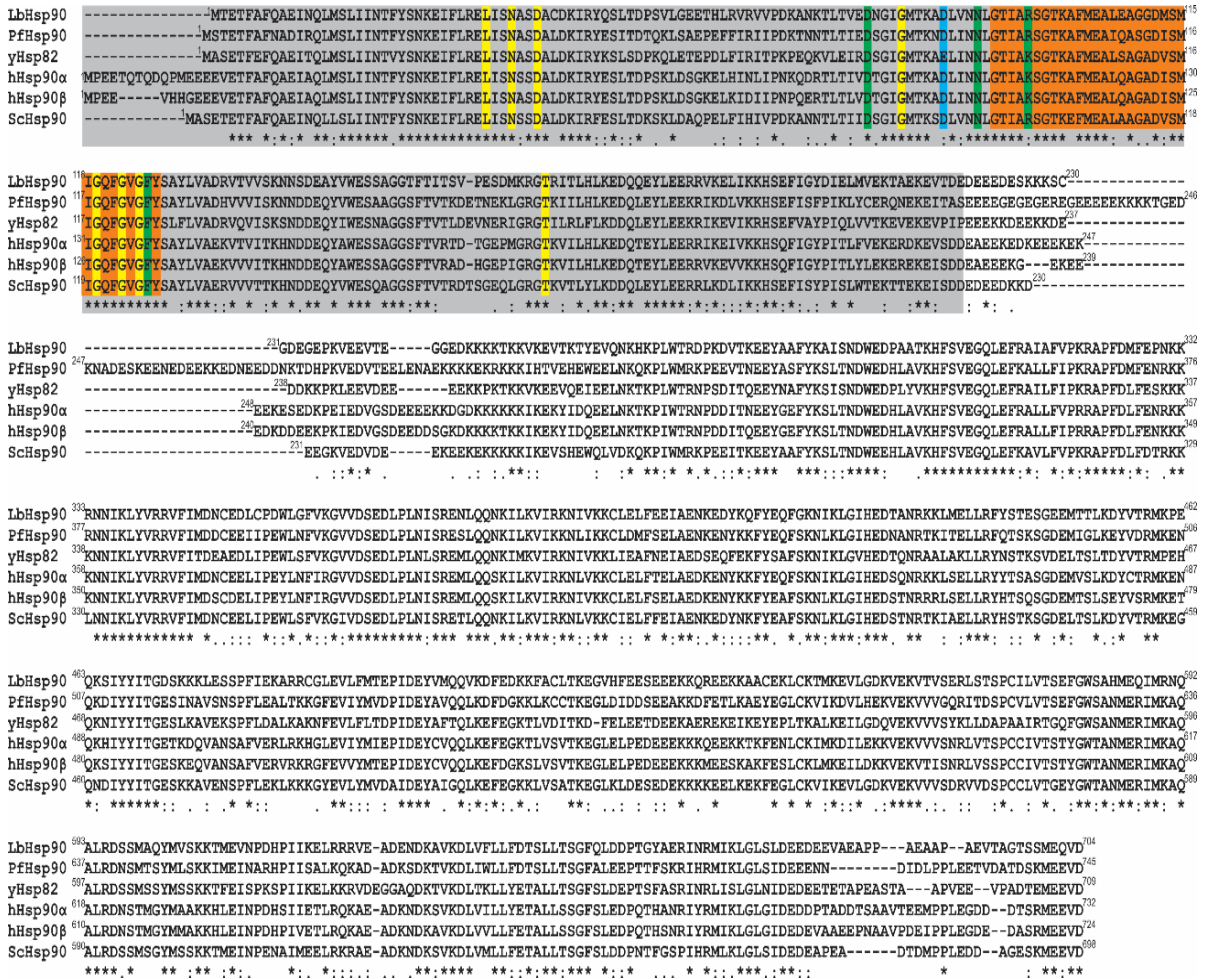
Tabela 6 - Análise comparativa dos parâmetros encontrados pelo *Sednterp* para as proteínas. Na tabela são mostrados: massa molecular, ponto isoelétrico, número de resíduos de triptofanos, tirosinas, cisteínas e o ϵ em 280 nm. As *His-tags* conferidas pelos vetores foram computadas nas sequências porque não foram posteriormente retiradas nos experimentos.

Proteína	MM (Da)	pI	W	Y	C	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
LbHsp90 (XP_001567804.1)	82826	5,48	5	20	10	57300
PfHsp90(XP_001348998.1)	88330	5,30	7	19	7	66810
yHsp82 (NP_015084.1)	84375	5,12	5	24	-	63260
hHsp90 α (NP_005339.3)	87628	5,22	4	29	7	65210
hHsp90 β (NP_031381.2)	86206	5,25	4	28	6	63720
ScHsp90 (AGC60019.1)	82284	5,34	7	21	5	69790
LbHsp90N (resíduos 1-221)	26967	5,37	1	7	1	15930
yHsp82N (resíduos 1-220)	27612	5,65	1	7	-	15930
hHsp90 β N (resíduos 1-223)	27365	5,83	1	8	-	17420

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, as sequências foram alinhadas utilizando o *software Clustal ômega* e o resultado do alinhamento pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Alinhamento das proteínas Hsp90 de *L. braziliensis*, *P. falciparum*, *S. cerevisiae*, isoformas α e β humanas e *Saccharum sp.* Em cinza estão realçadas as sequências correspondentes aos DNTs dessas proteínas; em amarelo estão resíduos que interagem diretamente com os nucleotídeos adenosina; em verde são os resíduos que interagem com os nucleotídeos adenosina através de moléculas de água; em azul são resíduos de Asp conservados (em yHsp82 ele é substituído por Glu) e em laranja é mostrado o *lid*, que é a região que se fecha sobre o ATP durante a dimerização da proteína para a hidrólise do ATP ocorra.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Usando as sequências, foram construídas tabelas da identidade de sequência entre as proteínas Hsp90 ortólogas, tanto completas quanto somente os DNTs (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Identidade de seqüências entre as Hsp90 de diferentes organismos. As Hsp90 ortólogas de *S. cerevisiae*, *L. braziliensis*, *P. falciparum*, *Saccharum sp.* e isoformas α e β humanas apresentam identidade que varia entre 60% e 70%.

Proteína	yHsp82	LbHsp90	hHsp90 α	hHsp90 β	PfHsp90	ScHsp90
yHsp82	100%	-	-	-	-	-
LbHsp90	62%	100%	-	-	-	-
hHsp90α	62%	65%	100%	-	-	-
hHsp90β	63%	64%	87%	100%	-	-
PfHsp90	62%	65%	68%	68%	100%	-
ScHsp90	66%	67%	72%	71%	73%	100%

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Identidade de seqüências do DNT da Hsp90 de *S. cerevisiae*, *L. braziliensis*, *L. major* e isoforma β humana. A identidade de seqüências para o DNT da Hsp90 desses organismos varia entre 66% e 94%.

Domínio N-terminal	yHsp82N	LbHsp90N	LmHsp90N	hHsp90 β N
yHsp82N	100%	-	-	-
LbHsp90N	66%	100%	-	-
LmHsp90N	68%	94%	100%	-
hHsp90βN	69%	70%	71%	100%

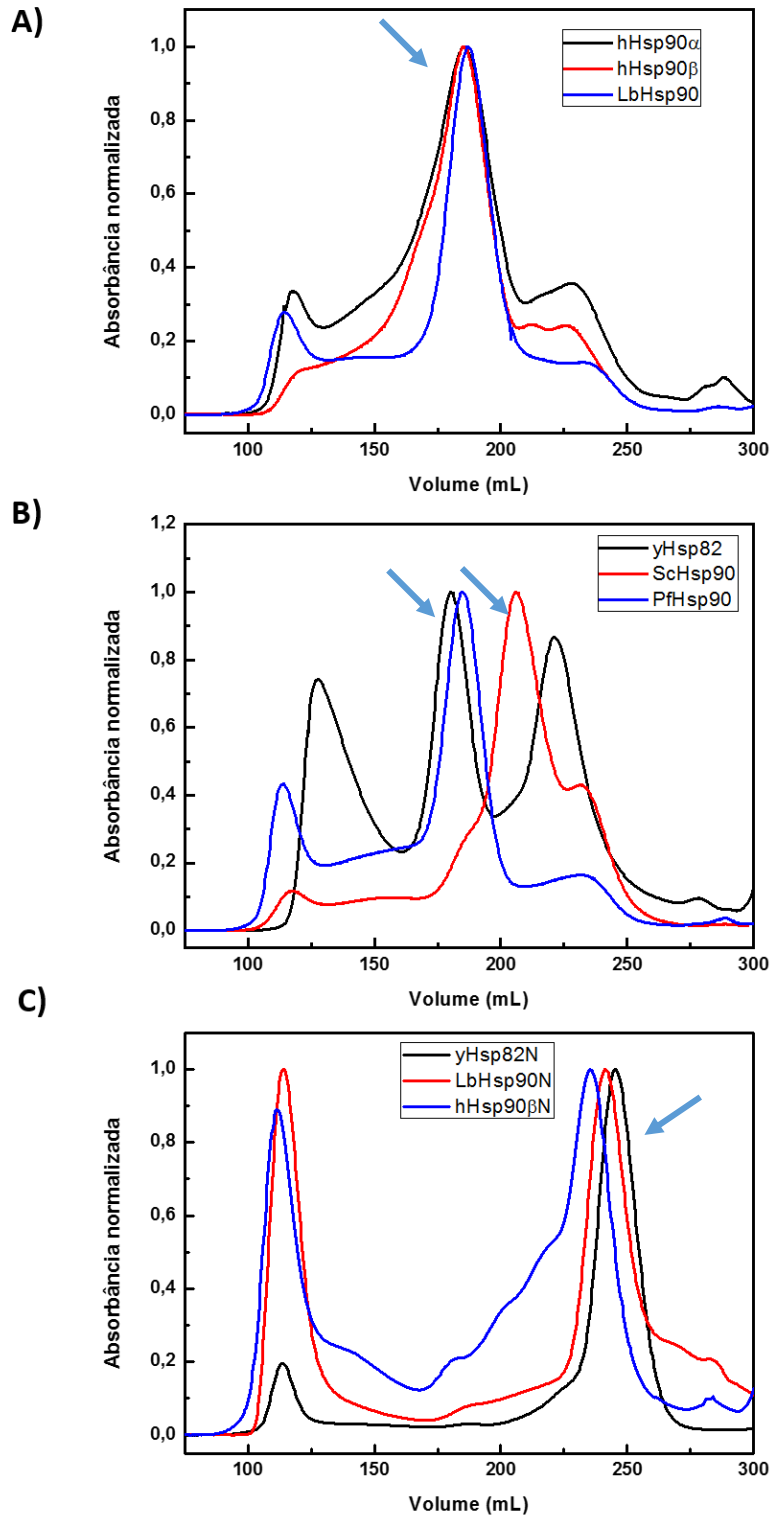
Fonte: Autoria própria.

Portanto, pode-se notar que a identidade entre essas proteínas é bastante alta, em torno de 60% a 70% para as proteínas completas e, para o caso dos domínios das humanas e para as de *L. major* e *L. braziliensis*, por exemplo, ela chega até a 94%. Estes valores mostram que o desenvolvimento de inibidores seletivos é um desafio, uma vez que eles interagem com afinidades semelhantes com as Hsp90 ortólogas devido à poucas diferenças nas estruturas destas últimas. Além disto, os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os nucleotídeos são conservados (Figura 6).

1.5.2 Expressão e purificação

Após a análise de seqüências, as proteínas foram expressas e purificadas. O último passo das purificações foi a CEM preparativa usando a coluna *Superdex 200 26/60* (*GE Healthcare Life Sciences*). As proteínas completas foram eluídas no volume aproximado de 180 mL, enquanto os DNTs eluíram em torno de 240 mL, como pode ser observado na Figura 7. Logo, foram observados picos referentes ao volume morto da coluna em torno de 120 mL e um segundo pico referente às proteínas, que foi coletado e utilizado para os SDS-PAGE. A proteína de *Saccharum sp.* foi a exceção, pois foi eluída em um volume de aproximadamente 215 mL (Figura 7B), sugerindo uma estrutura mais compacta em relação as demais Hsp90.

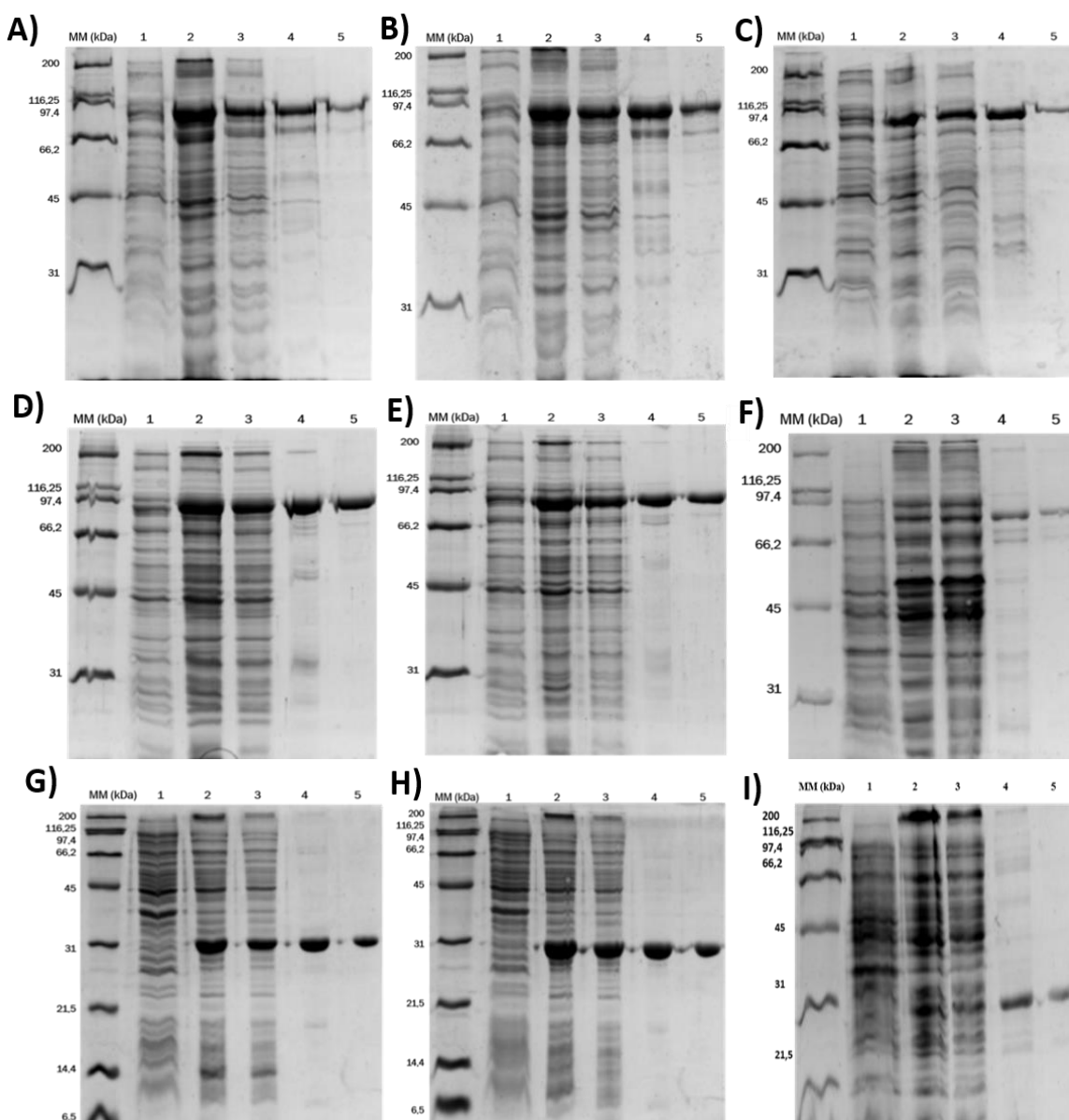
Figura 7 - Cromatogramas das eluições na coluna de cromatografia de exclusão molecular das proteínas e os DNTs. A) Cromatogramas da purificação das proteínas hHsp90 α , hHsp90 β e LbHsp90. B) Cromatogramas das proteínas yHsp82, ScHsp90 e PfHsp90. C) Cromatogramas da purificação das proteínas yHsp82N, LbHsp90N e hHsp90 β N. Os picos utilizados para os experimentos estão indicados por setas.



Fonte: Autoria própria.

A eficácia das purificações foi avaliada através de SDS-PAGE 10% para as proteínas completas e SDS-PAGE 15% para os DNTs. Em todos os casos, as proteínas foram obtidas com alto grau de pureza. As proteínas completas são observadas como bandas de aproximadamente 90 kDa e os domínios, aproximadamente 26 kDa (Figura 8).

Figura 8 - SDS-PAGE das frações das purificações das proteínas. Para as proteínas completas, o SDS-PAGE 10% foi usado, e para os domínios, SDS-PAGE 15%, todos corados com *coomassie blue*. Em todos os casos, MM representa o padrão de massa molecular; 1- Fração não induzida; 2- Fração induzida; 3- Sobrenadante; 4- Eluato da cromatografia de afinidade ao níquel; 5- Eluato da cromatografia de exclusão molecular. A) hHsp90 α , B) hHsp90 β , C) yHsp82, D) PfHsp90, E) LbHsp90, F) ScHsp90, G) LbHsp90N, H) yHsp82N e I) hHsp90 β N.



Fonte: Autoria própria.

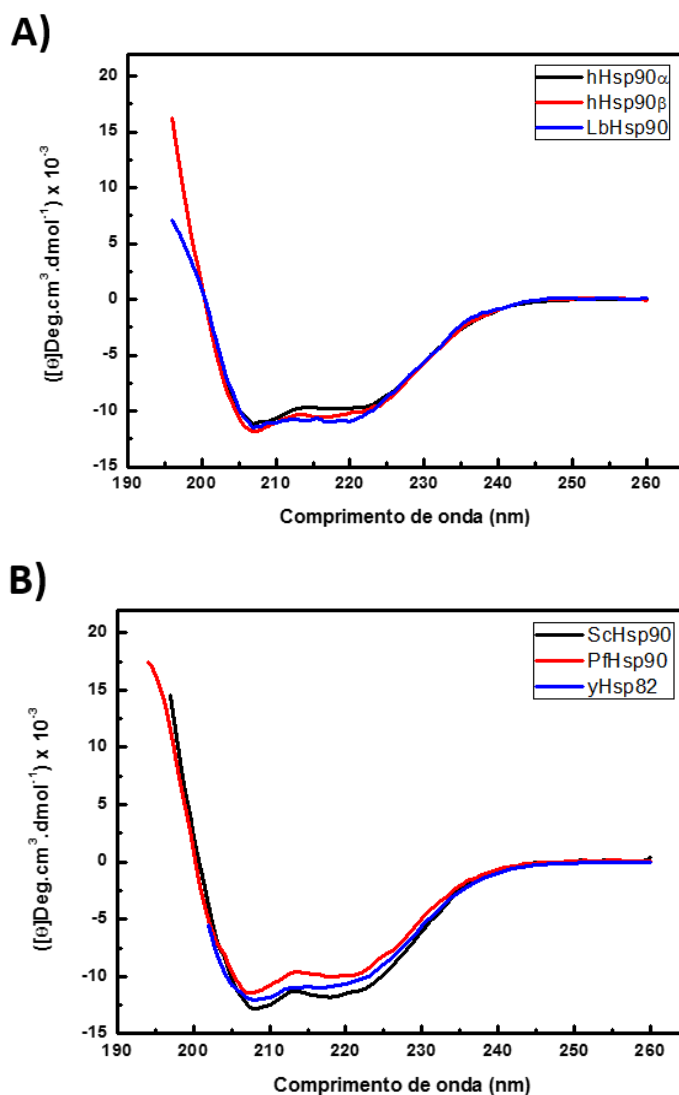
Após as purificações, a concentração das proteínas foi medida por espectrofotometria a 280 nm utilizando os coeficientes de extinção molar mostrados na

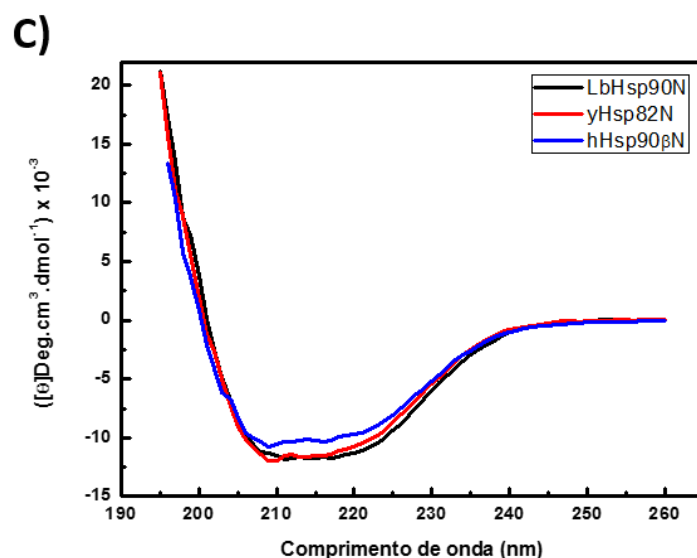
Tabela 6. Em média, as proteínas completas apresentaram rendimento médio variando de 4-8 mg de proteína por litro de cultura. Os domínios apresentaram rendimento médio que variou de 13 a 15 mg por litro de cultura.

1.5.3 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

Com o objetivo de fazer o controle de qualidade e mensurar os tipos de estruturas secundárias presentes nas proteínas, foram feitos testes de espectropolarimetria de dicroísmo circular no UV distante. Os dados foram compilados e estão representados na Figura 9 e Tabela 9.

Figura 9 - Análise da estrutura secundária por espectropolarimetria de dicroísmo circular. Os experimentos foram feitos com as proteínas na concentração de 15 μM . A) hHsp90 α , hHsp90 β e LbHsp90. B) Hsp82, PfHsp90 e ScHsp90. C) LbHsp90N, yHsp82N e hHsp90 β N.





Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 – Resultados da deconvolução dos espectros de CD. Os espectros obtidos foram analisados pelo *software CDNN Deconvolution*, que fez a predição de estruturas secundárias presentes em cada uma das proteínas.

Proteína	α -hélice (%)	Folhas β (%)
hHsp90α	33	17
hHsp90β	33	17
yHsp82	34	16
PfHsp90	34	17
LbHsp90	34	17
ScHsp90	39	14
LbHsp90N	36	16
yHsp82N	35	16
hHsp90βN	33	17

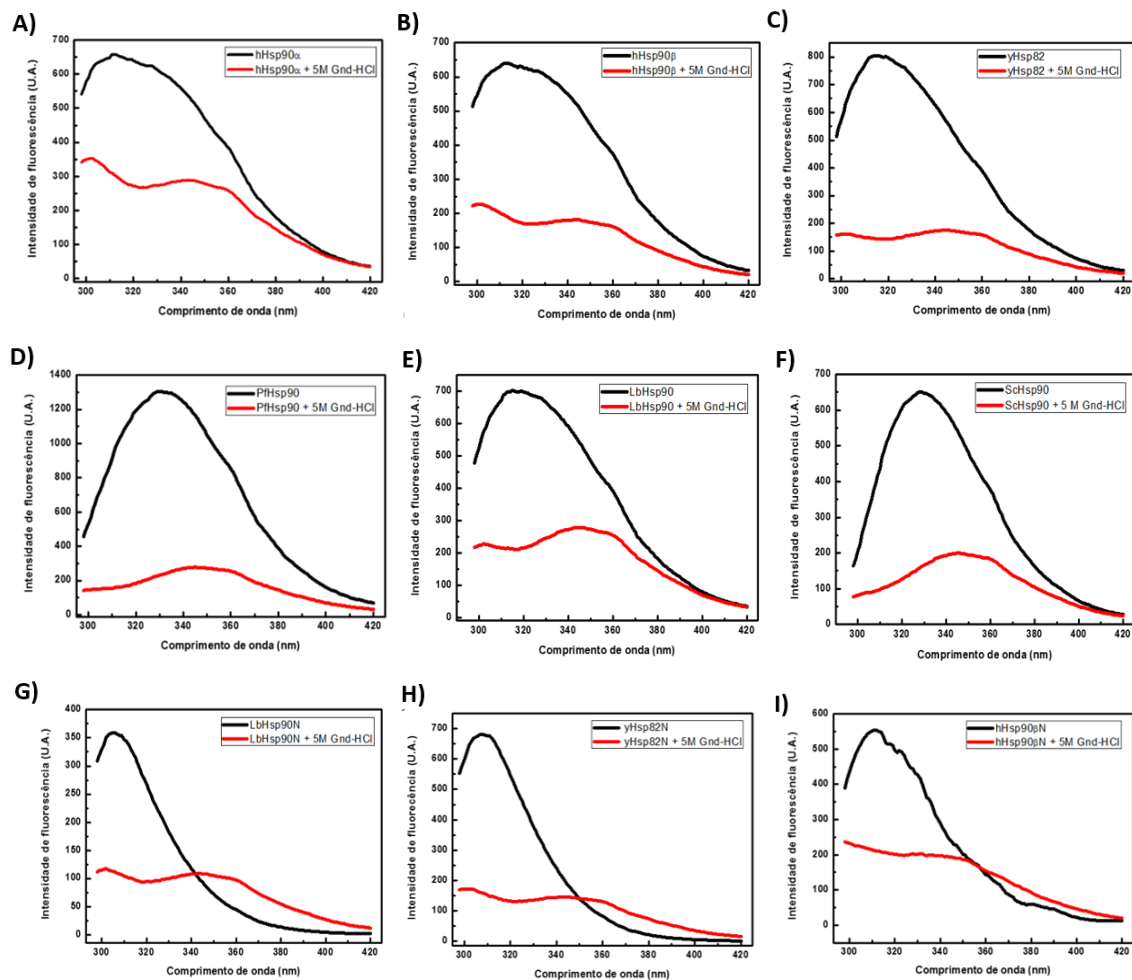
Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que todas as proteínas apresentaram em torno de 33-39% de α -hélices e aproximadamente 17% de folhas β . Estes valores são compatíveis com os encontrados na literatura para esta família de proteínas (Meyer *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013b).

1.5.4 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para verificar a presença de estruturas terciárias locais de onde estão inseridos os triptofanos das proteínas. Os espectros de fluorescência podem ser observados na Figura 10.

Figura 10- Espectroscopia de fluorescência das proteínas. O λ_{exc} escolhido foi 280 nm e os experimentos foram feitos na presença e ausência de 5 M de Gnd-HCl. A) hHsp90 α ; B) hHsp90 β ; C) yHsp82; D) PfHsp90; E) LbHsp90; F) ScHsp90; G) LbHsp90N; H) yHsp82N e I) hHsp90 β N.



Fonte: Autoria própria.

Os dados foram analisados conforme o que foi descrito na seção materiais e métodos. O λ_{MAX} e o $\langle \lambda \rangle$ foram calculados na presença e ausência de 5 M de Gnd-HCl e estão representados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10- Espectroscopia de fluorescência para as proteínas na ausência de Gnd-HCl com excitação em 280 nm. A tabela mostra o $\langle\lambda\rangle$ e o λ_{MAX} para as proteínas hHsp90 α , hHsp90 β , yHsp82, PfHsp90, LbHsp90, LbHsp90N, ScHsp90, yHsp82N e hHsp90 β N.

Proteína	$\langle\lambda\rangle$ (nm)	λ_{MAX} (nm)
hHsp90 α	337,3 \pm 0,1	311 \pm 1
hHsp90 β	337,3 \pm 0,1	312 \pm 1
PfHsp90	341,5 \pm 0,1	331 \pm 1
LbHsp90	337,2 \pm 0,1	319 \pm 1
yHsp82	335,6 \pm 0,1	314 \pm 1
ScHsp90	340,3 \pm 0,2	329 \pm 1
yHsp82N	322,1 \pm 0,1	307 \pm 1
LbHsp90N	322,2 \pm 0,1	306 \pm 1
hHsp90 β N	329,2 \pm 0,3	312 \pm 1

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Espectroscopia de fluorescência para as proteínas na presença de 5 M de Gnd-HCl com excitação em 280 nm. A tabela mostra o $\langle\lambda\rangle$ e o λ_{MAX} para as proteínas hHsp90 α , hHsp90 β , yHsp82, PfHsp90, LbHsp90, ScHsp90, LbHsp90N, yHsp82N e hHsp90 β N.

Proteína + 5 M Gnd-HCl	$\langle\lambda\rangle$	λ_{MAX} (nm)
hHsp90 α	342,4 \pm 0,1	344 \pm 1
hHsp90 β	342,1 \pm 0,1	343 \pm 1
PfHsp90	349,1 \pm 0,1	345 \pm 1
LbHsp90	346,2 \pm 0,1	344 \pm 1
yHsp82	345,0 \pm 0,1	344 \pm 1
ScHsp90	350,2 \pm 0,1	346 \pm 1
yHsp82N	342,7 \pm 0,1	343 \pm 1
LbHsp90N	343,7 \pm 0,2	343 \pm 1
hHsp90 β N	341,4 \pm 0,2	343 \pm 1

Fonte: Autoria própria.

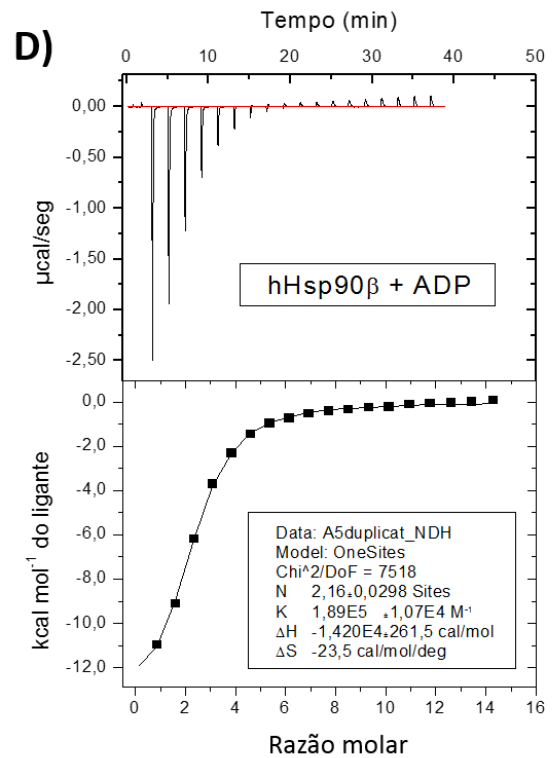
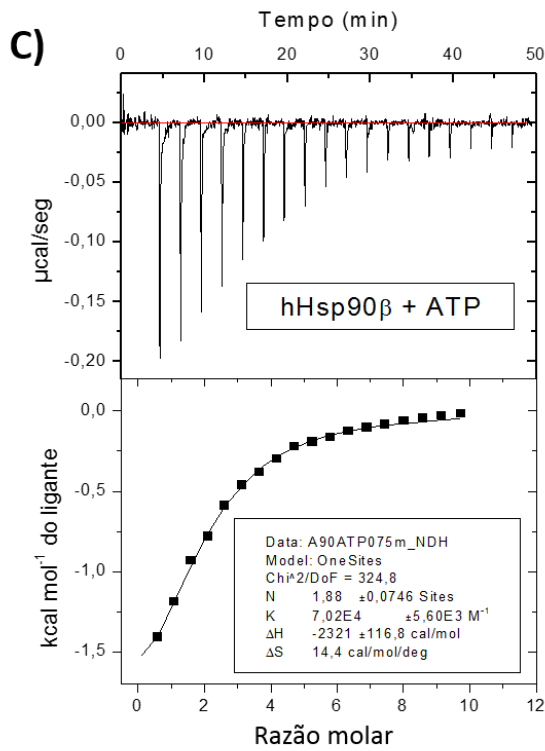
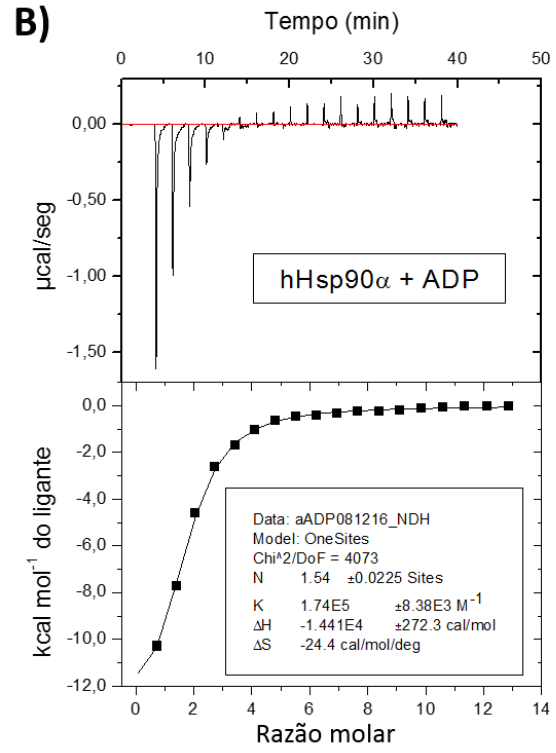
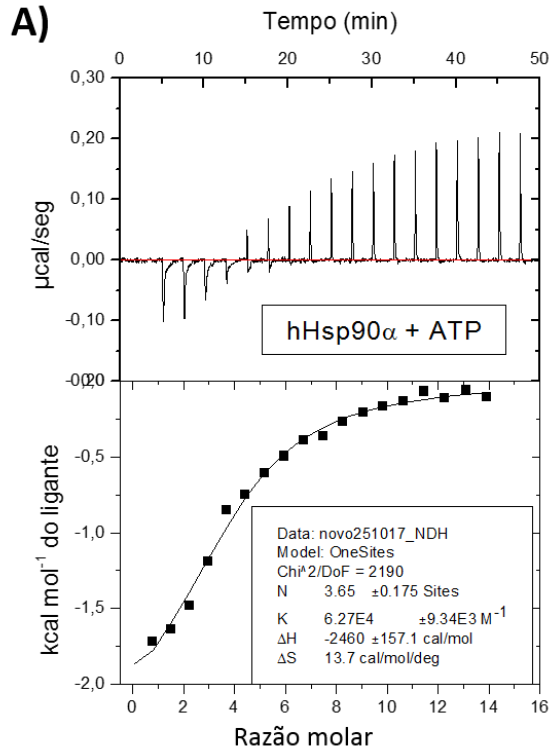
Os valores obtidos para a proteína de *L. braziliensis* estão de acordo com (Silva *et al.*, 2013), mostrando que o triptofano presente do domínio N-terminal desta proteína encontra-se enterrado. O mesmo acontece para as proteínas hHsp90 β N e yHsp82N. Para as proteínas completas, os valores indicam que, na média, os triptofanos encontram-se parcialmente expostos ao solvente. No entanto, devido à excitação em 280 nm, alguns dos espectros de emissão de fluorescência mostram a influência considerável das tirosinas, que são numerosas (>20) em várias das Hsp90 estudadas.

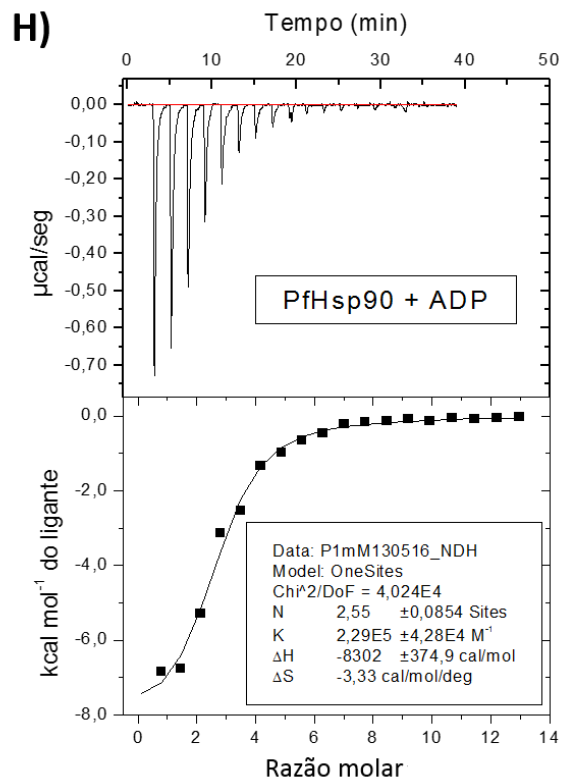
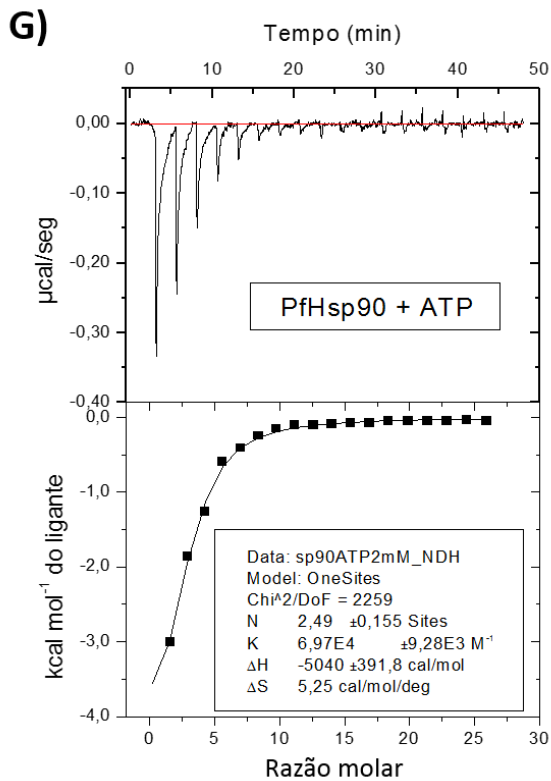
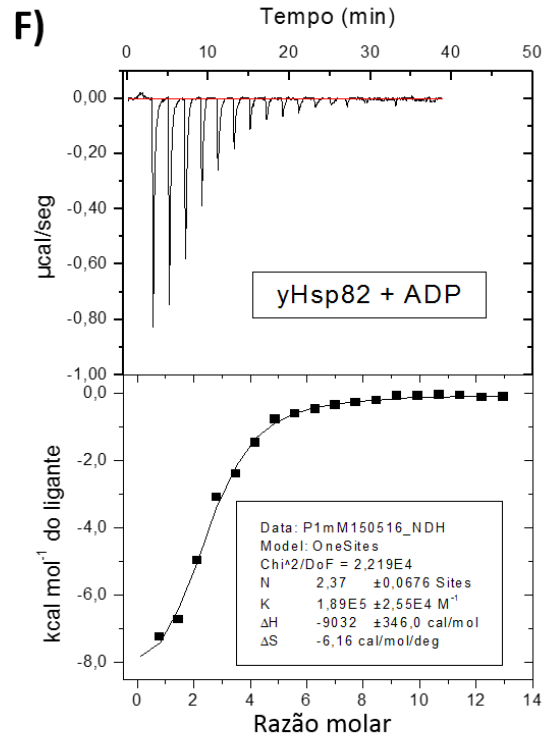
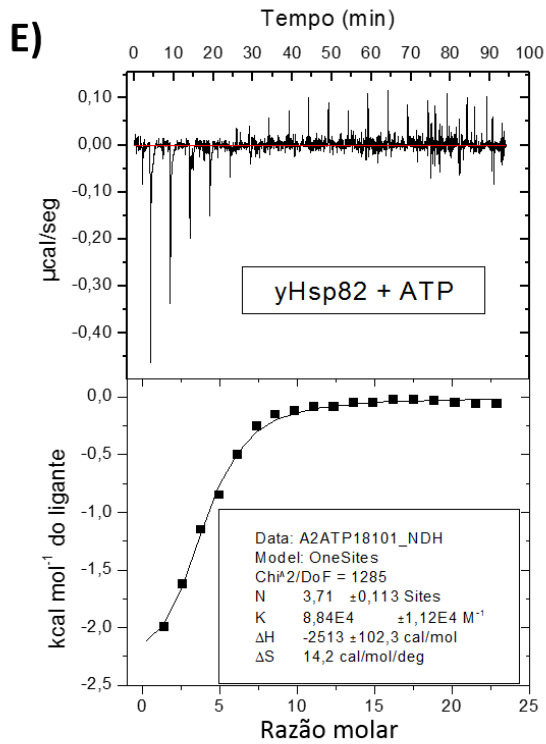
Na presença do agente desnaturante, os picos sofreram supressão de fluorescência e deslocaram-se para comprimentos de onda maiores, indicando que as proteínas se desnaturaram, expondo os triptofanos ao solvente. Desse modo, pode-se concluir que as proteínas estavam enoveladas, apresentando estrutura terciária local.

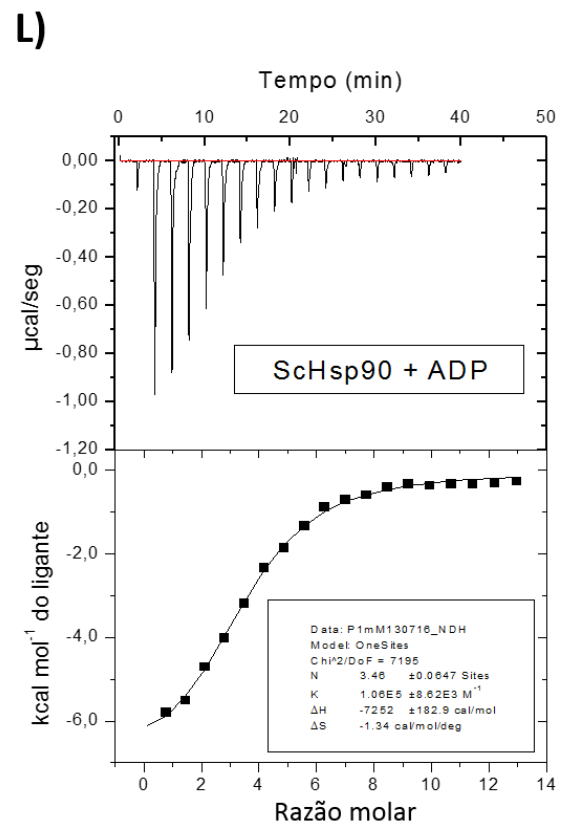
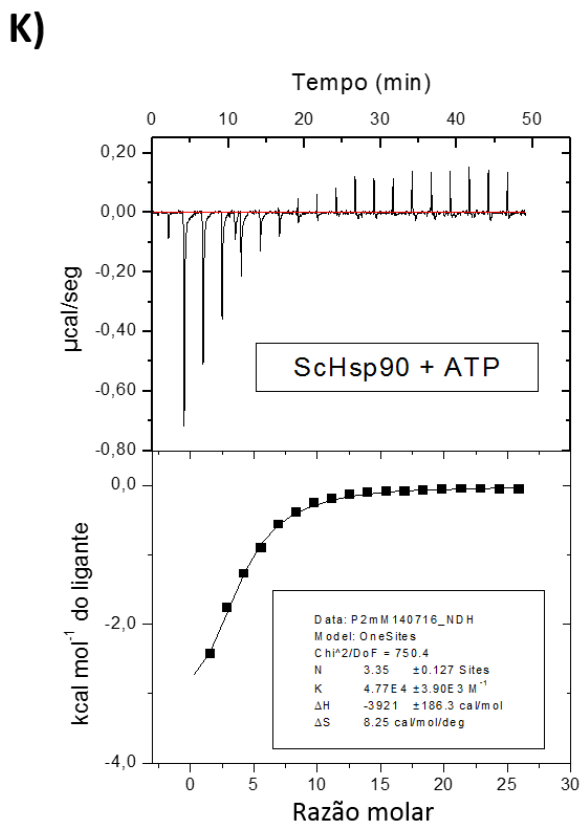
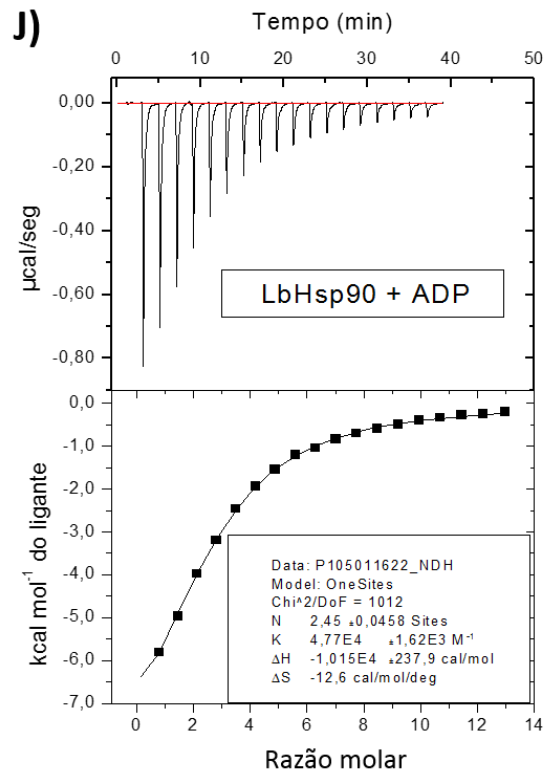
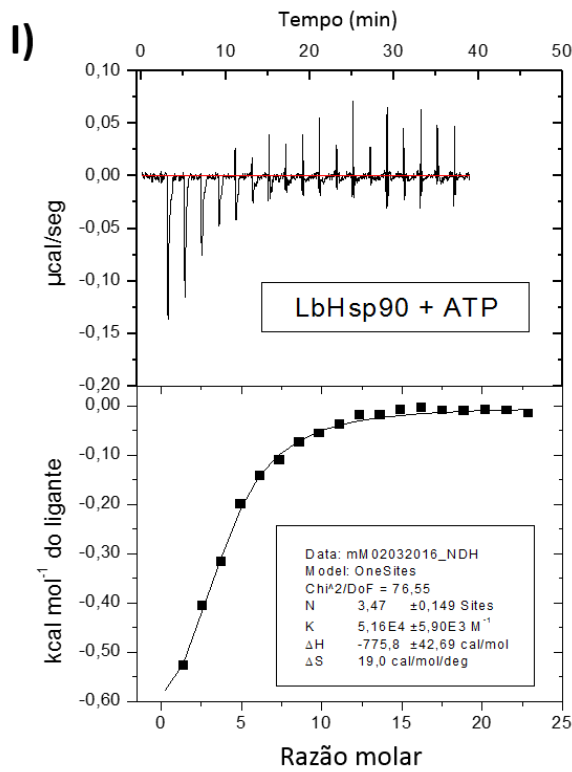
1.5.5 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica

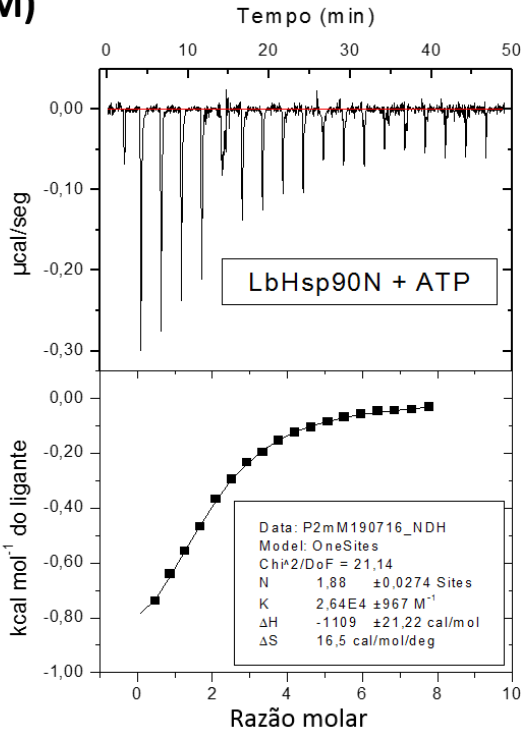
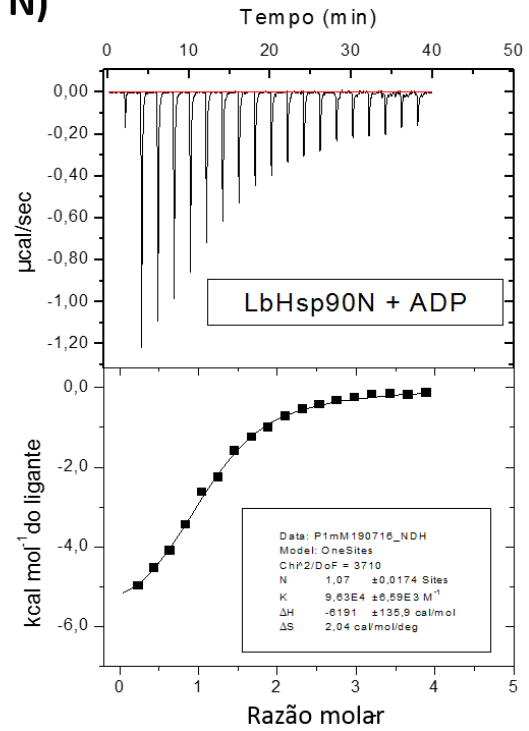
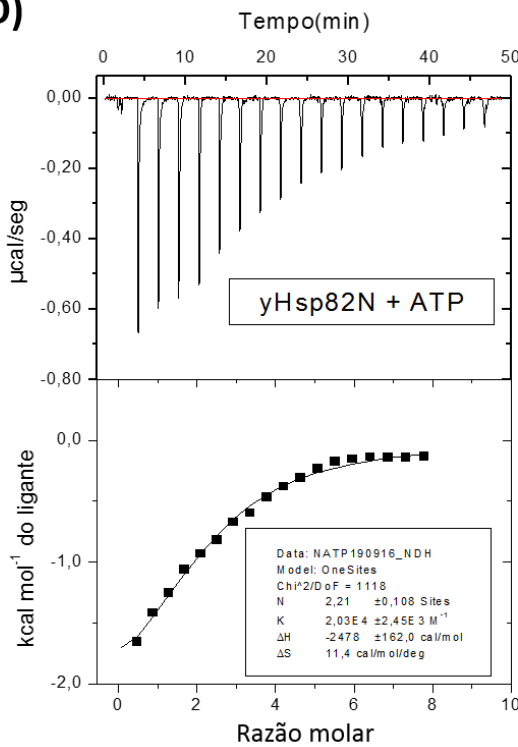
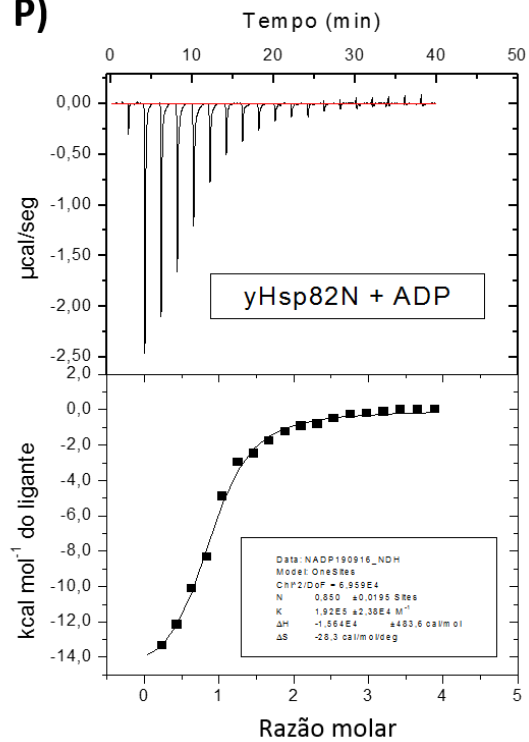
A calorimetria de titulação isotérmica foi utilizada para a obtenção de parâmetros termodinâmicos da interação das seis diferentes Hsp90s, bem como 3 DNTs de algumas delas, com os ligantes ATP e ADP. Os isotermogramas das interações podem ser observados na Figura 11.

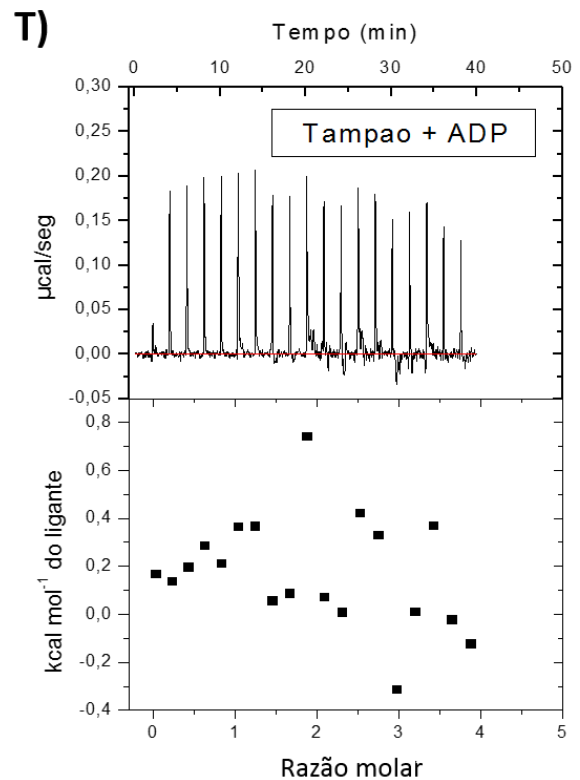
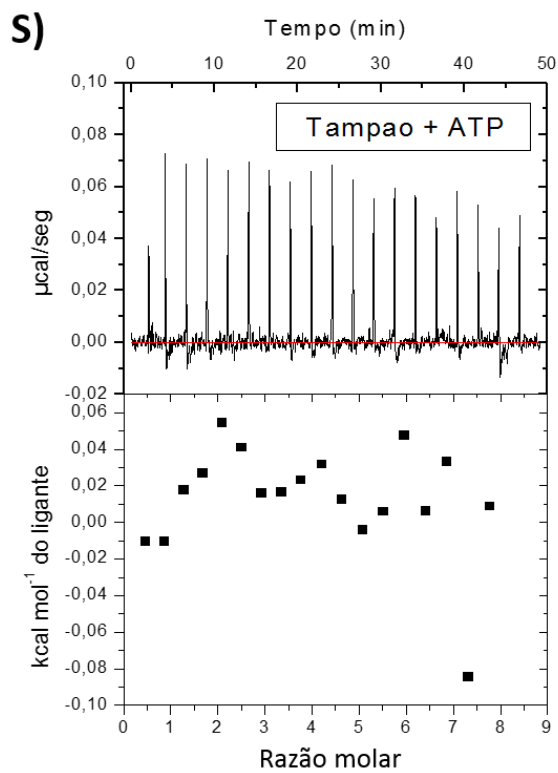
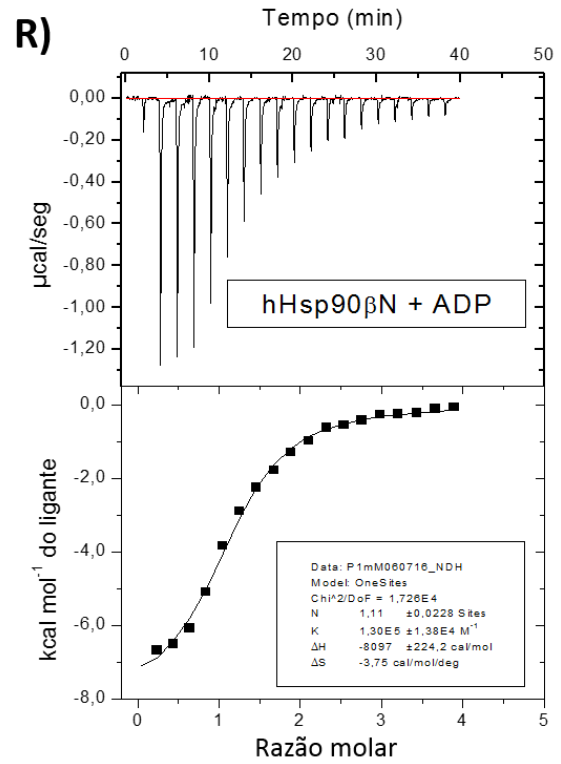
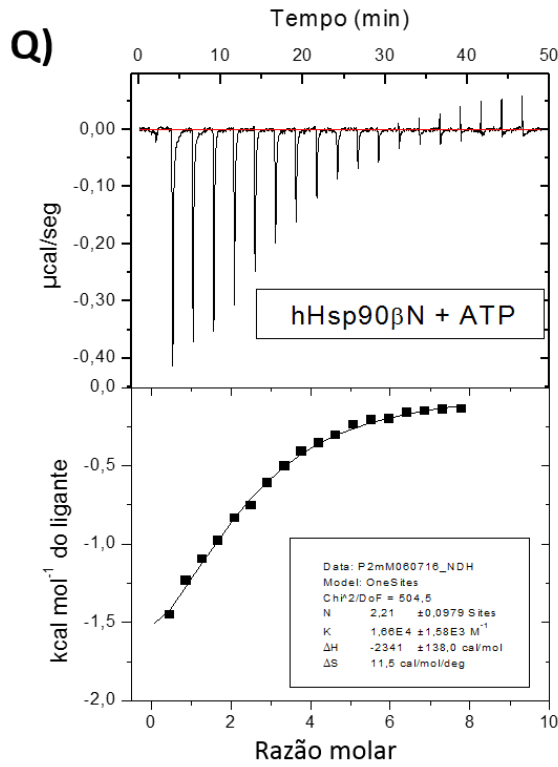
Figura 11 - Isotermogramas obtidos através da calorimetria de titulação isotérmica para diferentes proteínas. A) Interação da hHsp90 α com ATP, B) Interação da hHsp90 α com ADP, C) Interação da hHsp90 β com ATP, D) Interação da hHsp90 β com ADP, E) Interação da yHsp82 com ATP, F) Interação da yHsp82 com ADP, G) Interação da PfHsp90 com ATP, H) Interação da PfHsp90 com ADP, I) Interação da LbHsp90 com ATP, J) Interação da LbHsp90 com ADP, K) Interação da ScHsp90 com ATP, L) Interação da ScHsp90 com ADP, M) Interação da LbHsp90N com ATP, N) Interação da LbHsp90N com ADP, O) Interação da yHsp82N com ATP, P) Interação da yHsp82N com ADP, Q) Interação da hHsp90 β N com ATP, R) Interação da hHsp90 β N com ADP, S) Isotermograma típico da interação do tampão Hepes 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM, com ATP e ADP. O inserto apresenta os melhores parâmetros de ajuste obtidos para a replicata experimental/biológica.







M)**N)****O)****P)**



Fonte: Autoria própria.

Primeiramente, é importante abordar a escolha do uso de ATP em vez de um análogo não hidrolisável, uma vez que um calorímetro de titulação isotérmica também pode ser usado para monitorar a cinética de enzimas (Todd e Gomez, 2001; Bianconi,

2003). Quando usado desta maneira, o calor (Q) envolvido na conversão de n moles do substrato (S) em produto (P) pode ser expresso como $Q = n\Delta H = [P]_{\text{Total}}V_{\text{cel}}\Delta H$, onde ΔH é a entalpia da reação (em cal.mol^{-1} de S). Portanto, a quantidade de Q gerada pode representar a presença de catálise enzimática. No entanto, para este cálculo, a atividade enzimática precisa ser maior do que $0,007 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{mol}^{-1}.\text{seg}^{-1}$ ($0,42 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) em 10% da V_{MAX} (Todd e Gomez, 2001), o que é muito maior do que os valores relatados para as Hsp90 devido à sua baixa atividade ATPásica (Pallavi *et al.*, 2010; Krukenberg *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013a; Silva *et al.*, 2018) e monitorados aqui. Além disso, experimentos de ITC com Hsp90s e DNTs também indicaram que sob condições similares, houve uma maior liberação de calor em titulações com ADP do que naquelas com ATP. Além disso, as titulações de ATP com construções dos DNTs, que não possuem atividade ATPásica, produziram valores similares aos das proteínas completas. Assim, a hidrólise de ATP realizada pelas Hsp90s nas condições testadas seria inexistente ou desprezível, produzindo calor semelhante ao da linha de base (Borges e Ramos, 2006; Dores-Silva *et al.*, 2015). O controle de qualidade feito para o ATP, para o monitoramento da hidrólise espontânea, foi realizado antes dos experimentos (dados não mostrados). Os dados mostraram que todas as interações entre proteínas e ligantes foram exotérmicas (picos negativos), diferentemente do comportamento do tampão, que é endotérmico (picos positivos). Também se observa que a interação com ADP é mais exotérmica do que a interação com ATP. Para cada uma das proteínas, a média de pelo menos 3 experimentos foi realizada considerando replicatas experimentais e/ou biológicas e, juntamente com a Equação 5, os parâmetros das Tabelas 12 e 13 foram determinados para as interações com ATP e ADP, respectivamente, e os resultados são mostrados na Figura 12.

Tabela 12- Parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica para as interações das diferentes proteínas com ATP.

Proteína com ATP	n	ΔH_{app} (kcal.mol^{-1})	K_A ($10^{-3}.\text{mol.L}^{-1}$)	ΔG_{app} (kcal.mol^{-1})	K_D (μM)
hHsp90 α	$3,5 \pm 0,3$	$-2,5 \pm 0,4$	65 ± 8	$-6,6 \pm 0,1$	$15,0 \pm 2,0$
hHsp90 β	$2,8 \pm 0,8$	$-2,3 \pm 0,1$	72 ± 3	$-6,6 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,5$
yHsp82	$3,5 \pm 0,5$	$-2,5 \pm 0,4$	90 ± 7	$-6,8 \pm 0,1$	$11,7 \pm 0,4$
LbHsp90	$3,5 \pm 0,5$	$-0,9 \pm 0,2$	52 ± 5	$-6,4 \pm 0,1$	$19,0 \pm 2,0$
PfHsp90	$2,9 \pm 0,4$	$-4,8 \pm 0,2$	90 ± 20	$-6,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 5,0$
ScHsp90	$4,0 \pm 0,9$	$-3,8 \pm 0,3$	47 ± 3	$-6,4 \pm 0,1$	$21,0 \pm 1,0$
hHsp90 β N	$1,8 \pm 0,4$	$-2,2 \pm 0,1$	19 ± 5	$-5,8 \pm 0,2$	$60,0 \pm 10,0$
yHsp82N	$2,3 \pm 0,3$	$-2,5 \pm 0,4$	24 ± 5	$-6,0 \pm 0,1$	$40,0 \pm 10,0$
LbHsp90N	$1,7 \pm 0,4$	$-1,1 \pm 0,3$	40 ± 20	$-6,2 \pm 0,3$	$30,0 \pm 10,0$

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica para as interações das diferentes proteínas com ADP.

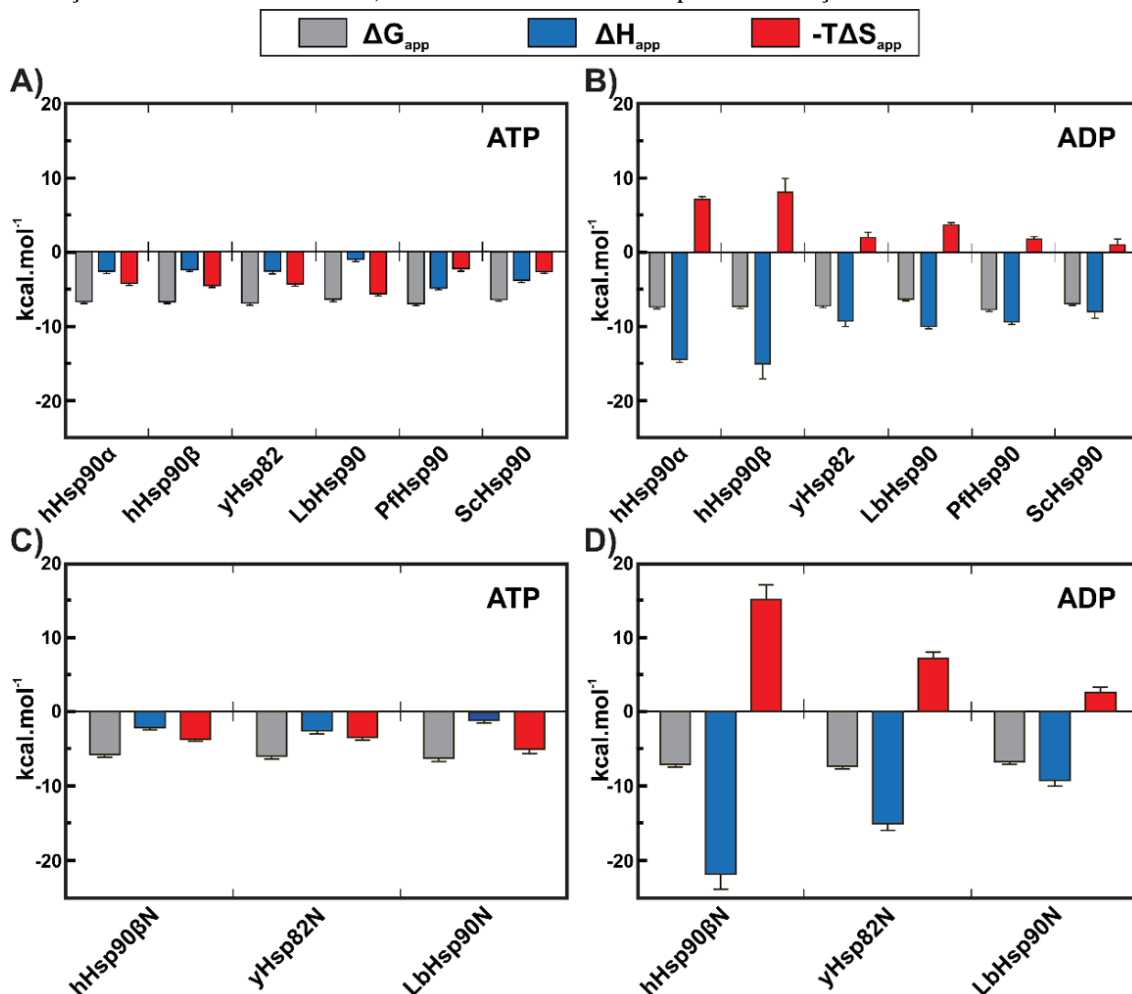
Proteína com ADP	n	ΔH_{app} (kcal.mol⁻¹)	K_A (10⁻³.mol.L⁻¹)	ΔG_{app} (kcal.mol⁻¹)	K_D (μM)
hHsp90 α	1,5 \pm 0,1	-14,4 \pm 0,4	200 \pm 30	-7,2 \pm 0,1	5,2 \pm 0,8
hHsp90 β	2,0 \pm 0,5	-15,0 \pm 2,0	180 \pm 10	-7,2 \pm 0,1	5,6 \pm 0,4
yHsp82	2,4 \pm 0,3	-9,2 \pm 0,8	200 \pm 9	-7,2 \pm 0,1	5,0 \pm 0,4
LbHsp90	2,4 \pm 0,2	-10,0 \pm 0,3	45 \pm 4	-6,3 \pm 0,1	22,0 \pm 2,0
PfHsp90	2,4 \pm 0,2	-9,4 \pm 0,3	470 \pm 50	-7,7 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2
ScHsp90	2,7 \pm 0,5	-8,0 \pm 0,9	120 \pm 20	-6,9 \pm 0,1	9,0 \pm 2,0
hHsp90 β N	1,0 \pm 0,2	-21,0 \pm 2,0	200 \pm 40	-7,2 \pm 0,2	5,0 \pm 1,0
yHsp82N	0,9 \pm 0,1	-14,0 \pm 1,0	230 \pm 70	-7,3 \pm 0,2	5,0 \pm 1,0
LbHsp90N	1,1 \pm 0,1	-9,2 \pm 0,9	90 \pm 10	-6,8 \pm 0,1	12,0 \pm 2,0

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Como esperado, as estequiometrias para as interações com ADP foram de aproximadamente 2 para todas as Hsp90s, que são dímeros, e foram aproximadamente 1 para os DNTs, que são monômeros. Por outro lado, nas interações com ATP, as estequiometrias com as proteínas completas foram maiores do que 3, sugerindo a possível existência de um segundo tipo de sítio de ligação de ATP na estrutura das Hsp90s. Existem algumas hipóteses para a existência deste sítio de ligação de ATP no domínio C-terminal das Hsp90 (Marcu *et al.*, 2000; Garnier *et al.*, 2002). No entanto, acreditamos que nossos resultados foram devido as condições de titulação, que envolveram altas concentrações de ATP, causando assim ligações não específicas. As titulações de ATP com os DNTs, que são monômeros, também mostraram uma estequiometria de aproximadamente 2. Com relação as tentativas de ajuste das curvas de ITC por modelos de dois sítios de ligação independentes, estas não resultaram em melhorias adicionais nos parâmetros de ajuste (dados não mostrados).

É importante considerar que os experimentos realizados por Garnier e colaboradores (Garnier *et al.*, 2002) foram realizados com menor força iônica, o que poderia favorecer a interação do ATP com o domínio C-terminal da Hsp90. Além disso, estes experimentos indicaram que o ΔH_{app} para a interação do ATP com o sítio de ligação do C-terminal foi cerca de 4 vezes menor do que com a proteína completa. Portanto, se tal interação ocorresse em nossos experimentos, a interação não produziria calor suficiente para alterar o perfil da curva nas titulações calorimétricas realizadas aqui. Deste modo, os valores de ΔH_{app} detectados devem ter origem principalmente do local de ligação de nucleotídeos no DNT.

Figura 12- Assinaturas termodinâmicas das proteínas e DNTs com os nucleotídeos adenosina ATP e ADP. A) Assinatura termodinâmica para as interações das proteínas completas com ATP. B) Assinatura termodinâmica para as interações das proteínas completas com ADP. C) Assinatura termodinâmica para as interações dos DNTs com ATP. D) Assinatura termodinâmica para as interações dos DNTs com ADP.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Observando as Tabelas 12 e 13, e a Figura 12, pode-se notar que o ΔG_{app} foi semelhante em todos os casos, variando de 5,8 a 7,7 kcal.mol⁻¹. O perfil de interação das proteínas completas com ATP foi similar ao obtido com as interações de ATP com os DNTs. Ou seja, as assinaturas termodinâmicas semelhantes para interações de ATP com os DNTs e com as proteínas completas hHsp90 β , yHsp82 e LbHsp90 (Figura 12A e 12C) indicam que os eventos medidos podem estar intimamente relacionados unicamente à interação do ATP com o DNT. Portanto, as alterações conformacionais desencadeadas pela ligação do ATP à Hsp90, que leva a estados intermediários, provavelmente não produziram calor suficiente durante o tempo das medições do calorímetro ou foram desprezíveis, uma vez que a ligação do ligante ocorreu no sítio de ligação do nucleotídeo. A literatura mostra que o ciclo molecular de Hsp90 é direcionado pela ligação e hidrólise

de nucleotídeos e que as mudanças conformacionais durante este ciclo são limitadas no tempo (Hessling *et al.*, 2009; Ratzke, Berkemeier, *et al.*, 2012). Assim, a contribuição das mudanças conformacionais do ciclo das Hsp90 para o calor liberado foi provavelmente desprezível.

Por outro lado, os perfis de interação das proteínas com ADP foram em grande parte impulsionados pela entalpia, com existência de penalidades entrópicas para estas interações tanto nas proteínas completas quanto para os DNTs (Figura 12B e 12D). Normalmente, uma penalidade entrópica surge de um, ou mais do que um, dos seguintes eventos: 1) aprisionamento de água; 2) interação com o ligante; 3) enrijecimento da cadeia lateral dos aminoácidos no local de ligação; 4) alterações conformacionais da proteína devido à ligação do ligante, entre outros (Jelesarov e Bosshard, 1999; Ladbury *et al.*, 2010). Adicionalmente, a ligação do ADP com as Hsp90 completas e com as construções dos DNTs produziu contribuições entálpicas e entrópicas variáveis (Tabela 13), indicando diferenças sutis nos mecanismos de interação e/ou rearranjos conformacionais na ligação ADP:Mg²⁺. Esta observação sugere que a seletividade do ligante para as Hsp90 de protozoários sobre as Hsp90 humanas pode ser mais facilmente alcançada utilizando-se análogos do estado Hsp90-ADP.

Nas interações com o ligante ADP, a contribuição entálpica foi favorável, divergindo da contribuição entrópica, que é desfavorável. Observando o valor de K_D , pode-se deduzir que as proteínas possuem uma afinidade maior pelo ADP do que pelo ATP, sendo a diferença de aproximadamente 3-10 vezes. Porém, *in vivo*, a concentração de ATP é 1 a 2 ordens de grandeza maior do que ADP e isto indica que as proteínas devem estar preferencialmente ligadas ao ATP, apesar da maior afinidade por ADP.

1.5.6 Mapas de interação (*Ligplot*)

A fim de tentar compreender o porquê das diferenças observadas nos experimentos de ITC, o programa *Ligplot* foi utilizado para avaliar, nas estruturas cristalográficas de complexos entre DTNs com ADP e ATP, tanto os resíduos envolvidos na interação com os nucleotídeos adenosina quanto as moléculas de água que participam do processo.

As estruturas usadas para a análise das mudanças conformacionais foram PDB ID 1BYQ e PDB ID 3T0Z para o DNT da isoforma α humana (Hsp90 α N) em complexo com ADP e ATP, respectivamente. Também foram avaliadas as estruturas PDB ID 3U67 e PDB ID 3H80 para o DNT da Hsp90 da *L. major* em complexo com ADP e AMPPNP,

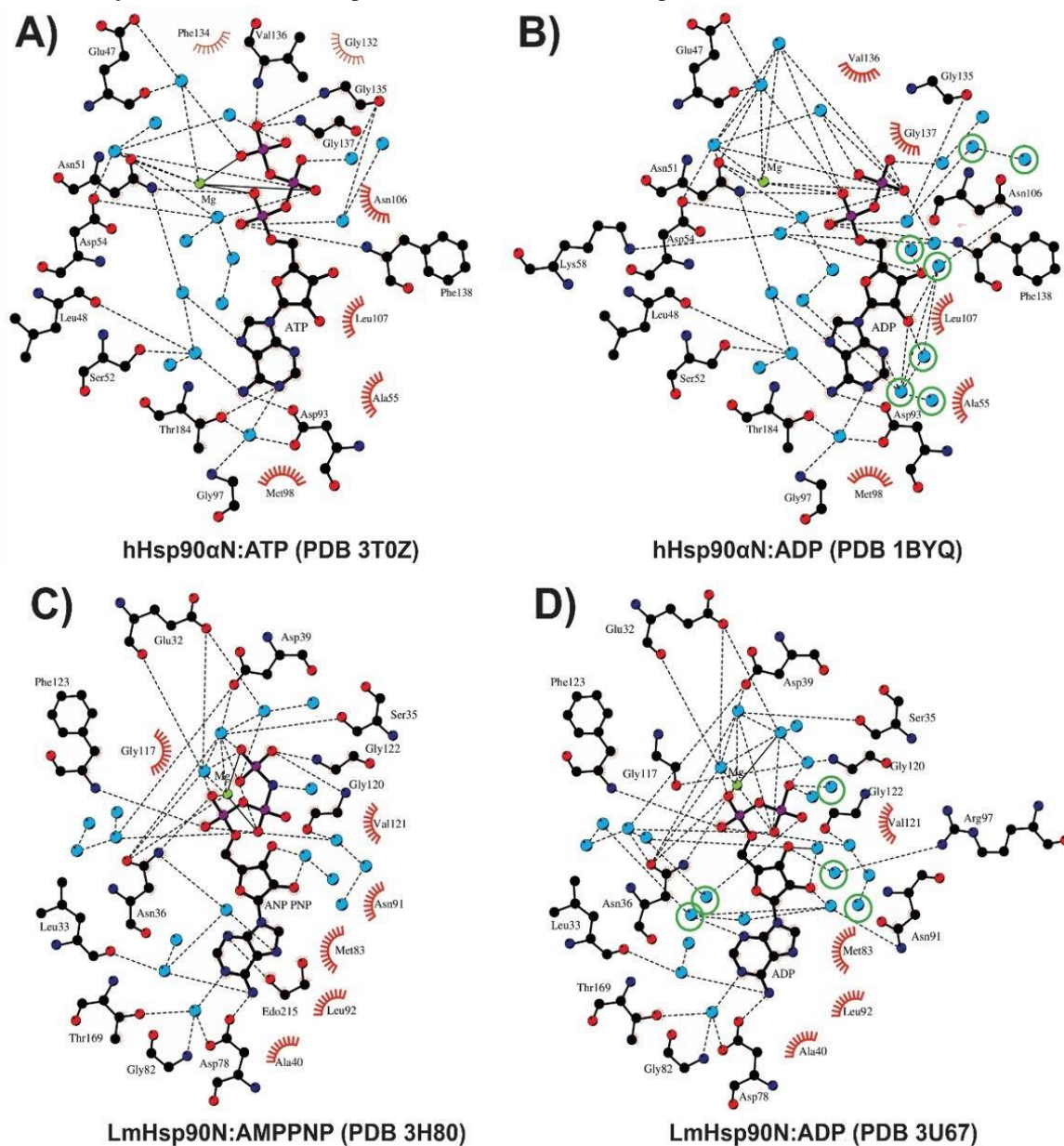
respectivamente. Estas estruturas foram escolhidas pois são as únicas disponíveis no PDB com boa resolução e que mostravam os complexos das proteínas tanto com ADP quanto com ATP ou AMPPNP (um análogo não clivável).

A Figura 13 mostra os resultados das análises utilizando o *Ligplot*. Os pontilhados mostram ligações de hidrogênio e os círculos vermelhos, interações hidrofóbicas. Como pode ser constatado na figura, a rede de interações tanto para as interações com ATP quanto as com ADP são bastante similares. As Figuras 13A e Figura 13C mostram que o fosfato γ apresenta interações que não são observadas nos complexos com ADP (Figura 13B e 13D). Deste modo, seria esperado um custo entrópico para o ATP devido à essas interações eletrostáticas adicionais, o que não vai ao encontro com os dados de ITC. Então, provavelmente uma compensação entrópica-entálpica está ocorrendo nas interações observadas.

Com relação as moléculas de água, há 7 moléculas perto do ADP participantes de ligações de hidrogênio para a hHsp90 α N (Figura 13B), as quais não são observadas para o ATP (Figura 13A). O mesmo acontece para a LmHsp90N em complexo com ADP (Figura 13D), em que são observadas 5 moléculas de água adicionais que não estão presentes na interação com ATP. Estas moléculas são observadas na Figura 13 circuladas em verde.

Os dados sugerem que poderiam ser essas moléculas adicionais, uma vez aprisionadas com o ADP, as causadoras das diferenças nas assinaturas termodinâmicas observadas por ITC. Entretanto, a resolução das estruturas cristalográficas, que é de 1,5 Å para a estrutura 1BYQ; 2,19 Å para a estrutura 3T0Z; 1,77 Å para 3U67 e 2 Å para 3H80, não permite que uma conclusão concreta seja estabelecida. Para isto, recorreu-se à dinâmica molecular, conforme descrito adiante.

Figura 13 - Mapa de interação das interações entre os nucleotídeos adenosina e as proteínas LmHsp90N e hHsp90αN. As moléculas de água são representadas por esferas azuis e os íons Mg^{2+} por esferas verdes. A) e B) 2D da interação dos DNTs de hHsp90α com ATP e ADP, respectivamente. C) e D) 2D da interação dos DNTs de LmHsp90 com AMPPNP e ADP, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

1.5.7 Avaliação das interações através de STD- RMN

A ressonância magnética nuclear do tipo STD (do inglês: *Saturation Transfer Difference*: diferença de transferência de saturação) é bastante utilizada em casos em que se deseja obter informações sobre interação, uma vez que ela é capaz de mostrar os epítomos de interação entre macromoléculas e moléculas menores que estão em regime de troca rápida. Deste modo, é revelado o grau de proximidade de alguns átomos do

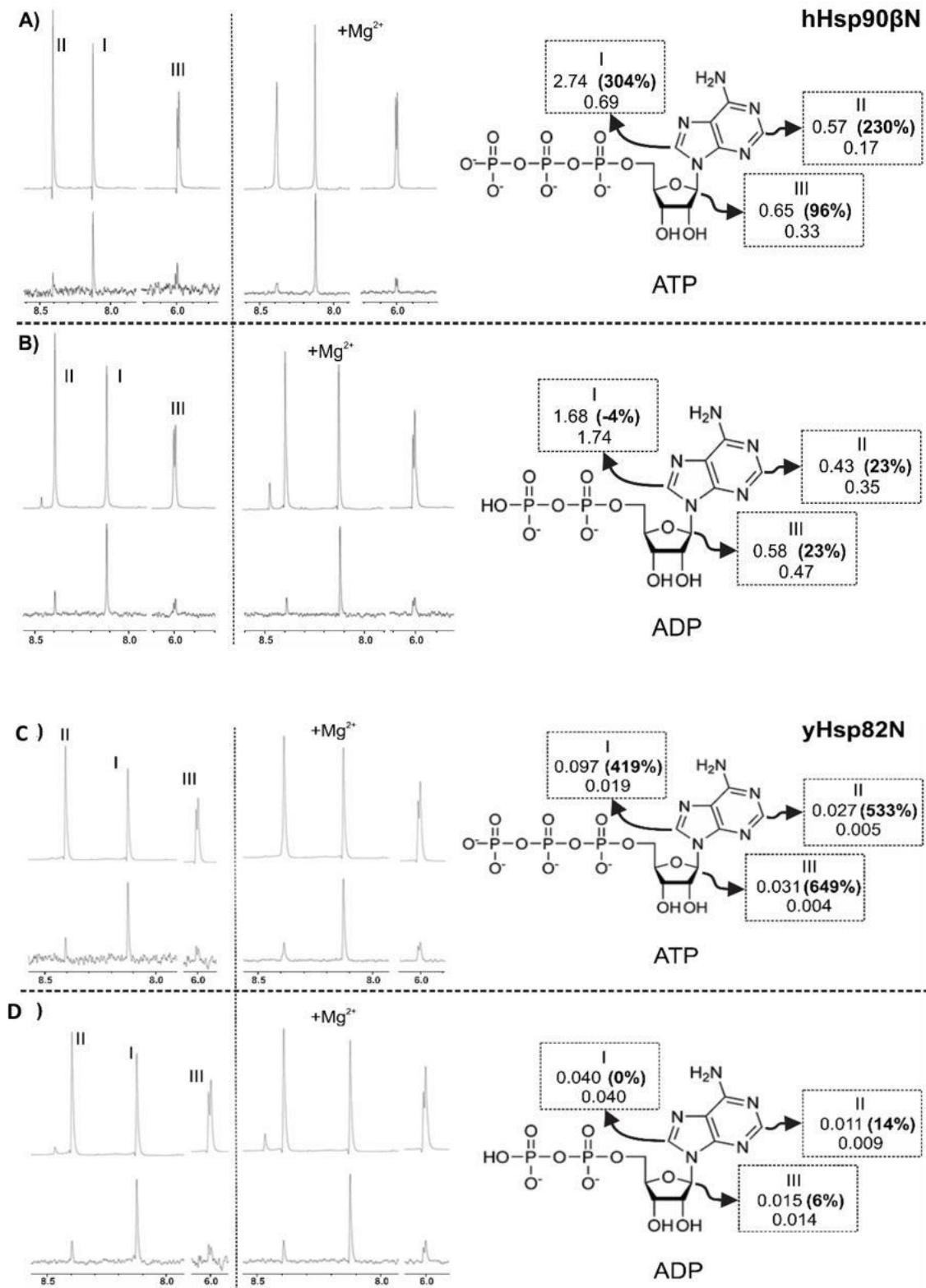
ligante no sítio de interação das proteínas e obtêm-se informações em nível atômico a respeito desta interação (Angulo *et al.*, 2010).

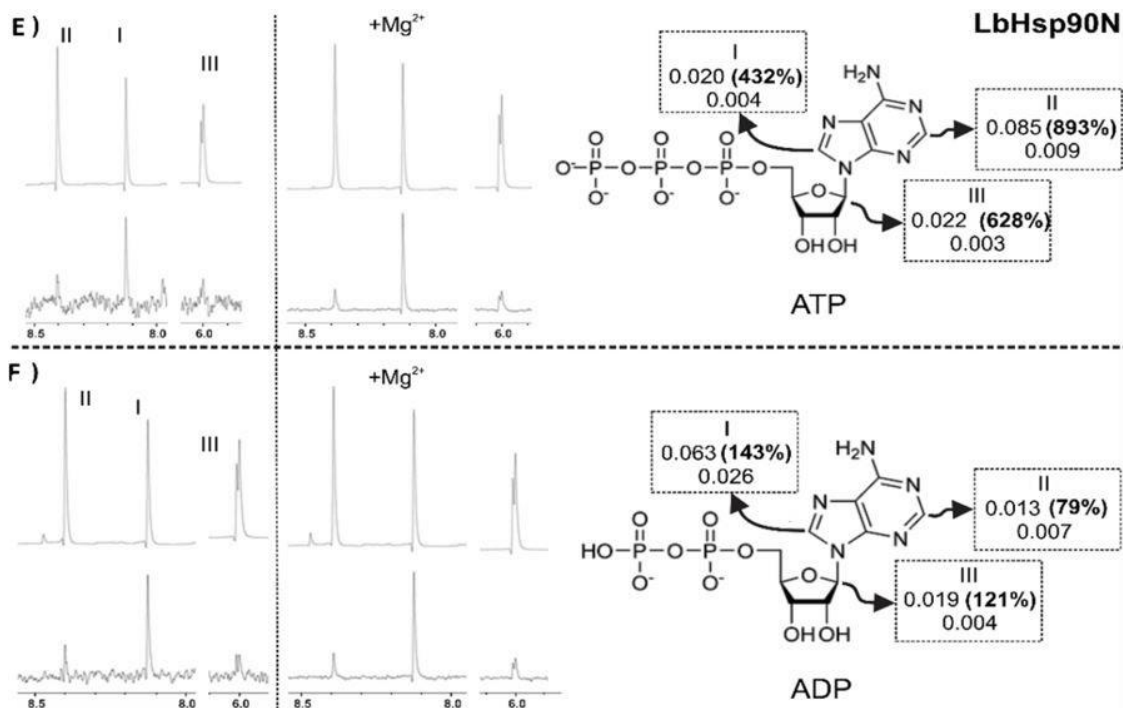
O experimento baseia-se em irradiar seletivamente a proteína e, por “*Nuclear Overhauser Effect*” (NOE), a transferência da saturação é detectada nas moléculas menores que estão interagindo com a proteína. Em outras palavras, quando a interação da proteína com o ligante ocorre, a magnetização é transferida da proteína para os átomos do ligante, o que pode ser observado como espectro diferencial. Deste modo, os sinais dos átomos dos ligantes (que estão interagindo com um grau de proximidade maior com a proteína) são comparados ao espectro de referência e assim as informações das interações são reveladas (Mayer e Meyer, 2001; Angulo *et al.*, 2010).

Neste estudo, o STD foi a técnica eleita para aprofundar os conhecimentos a respeito da interação tanto das proteínas completas quanto os DNTs com os nucleotídeos adenosina, na presença e ausência de Mg^{2+} . Desse modo, buscou-se entender a base molecular dessas interações considerando os contatos hidrofóbicos mediados por prótons e se a interação entre ATP e ADP com os DNTs apresentam diferenças significativas.

A Figura 14 mostra os resultados obtidos para avaliação da ligação de ATP e ADP com as proteínas hHsp90 β N, yHsp82N e LbHsp90N na presença e ausência de Mg^{2+} . Cada sinal nos espectros é atribuído a um átomo do ligante (representado por algarismos romanos). O fator de amplificação (FA) é representado como um número perto dos átomos dos ligantes. A porcentagem de ampliação da magnetização na presença de Mg^{2+} é mostrada entre parênteses.

Figura 14 - Avaliação da ligação de ATP e ADP com as proteínas hHsp90βN, yHsp82N e LbHsp90N por RMN. A) Ligação de ATP e B) ADP com a hHsp90βN na presença e ausência de Mg²⁺. C) Ligação de ATP e D) ADP com a yHsp82N na presença e ausência de Mg²⁺. E) Ligação de ATP e F) ADP com a LbHsp90N na presença e ausência de Mg²⁺.





Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

A STD permitiu a visualização de como os ligantes ATP e ADP interagem em um mesmo DNT de uma mesma Hsp90 e também a comparação da interação em diferentes DNTs de ortólogas. A técnica foi capaz de monitorar a transferência de magnetização para os mesmos três prótons no ATP (Figura 14 A, C e E) e no ADP (Figura 14 B, D e F).

Para a hHsp90βN (Figura 14 A e B), os átomos de hidrogênio ligados ao C2 (II) e C8 (I), da adenina, e o C1' (III), da ribose, receberam magnetização da proteína (Tabela 14). Com a yHsp82N e a LbHsp90N, os resultados foram semelhantes. Para a hHsp90βN, a interação com ATP se mostrou sensível ao Mg²⁺, o que aumentou a transferência de magnetização em até 300%. Já com ADP não houve alteração significativa no valor. A yHsp82N apresentou comportamento semelhante, já que todos os sinais observados da interação com ATP mostraram-se também sensíveis ao Mg²⁺. Já a LbHsp90N mostrou comportamento diferente das demais, uma vez que tanto a interação com ATP quanto com ADP mostraram-se sensíveis aos íons Mg²⁺, o que aumentou a transferência de magnetização em ambos os casos. Porém, para o ATP em 8,12 ppm, ela ancalçou perto de 900% enquanto o ADP apenas 140%. Este resultado mostra que existem diferenças nos mecanismos de ligação dos nucleotídeos com estas proteínas.

Tabela 14- Sinais de magnetização obtidos nos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Proteína		hHsp90βN				γHsp82N				LbHsp90N			
Ligante		ATP		ADP		ATP		ADP		ATP		ADP	
Presença de Mg ²⁺		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Sinal I	δ (ppm)	8,119	8,119	8,117	8,117	8,119	8,119	8,117	8,117	8,119	8,119	8,117	8,117
	STD-FA	0,678	2,740	1,739	1,677	0,019	0,097	0,040	0,040	0,009	0,085	0,026	0,063
	% FA*	+ 304		- 4		+ 419		0		+ 893		+ 121	
Sinal II	δ (ppm)	8,402	8,402	8,396	8,396	8,402	8,402	8,396	8,396	8,402	8,402	8,396	8,396
	STD-FA	0,172	0,569	0,351	0,433	0,005	0,027	0,009	0,011	0,004	0,020	0,007	0,013
	% FA*	+ 230		+ 23		+ 533		+ 14		+ 432		+ 79	
Sinal III	δ (ppm)	5,994	5,994	5,999	5,999	5,994	5,994	5,999	5,999	5,994	5,994	5,999	5,999
	STD-FA	0,332	0,621	0,469	0,579	0,004	0,031	0,014	0,015	0,003	0,022	0,009	0,019
	% FA*	+ 96		+ 23		+ 649		+ 6		+ 628		+ 121	

*% FA: Diferença do fator de amplificação em porcentagem devido à presença de Mg²⁺ em relação a sua ausência $\%FA = 100 * \frac{(FA_{+Mg^{2+}} - FA_{-Mg^{2+}})}{FA_{-Mg^{2+}}}$

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Observando a Tabela 14, pode-se verificar que na presença de ADP e ausência de Mg²⁺, os FA são maiores do que os apresentados para o ATP, indicando assim que a afinidade dos DNTs é maior pelo ADP (dado convergente aos apresentados no ITC). Além disso, na presença de ATP com Mg²⁺, os FA tiveram os valores aumentados, ou seja, houve um aumento da transferência de magnetização, o que realça o importante papel deste íon para a interação, papel este que também pôde ser observado nos experimentos de ITC, em que algumas interações só ocorriam na presença deste (Garnier *et al.*, 2002).

Para o ADP, este aumento nos FA na presença de Mg²⁺ também foi observado, porém em um grau inferior ou até inexistente. Vale ressaltar que os íons Mg²⁺ coordenam o trifosfato do ATP dentro do sítio de interação deste último nas Hsp90, sendo importantes na hidrólise realizada pela proteína. Diferentemente do que ocorre com o ADP, que não possui o fosfato γ (Li *et al.*, 2012).

Para os experimentos de STD com algumas das proteínas completas (isoformas α e β humanas, LbHsp90 e γHsp82) foram utilizadas condições semelhantes às usadas para os DNTs, ou seja, ligantes ATP e ADP na presença e ausência de íons Mg²⁺. A Tabela 15 mostra o FA para cada um dos experimentos para todas as condições testadas.

Tabela 15 - Sinais de magnetização obtidos nos experimentos de ressonância magnética nuclear para as proteínas hHsp90 α , hHsp90 β , LbHsp90 e yHsp82. São mostrados os fatores de amplificação nas interações das proteínas com ATP e ADP, na presença e ausência de Mg²⁺.

Proteína		hHsp90 α				hHsp90 β				LbHsp90				yHsp82			
Ligante		ATP		ADP		ATP		ADP		ATP		ADP		ATP		ADP	
Presença de Mg ²⁺		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Sinal I	δ (ppm)	8,3892	8,3892	8,3892	8,389	8,3875	8,3875	8,3875	8,3875	8,3918	8,3918	8,3918	8,3918	8,3895	8,3895	8,3895	8,3895
	STD-FA	3,12	5,15	5,74	2,26	2,67	4,24	5,22	2,32	1,95	3,45	3,28	2,35	3,37	3,80	6,64	1,91
	% FA*	65		-61		59		-55		77		-28		13		-71	
Sinal II	δ (ppm)	8,1187	8,1187	8,1187	8,1187	8,1179	8,1179	8,1179	8,1179	8,1198	8,1198	8,1198	8,1198	8,1162	8,1162	8,1162	8,1162
	STD-FA	8,68	13,00	11,94	5,92	7,39	11,13	12,23	6,29	5,44	8,99	8,69	6,71	9,36	10,74	16,70	6,78
	% FA*	50		-50		51		-49		65		-23		15		-59	
Sinal III	δ (ppm)	5,9934	5,9934	5,9934	5,9934	5,9976	5,9976	5,9976	5,9976	5,9983	5,9983	5,9983	5,9983	5,9931	5,9931	5,9931	5,9931
	STD-FA	4,11	8,43	7,3	2,66	3,44	6,37	5,45	2,99	2,59	5,25	4,56	3,25	4,39	5,83	8,22	3,41
	% FA*	100		-63		85		-45		103		-29		33		-59	

*% FA: Diferença do FA em porcentagem devido à presença de Mg²⁺ em relação a sua ausência $\%FA = 100 * \frac{(FA_{+Mg^{2+}} - FA_{-Mg^{2+}})}{FA_{-Mg^{2+}}}$

Fonte: Autoria própria.

Os resultados indicam que todas as proteínas completas testadas apresentam o mesmo comportamento entre elas. Os FA aumentaram devido a presença de ATP e Mg^{2+} . Esse mesmo resultado é convergente com observados para os DNTs destas proteínas. Ao contrário do que ocorre com o ADP, em que o FA diminuiu devido a presença de Mg^{2+} , que pode ser devido ao fato de que as proteínas possuem uma afinidade maior pelo ADP, o que pode gerar uma limitação para essa técnica, que depende de um regime de troca rápida entre as moléculas.

Comparando os dados das proteínas completas com os dados para os domínios, o FA do ATP manteve o comportamento de apresentar valores maiores na presença de Mg^{2+} , diferentemente do que aconteceu na presença de ADP com Mg^{2+} , que os domínios se apresentaram insensíveis e nas proteínas completas o valor foi reduzido.

Estes resultados indicaram que o modo de ligação tanto do ATP quanto do ADP com o sítio de ligação dos três domínios estudados envolve interações semelhantes tanto nos prótons quanto nas porções da adenina e da ribose (Figura 14). Esse dado converge tanto com a identidade de sequência de aminoácidos quanto com as afinidades semelhantes obtidas através da calorimetria de titulação isotérmica. Portanto, as diferenças nas assinaturas termodinâmicas observadas nas interações das proteínas tanto com ATP quanto com ADP não devem ser devido ao mecanismo de interação. Entretanto, existe sensibilidade diferenciada em resposta ao íon Mg^{2+} considerando o ATP e ADP.

1.5.8 Simulações de dinâmica molecular

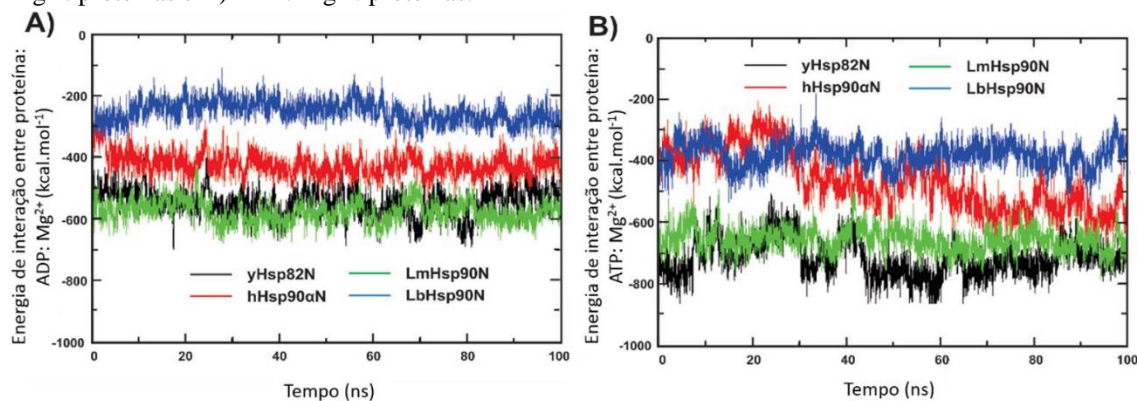
Inicialmente, a hipótese de trabalho foi a de que as diferenças nas assinaturas termodinâmicas poderiam ser devido a interações dinâmicas dos ligantes com as proteínas. Então, com o auxílio do Prof. Dr. Alessandro Nascimento (Instituto de Física de São Carlos-USP, São Carlos, SP), foram feitas simulações de dinâmica molecular com alguns DNTs em interação tanto com ADP quanto com ATP como descrito no item 1.4.10 do Materiais e métodos, a fim de complementar os dados experimentais e os dados de STD.

Cabe ressaltar que, neste momento, foi utilizado o DNT da isoforma humana α , devido à indisponibilidade no PDB de estrutura cristalográfica da hHsp90 β N em complexo com ATP. Isto foi possível pois existe alta identidade (87%) entre as sequências de aminoácidos entre elas, principalmente no DNT (91%). As poucas diferenças entre as sequências não estão relacionadas aos aminoácidos que participam da interação com os nucleotídeos adenosina.

Os DNTs e os ligantes entraram em conformações de interações estáveis somente na presença de Mg^{2+} , resultando então no complexo proteína: nucleotídeo: Mg^{2+} . Na ausência do íon, ou o nucleotídeo se desligava espontaneamente ou íons Na^+ se complexava no lugar do Mg^{2+} (dados não mostrados). Então, o íon Mg^{2+} foi colocado no sítio de interação em todas as dinâmicas moleculares testadas. Mais uma vez é ressaltado o importante papel que os íons Mg^{2+} possuem na interação de alguns membros dessa família de chaperonas moleculares com os nucleotídeos adenosina.

Inicialmente as energias de interação entre DNTs e ligantes foram computadas de acordo com os parâmetros do campo de força *AMBER*, o que pode ser observado na Figura 15.

Figura 15- Energias de interação computadas entre os complexos por dinâmica molecular. A) ADP: Mg^{2+} : proteínas e B) ATP: Mg^{2+} : proteínas.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Como pode ser observado na Figura 14, conformações estáveis entre as proteínas e os ligantes foram atingidas dentro do tempo de simulação, que foi de 100 ns. Além disso, apesar da alta porcentagem de identidade presente nas estruturas primárias, foram encontradas diferenças nas energias de ligação alcançadas nos experimentos de dinâmica molecular. Para as interações proteínas-ADP, a ordem crescente de energias foi: LmHsp90N < yHsp82N < hHsp90 α N < LbHsp90N. Para os complexos ATP: Mg^{2+} : proteínas, a ordem foi: yHsp82N < LmHsp90N < hHsp90 α N < LbHsp90N.

Para uma avaliação mais completa das energias de interação, o papel do solvente também foi incluído na análise. As energias médias de interação foram estudadas com o *MMPBSA.py* (Miller *et al.*, 2012) usando as energias de dessolvatação através do método “*Generalized Born*”. Este resultado mostrou que as energias de ligação encontradas foram semelhantes (dentro do erro) para todas as simulações testadas (Tabela 16).

Tabela 16- Média das energias de interação computadas pelo MMPBSA.py. São mostradas as energias eletrostáticas, interações Van der Waals (VDW) e EGB representa as contribuições polares.

Proteína	Ligante	Ele. (kcal.mol ⁻¹)	VDW (kcal.mol ⁻¹)	EGB (kcal.mol ⁻¹)	Total (kcal.mol ⁻¹)
hHsp90αN	ADP + Mg ²⁺	-420 ± 40	-17 ± 5	330 ± 30	-110 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	-500 ± 100	-16 ± 5	350 ± 90	-140 ± 10
LmHsp90	ADP + Mg ²⁺	-580 ± 40	-10 ± 5	490 ± 30	-100 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	-660 ± 40	-14 ± 5	530 ± 40	-150 ± 10
LbHsp90N	ADP + Mg ²⁺	-230 ± 50	-18 ± 5	140 ± 40	-110 ± 20
	ATP + Mg ²⁺	-380 ± 40	-15 ± 5	270 ± 40	-130 ± 10
yHsp82N	ADP + Mg ²⁺	-550 ± 50	-6 ± 5	460 ± 40	-100 ± 10
	ATP + Mg ²⁺	-720 ± 60	-5 ± 7	580 ± 50	-150 ± 10

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Estes dados estão de acordo com os obtidos por ITC, que mostraram ΔG_{app} para ADP com valores entre -6,3 e -7,7 kcal.mol⁻¹ e para ATP, valores entre -5,8 e 6,8 kcal.mol⁻¹ (Tabelas 12 e 13). Portanto, com essas diferenças menores de 1 kcal.mol⁻¹, as energias de ligação obtidas por simulações de dinâmica molecular não seriam significativamente diferentes.

Estes resultados não mostraram possíveis fontes para os valores compensatórios, como mostrados por ITC, de entropia favorável (-TΔS negativo no caso das proteínas com ATP) e contribuições entrópicas desfavoráveis para o ADP (valores de -TΔS positivos). Portanto, as diferenças na assinatura termodinâmica poderiam estar relacionadas a dinâmica das moléculas de água pois é bem mostrado que o sítio de ligação das Hsp90 é bastante solvatado. Assim, a contribuição entrópica foi investigada através do estudo do número de moléculas de água presentes na primeira e segunda camada de solvatação do ligante.

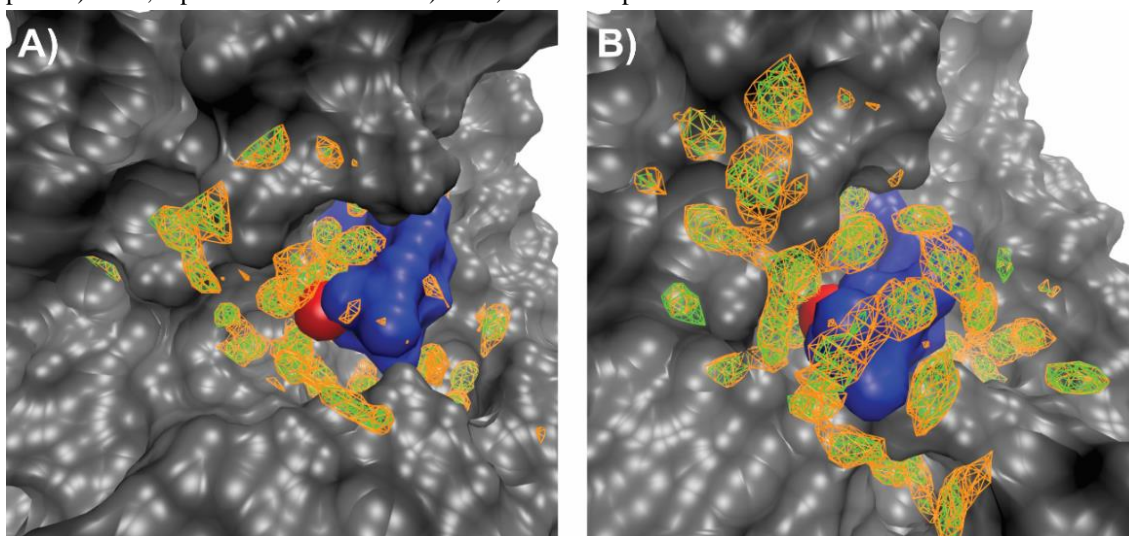
Tabela 17- Número de moléculas de água encontradas na primeira e segunda camada de solvatação dos ligantes que estão interagindo nos DNTs das Hsp90 ortólogas.

DNT	Ligante	Número de moléculas de água	
		Camada inferior	Camada superior
hHsp90αN	ADP + Mg ²⁺	18 ± 2	32 ± 2
	ATP + Mg ²⁺	23 ± 2	41 ± 3
LmHsp90	ADP + Mg ²⁺	24 ± 3	41 ± 5
	ATP + Mg ²⁺	22 ± 2	39 ± 3
LbHsp90N	ADP + Mg ²⁺	18 ± 2	31 ± 2
	ATP + Mg ²⁺	24 ± 2	42 ± 3
yHsp82N	ADP + Mg ²⁺	24 ± 2	44 ± 4
	ATP + Mg ²⁺	24 ± 2	42 ± 4

Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Como pode ser observado na Tabela 17, o número de moléculas de água presentes na primeira e segunda camada de solvatação variou para cada caso, mas no geral, uma mesma camada apresenta um número similar de moléculas quando ATP e ADP estão ligados. Então, para melhor compreender o papel do solvente, a proteína yHsp82N, que apresentou o mesmo número de moléculas tanto na presença de ATP quanto ADP, teve suas regiões de entropia desfavorável estudadas através do programa *GIST*, o que pode ser observado na Figura 16.

Figura 16- Regiões de entropia desfavorável para a yHsp82N. Na figura são representados os valores de $-0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-3}$ para entropia orientacional (laranja) e o mesmo valor de entropia translacional (verde) para A) ADP, representado em azul e B) ATP, também representado em azul.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

A análise dos resultados obtidos sugere que o complexo com ADP possui um número menor de regiões com entropia desfavorável em torno do ligante do que o ATP. Então, neste último, mais moléculas de água estão presas e duas consequências são esperadas: o grau de liberdade das moléculas de água será menor e o custo entrópico será maior, o que está em contraste com os dados experimentais obtidos por ITC. Então, apesar de poder apresentar contribuição nas assinaturas termodinâmicas, o comportamento do solvente ainda não se mostrou como elemento crítico capaz de explicar os dados experimentais.

O próximo passo foi investigar o comportamento dos ligantes durante as simulações por dinâmica molecular. O RMSD para os nucleotídeos adenosina em complexo com os DNTs foi calculado durante o tempo de simulação e estão representados na Figura 17. Também foram estudadas as principais interações entre os nucleotídeos e

alguns aminoácidos dos DNTs de Hsp90 de *S. cerevisiae*, isoforma α humana e *L. braziliensis* (Figura 18) durante as dinâmicas moleculares.

Figura 17- Mobilidade do ligante no local de interação dos nucleotídeos durante o tempo de simulação. Superposição de 500 frames das simulações que mostram a mobilidade dos ligantes ADP e ATP em complexo com proteínas: Mg^{2+} . A) hHsp90N, B) LbHsp90N e C) yHsp82N.

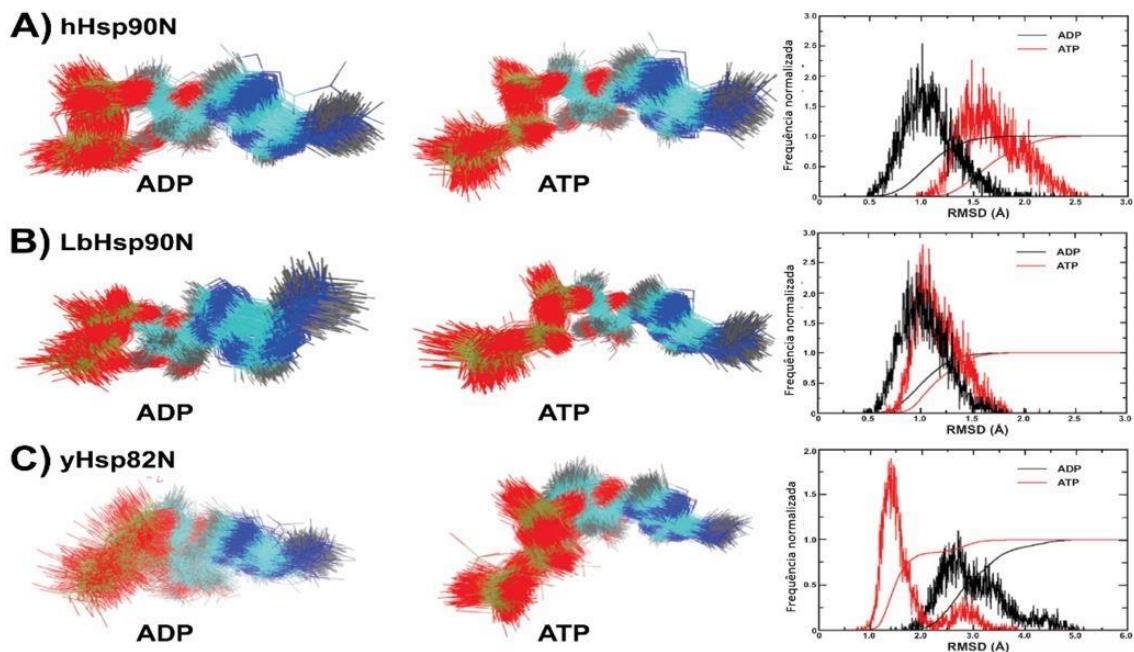
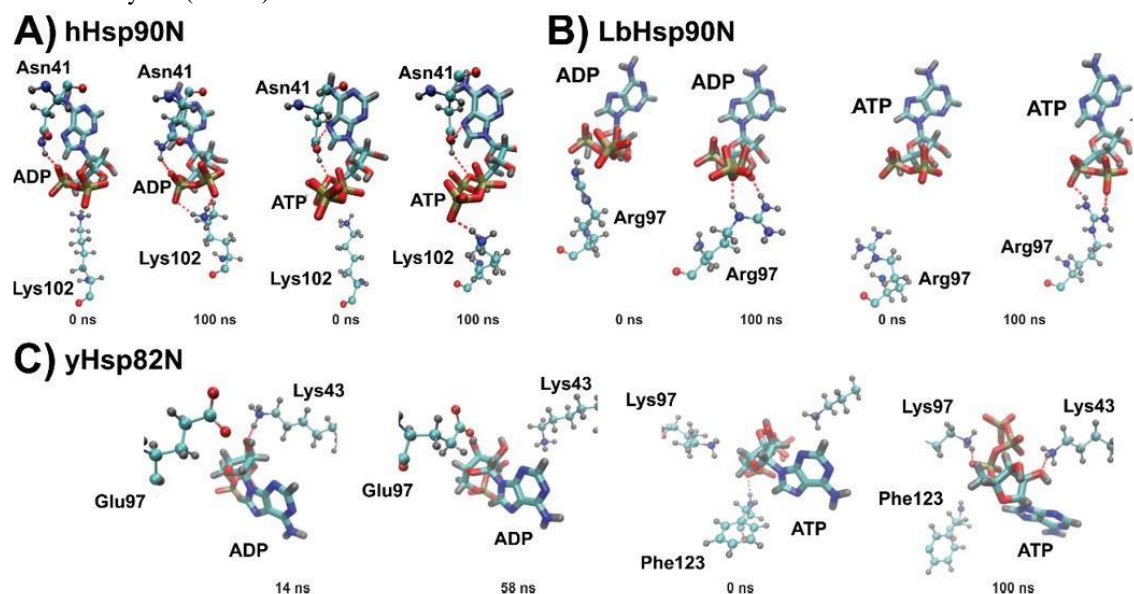


Figura 18- Principais interações das proteínas com os ligantes ADP e ATP durante as simulações de dinâmica molecular. A) Interação, na hHsp90 α N, do ADP com Asn41 e Lys102 (esquerda) ou ATP (direita) com esses mesmos aminoácidos. B) Interação, na LbHsp90, do ADP (esquerda) com Arg97 e ATP (direita) também com Arg97. C) Interação, na yHsp82N, do ADP com Glu87 e Lys43 ou ATP com Lys97, Phe123 e Lys43 (direita).



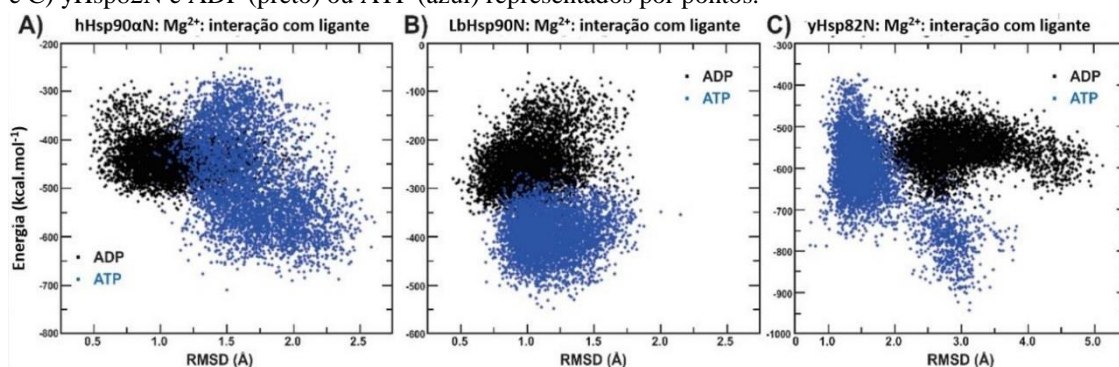
Como pode ser observado para a hHsp90 α N na Figura 17, a distribuição de RMSD para ATP e ADP tem um perfil similar, mostrando um pico de 1,0 Å para ADP e 1,5 Å para ATP (Figura 17 A). A Figura 18 mostra que os principais aminoácidos de interação dessa proteína são Asn41 e Lys102, que interagem com os grupos fosfato do ADP e ATP. Deve-se notar que, na presença de ATP, a ligação com a Lys102 se rompeu e se restaurou durante a simulação, mostrando que a mobilidade do fosfato γ é aumentada neste caso, o que converge com o aumento de RMSD observado na Figura 17.

Para a LbHsp90N, as distribuições de RMSD alcançadas para ADP e ATP mostram um perfil similar. Para ela, na presença de ATP e também ADP existe o rompimento e a formação da ligação entre a Arg97 e os grupos fosfato.

Para a yHsp82, diferenças notáveis foram observadas. Como pode ser notado na Figura 17 C, o ADP fica mais flexível do que o ATP no sítio de interação de nucleotídeos da proteína, apresentando uma distribuição bimodal e um pico amplo de RMSD em 2,5-3,0 Å. Para o ATP também é observada uma distribuição bimodal com um pico maior em 1,5 Å e um segundo pico em torno de 3,0 Å. Comparando esses dados com os apresentados na Figura 18, pode-se notar que há ligações de hidrogênio que alternam entre Glu87 e Lis43 na presença de ADP. Esta proteína, diferentemente das demais, apresenta o Glu87 (cadeia lateral mais longa) na posição em que as outras duas proteínas apresentam um Asp (Figura 6). Com o ATP, três resíduos de aminoácidos apresentam os rompimentos e formações de interações: Lys97, Lys43 e Phe123. O grupo fosfato perde ligações de hidrogênio com Phe123 e forma novas com Lys97 e Lys43.

As contribuições entrópicas favoráveis nas interações das proteínas com ATP parecem estar relacionadas à sua capacidade de experimentar diferentes microestados e a lei de Boltzmann ($\frac{S}{k} = \ln\Omega$) indica que a entropia de um sistema está diretamente relacionada ao número de microestados (Ω). Considerando isto, outra abordagem feita para avaliar as diferenças de entropia destes complexos foi a análise de um gráfico do RMSD *versus* as energias de ligação (Martinez *et al.*, 2009), mostrados na Figura 19.

Figura 19- Gráficos do RMSD para os ligantes versus energia de ligação. A) hHsp90 α N, B) LbHsp90N e C) yHsp82N e ADP (preto) ou ATP (azul) representados por pontos.



Fonte: Adaptado de Minari *et al.* (submetido).

Como mostra a Figura 19A, uma distribuição de estados mais dispersa para a interação da hHsp90 α N com o ATP foi observada, o que concorda com os dados de ITC no que diz respeito as contribuições entrópicas favoráveis. Para a LbHsp90N, dois estados igualmente distribuídos são observados para o ATP e o ADP, também em conformidade com o perfil termodinâmico menos divergente observado para essa proteína. Por último, para a yHsp82N, a distribuição do ATP se concentrou em duas regiões distintas que não sobrepõem com as regiões ocupadas pelo ADP, contribuindo assim com a entropia favorável observada experimentalmente.

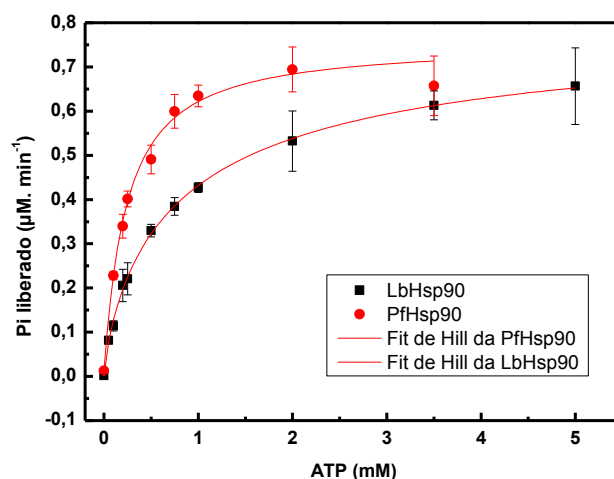
1.5.9 Atividade ATPásica

Para verificar se as proteínas possuem baixa atividade ATPásica como descrito na literatura e se sofrem inibição dessa atividade através de ligantes também já consagrados como inibidores de Hsp90 (GA e radicicol), foram feitos ensaios de atividade ATPásica e inibição da atividade ATPásica para as Hsp90 de *P. falciparum* e *L. braziliensis*.

1.5.10 Atividade ATPásica da PfHsp90 e LbHsp90

A fim de avaliar se duas das proteínas estudadas neste trabalho (PfHsp90 e LbHsp90) apresentavam-se funcionalmente ativas, elas foram purificadas por 3 passos cromatográficos (a fim de evitar possíveis contaminações) e foram obtidas com alto grau de pureza. Então, foram feitos ensaios de atividade ATPásica, como descrito em 1.4.11 dos materiais e métodos, que foram analisados no programa *OriginPro 8.0*. Os parâmetros da cinética da reação foram obtidos através de um *fit* não linear da taxa de atividade ATPásica e os resultados estão representados na Figura 20 e na Tabela 18.

Figura 20- Atividade ATPásica das proteínas PfHsp90 e LbHsp90.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos obtidos através dos ensaios de atividade ATPásica para as proteínas LbHsp90 e PfHsp90.

Proteína	K _M (µM)	V _{MAX} (µM.min ⁻¹)	k _{CAT} (min ⁻¹)	Eficiência catalítica (K _{CAT} /K _M) (min ⁻¹ µM ⁻¹)
PfHsp90	270 ± 20	0,71 ± 0,04	0,40	1,48x10 ⁻³
LbHsp90	860 ± 180	0,8 ± 0,1	0,41	0,473x10 ⁻³

Fonte: Autoria própria.

Para a PfHsp90, os dados foram recentemente publicados em (Silva *et al.*, 2018) e se mostraram diferentes aos reportados em PALLAVI et al (Pallavi *et al.*, 2010), que reportou, por meio de cromatografia em camada delgada, K_M de 611 µM, K_{CAT} de 0,099 min⁻¹ e eficiência catalítica 0,162. 10⁻³ min⁻¹µM⁻¹.

Para a LbHsp90, dados anteriores do grupo de pesquisa reportaram V_{MAX} de aproximadamente 0,6 µM.min⁻¹, o K_M descrito foi 430 ± 30 µM e k_{CAT} foi 0,320 min⁻¹. A eficiência catalítica foi 0,744x10⁻³ min⁻¹.µM⁻¹ (Silva *et al.*, 2013). Essas diferenças nos valores podem ser devido à diferença entre as metodologias de purificação e de teste da atividade ATPásica.

Os k_{CATS} observados para as proteínas estudadas estão na mesma ordem de grandeza, bem como V_{MAX}. O K_M da PfHsp90 foi o menor valor obtido, sugerindo que essa proteína apresenta maior afinidade pelo ATP. Isso contribui para a maior eficiência catalítica observada para esta proteína.

A Tabela 19 mostra que valores semelhantes são vistos principalmente para a Hsp82 (*S. cerevisiae*), em que K_M varia de 100 a 400 μM e k_{CAT} de 0,4 a 0,5 min^{-1} , dependendo da temperatura em que o experimento foi realizado (Obermann *et al.*, 1998; McLaughlin *et al.*, 2002; Hainzl *et al.*, 2009). Para a isoforma β humana, os valores de K_M são semelhantes, porém os valores de k_{CAT} mostraram-se menores (McLaughlin *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2008; McLaughlin *et al.*, 2002). Também são apresentados alguns valores encontrados na literatura para a isoforma α humana, a Hsp90 de *E. coli* (denominada HtpG), de *G. gallus* e para a Grp94.

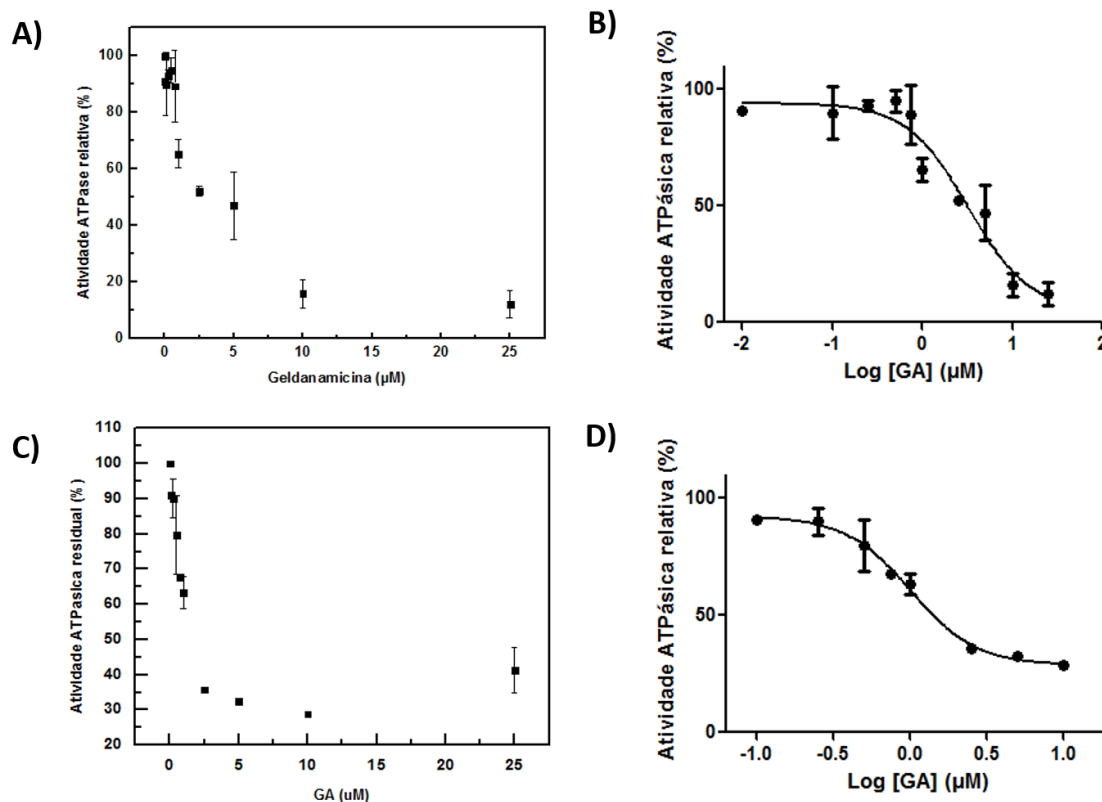
Tabela 19 - Parâmetros cinéticos obtidos através de diferentes ensaios de atividade ATPásica para Hsp90 de diferentes organismos.

Proteína	K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	k_{CAT} (min^{-1})	Temperatura	Referência
hHsp90 β	840 \pm 60	0.089 \pm 0.004	37 °C	(McLaughlin <i>et al.</i> , 2002)
	300	0.08	37 °C	(Richter <i>et al.</i> , 2008)
	324	0.015	30 °C	(Owen <i>et al.</i> , 2002)
	190 \pm 20	0.00552	25 °C	(McLaughlin <i>et al.</i> , 2004)
hHsp90 α	300	0.10	37 °C	(Richter <i>et al.</i> , 2008)
yHsp82	300	1.2	37 °C	(Richter <i>et al.</i> , 2008)
	300	0.35	37 °C	(Weigl <i>et al.</i> , 2000)
	-	0.50 \pm 0.02	37 °C	(McLaughlin <i>et al.</i> , 2002)
	100	0.4	37 °C	(Panaretou <i>et al.</i> , 1998)
	350 \pm 40	1.0 \pm 0.2	37 °C	(Wegele <i>et al.</i> , 2003)
	172	0.44	30 °C	(Obermann <i>et al.</i> , 1998)
	320 \pm 61	0.5	30 °C	(Hainzl <i>et al.</i> , 2009)
	100	0.1	25 °C	(Weigl <i>et al.</i> , 2000)
HtpG	830 \pm 130	0.53 \pm 0.03	-	(Young and Hartl, 2000)
PfHsp90	-	0.47	37 °C	(Panaretou <i>et al.</i> , 1998)
	611	0.099	-	(Pallavi <i>et al.</i> , 2010)
LbHsp90	270	0.4	37 °C	(Silva <i>et al.</i> , 2018)
	430 \pm 30	0.32	37 °C	(Silva <i>et al.</i> , 2013)
<i>G. gallus</i>	1530	0.025	30 °C	(Owen <i>et al.</i> , 2002)
Grp94	92	0.43	25 °C	(Leskovar <i>et al.</i> , 2008)

1.5.11 Inibição das atividades ATPásicas por GA

Os ensaios de inibição das proteínas PfHsp90 e LbHsp90 por GA estão descritos nos materiais e métodos. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21.

Figura 21- Inibição das proteínas por GA. A) Atividade ATPásica relativa da PfHsp90 em relação à concentração de GA (μM). B) Atividade ATPásica da PfHsp90 relativa por log [GA]. C) Atividade ATPásica da LbHsp90 relativa em relação à concentração de GA (μM). D) Atividade ATPásica da LbHsp90 relativa por log [GA].



Fonte: Autoria própria.

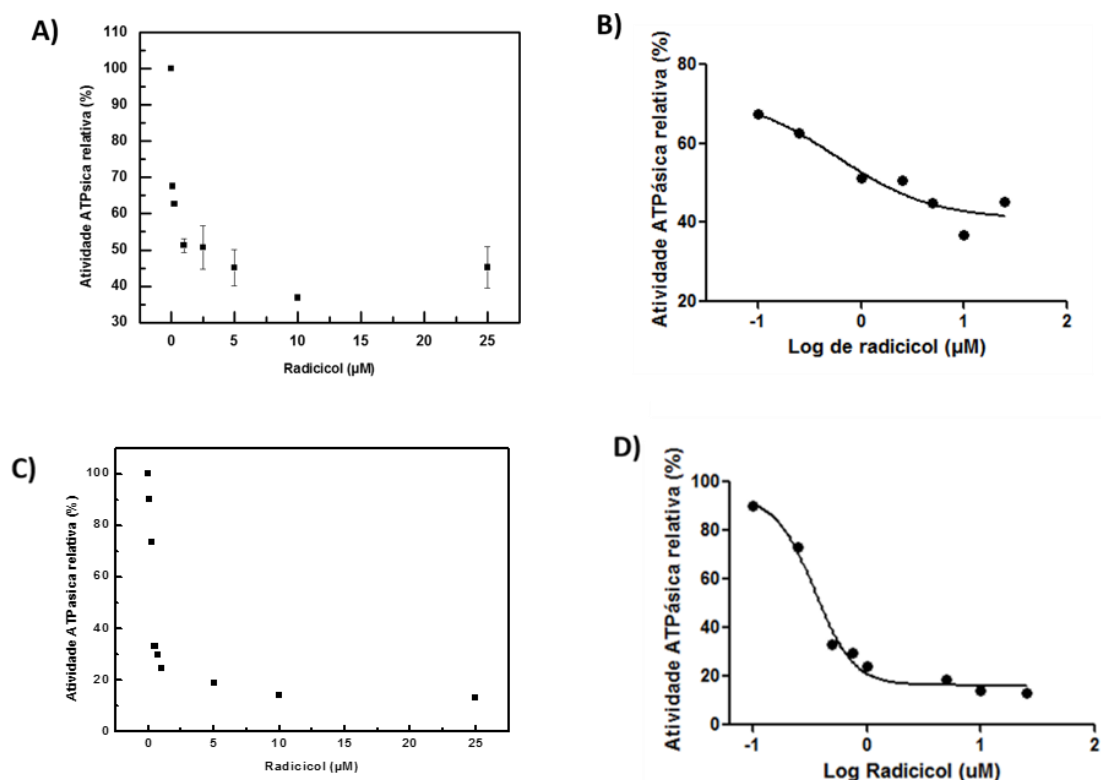
Para a PfHsp90, a GA inibiu efetivamente a proteína e o IC_{50} encontrado foi $2,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (Silva *et al.*, 2018). PALLAVI *et al.* (Pallavi *et al.*, 2010) encontrou, por meio de marcação fluorescente do ATP e acompanhamento por cromatografia de camada delgada, um valor de $0,2 \mu\text{M}$. Para a LbHsp90, o IC_{50} encontrado foi $1,0 \mu\text{M}$, mesmo valor encontrado previamente pelo grupo de pesquisa pela mesma técnica (Silva *et al.*, 2013).

Como a quantidade de GA necessária para inibir em 50% a PfHsp90 é cerca de três vezes maior do que a necessária para a inibição da LbHsp90, os dados sugerem que a interação da GA com a PfHsp90 é menos eficiente quando comparada à interação que ocorre entre a LbHsp90 e a GA.

1.5.12 Inibição das atividades ATPásicas por radicicol

Os ensaios de inibição das proteínas PfHsp90 e LbHsp90 com radicicol foram semelhantes aos descritos quando o inibidor usado foi a GA. Os resultados após a análise dos dados estão mostrados na Figura 22.

Figura 22- Inibição das proteínas por radicicol. A) Atividade ATPásica relativa em relação à concentração de radicicol (μM) para a PfHsp90. B) Representação da inibição da atividade ATPásica relativa por \log [radicicol] da PfHsp90. C) Atividade ATPásica relativa em relação à concentração de radicicol (μM) para a LbHsp90. D) Representação da inibição da atividade ATPásica relativa por \log [radicicol] da LbHsp90.



Fonte: Autoria própria.

Para a PfHsp90, o IC_{50} encontrado, através do programa *GraphPad Prism 5*, para a inibição com radicicol foi $0,6 \mu\text{M}$. O IC_{50} encontrado, através mesmo programa, para a LbHsp90 foi $0,35 \mu\text{M}$. Os valores apresentam-se na mesma ordem de grandeza e a diferença entre eles é pequena, então, o erro da medida nos impede de discutir as afinidades das proteínas bem como a potência deste composto contra elas.

Os dados sugerem que o radicicol parece ser mais potente na inibição das Hsp90 estudadas, uma vez que uma concentração menor dele em comparação com a GA é necessária para inibir a proteína em 50%. Com relação a esta última, uma concentração

maior para inibição 50% é necessária para inibição da proteína PfHsp90 se comparada com a LbHsp90.

1.6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, a interação de Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina foram caracterizadas. As conclusões principais alcançadas são que os membros desta família de proteínas possuem uma alta identidade de sequências e são funcionalmente muito semelhantes. A LbHsp90 e a PfHsp90 confirmaram que a atividade ATPásica delas é baixa, e que os inibidores clássicos que foram utilizados para o tratamento de câncer humano (GA e radicicol), são capazes de inibir outros membros da família Hsp90.

A calorimetria de titulação isotérmica mostrou que a interação destas proteínas com os nucleotídeos adenosina ADP e ATP apresenta assinaturas termodinâmicas diferentes. As interações com ATP mostraram-se dirigidas entalpicamente e entropicamente. Já as interações com ADP mostraram-se dirigidas entalpicamente e apresentando custo entrópico. O ΔH_{APP} encontrado foi maior para estas interações, indicando que elas são mais exotérmicas do que as primeiras. Os valores de K_A e K_D indicaram que as proteínas apresentam maiores afinidades por ADP.

Para tentar explicar os dados experimentais, experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN-STD) e dinâmica molecular foram realizadas. Os dados de STD indicaram que para todos os casos estudados, não houve diferença no modo de interação dos prótons monitorados com as proteínas e os domínios N-terminais. As simulações de dinâmica molecular mostraram energias de interação e papel do solvente semelhante para todas as interações. Porém, foram encontrados microestados diferentes que alguns aminoácidos experimentam quando estão interagindo com ATP e ADP, o que pode explicar as diferenças observadas pela calorimetria de titulação isotérmica. Em conjunto, todas essas técnicas mostraram que, apesar das semelhanças, existem diferenças entre a ligação dos nucleotídeos com alguns aminoácidos no DNTs das proteínas. Estes dados fornecem evidências de que, se as interações certas forem exploradas (já que foi observada a existência de microestados), o desenho racional de fármacos poderá ser feito de forma exclusiva para cada uma delas e assim, a inibição seletiva poderá ser alcançada com especificidade.

CAPÍTULO 2: Caracterização estrutural da Aha4 de *Plasmodium falciparum*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Co-chaperonas da Hsp90

A Hsp90 possui pelo menos 12 co-chaperonas envolvidas na modulação de seu ciclo funcional, entre elas pode-se citar a HOP (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*), SGT (*Small glutamine-rich TPR protein*), CHIP (*C-terminus Hsp70/Hsp90 interacting protein*), p23 e Aha1 (*Activator of Hsp90 ATPase-1*) (Wegele *et al.*, 2004; Pearl e Prodromou, 2006; Wandinger *et al.*, 2008; Janin, 2010; Sahasrabudhe *et al.*, 2017).

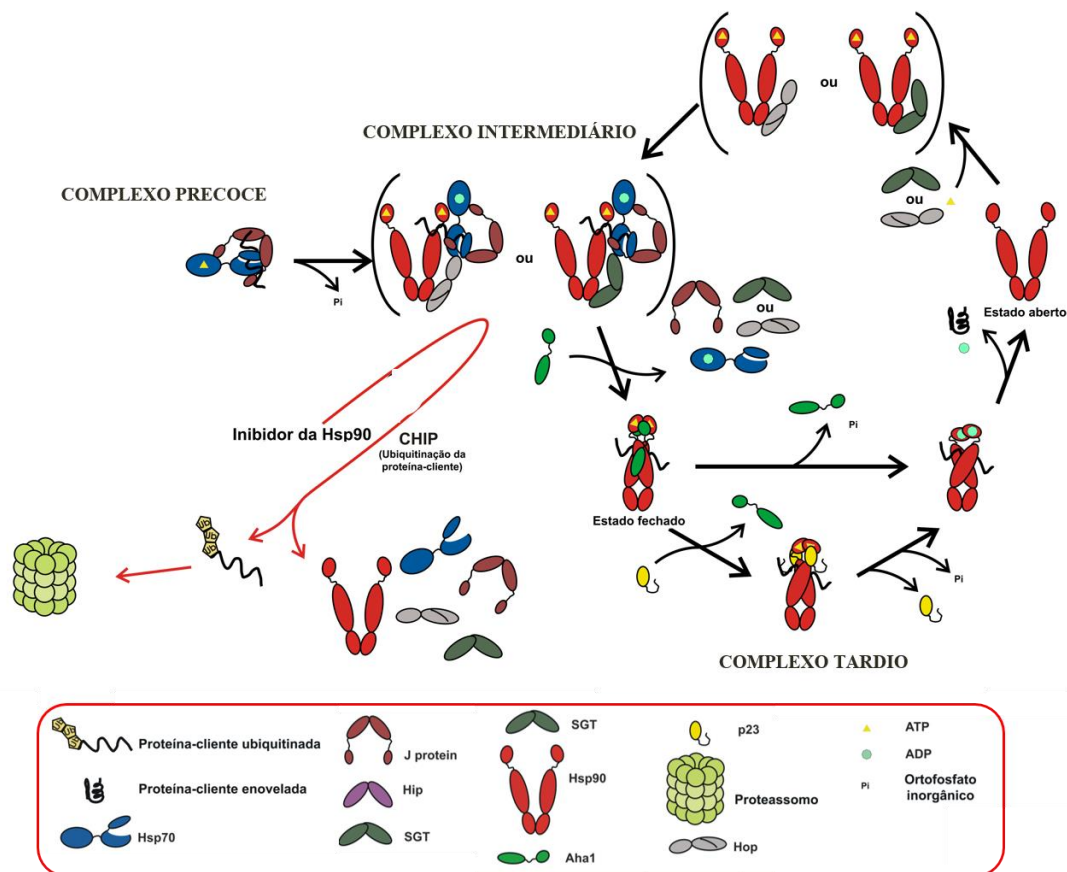
Resumidamente, a HOP possui 3 domínios TPR, um que reconhece o segmento EEVD presente na região C-terminal das Hsp90 e o outro TPR que reconhece o mesmo segmento em Hsp70 citoplasmáticas (Wegele *et al.*, 2004) e o 3º com função estrutural. A CHIP é uma E3-ligase que, entre outras funções, realiza o encaminhamento de proteínas clientes da Hsp70 e Hsp90 para a degradação via ubiquitinação. Para o controle da atividade ATPásica, existem a p23 e a Aha. A p23 atua na fase tardia do ciclo, estabilizando a dimerização dos domínios N-terminais da Hsp90 e inibindo temporariamente a atividade ATPásica, deste modo, um tempo adicional faz com que a Hsp90 fique ligada mais tempo com as suas proteínas-cliente (Silva *et al.*, 2018).

Essas co-chaperonas atuam em conjunto com as chaperonas no heterocomplexo denominado foldossoma (Figura 23). Neste complexo, a co-chaperona *J protein* se liga a proteínas desenoveladas, normalmente nascentes nos ribossomos, e as entrega para a Hsp70, que antes estava ligada a ATP, em um estado de baixa afinidade pelas proteínas-cliente e, com a ligação da *J protein*, passa ao estado de alta afinidade ligado a ADP (complexo *precoce*).

Em seguida, com o auxílio das co-chaperonas SGT ou HIP, as proteínas-cliente são levadas até as Hsp90, pois os fatores de troca de nucleotídeo (BAG, GrpE, Hsp100, entre outras) estimulam a troca de ADP por ATP na Hsp70, o que reduz a afinidade dela pela proteína-cliente, culminando na liberação desta última. Quando o complexo *precoce* se associa ao complexo Hsp90-ATP-HOP/SGT forma-se o complexo *intermediário* e as proteínas-cliente são transferidas da Hsp70 para a Hsp90. Neste momento, as co-chaperonas Aha1 ou p23 associam-se ao complexo, agora denominado complexo *tardio*, com consequente liberação das proteínas Hsp70, SGT e HOP (Seraphim *et al.*, 2014; Sahasrabudhe *et al.*, 2017).

Se a Aha interage com a Hsp90, mantendo-a no estado fechado e estimulando a sua atividade ATPásica, uma vez que ela atua na estabilização da Arg380 no processo de coordenação do fosfato γ do ATP, a proteína-cliente é liberada mais rapidamente (Seraphim *et al.*, 2013). Em contrapartida, se a p23 participa, ela reduz a atividade da Hsp90, o que mantém a proteína-cliente por mais tempo na chaperona. É neste momento que as proteínas-cliente completam o processo de maturação, enovelamento, ativação etc. Vale ressaltar que se a Hsp90 é inibida, o complexo intermediário é desmontado, e a CHIP atua levando a proteína-cliente para o sistema ubiquitina-proteassoma (Biamonte *et al.*, 2010; Seraphim *et al.*, 2014).

Figura 23- O heterocomplexo foldossoma. Inicialmente a proteína-cliente interage com a *J protein* e a Hsp70 no complexo *precoce*. Em seguida, no complexo *intermediário*, ocorre a entrega da proteína para a proteína Hsp90, que está acompanhada da HOP e/ ou SGT. Neste momento forma-se o complexo tardio, em que atuam as co-chaperonas p23 ou Aha1, inibindo ou estimulando a atividade ATPásica da Hsp90 até a completa ativação da proteína-cliente. Se inibidores como GA ou radicicol inibem a Hsp90, a proteína-cliente é levada para o proteassomo.



Fonte: Adaptado de (Seraphim *et al.*, 2014).

2.1.2 Proteínas Aha

A proteína Aha1 foi primeiramente descrita em *S. cerevisiae*. Ela apresenta massa molecular de aproximadamente 40 kDa e é conhecida pela atividade estimuladora da atividade ATPásica das Hsp90, ligando-se na interface do dímero da chaperona. As Ahas em *S. cerevisiae* (yAha1) e *H. sapiens* (hAha1), por exemplo, são compostas por dois domínios canônicos: o domínio N-terminal e o domínio C-terminal.

O domínio N-terminal interage com o domínio intermediário da Hsp90, enquanto o domínio C-terminal da Aha1 interage com o DNT da Hsp90. A ligação destas proteínas é mediada por contatos hidrofóbicos fortalecidos por interações com moléculas de água e ligações de hidrogênio (Meyer *et al.*, 2004). Estudos apontam que ela deve possuir os dois domínios para que a estimulação da atividade ATPásica alcançada pela Hsp90 seja máxima. O domínio C-terminal da yAha1 sozinho possui pouca atividade (Meyer *et al.*, 2004; Koulov *et al.*, 2010).

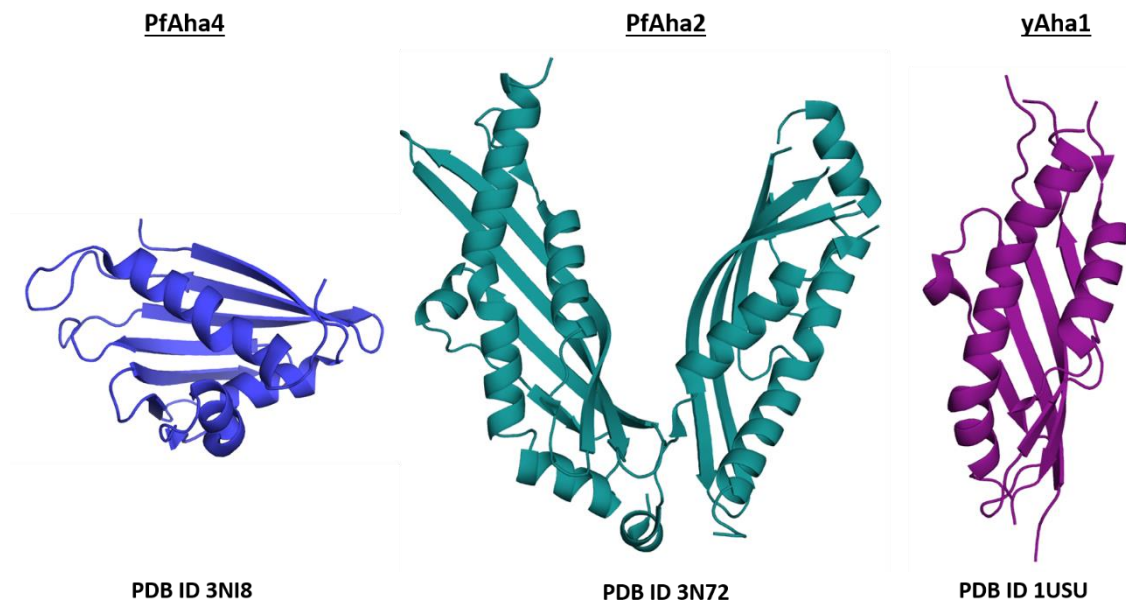
Sabe-se que duas moléculas de Aha interagem com o dímero de Hsp90, por interfaces opostas, preferencialmente quando a chaperona está na conformação fechada (Sahasrabudhe *et al.*, 2017). Porém, essa ligação pode ser assimétrica, feita por apenas 1 molécula de Aha, em que o seu domínio N-terminal interage no domínio intermediário de um protômero e o domínio C-terminal interage com o N-terminal da Hsp90 (Retzlaff *et al.*, 2010).

As co-chaperonas e os complexos co-chaperonas- chaperonas também são alvos nos estudos de doenças como câncer. A novobiocina, um inibidor de Hsp90, interfere na ligação da Aha com a Hsp90, o que faz com que a migração das células seja diminuída, realçando um efeito antimetástase (Ghosh *et al.*, 2015). Quando a estimulação da Hsp90 está ocorrendo através da yAha1, os inibidores de Hsp90 citados no capítulo 1 podem ter os efeitos diminuídos, o que culmina na resistência contra a inibição (Zurawska *et al.*, 2010). Portanto, é de grande importância o estudo de co-chaperonas, uma vez que, em sua maioria, ainda não são bem elucidadas e estão em contato direto com a chaperona, modulando a sua atividade.

Em *S. cerevisiae*, além da yAha1, também é encontrada a proteína denominada nesta tese para melhor entendimento como yAha3 (encontrada no *GenBank* como Hch1). A diferença entre estas proteínas é que a yAha1 possui os domínios N-terminal e o C-terminal canônicos, enquanto que a yAha3 é composta apenas pelo domínio N-terminal canônico. Em *P. falciparum*, um gene para a forma canônica (composta pelo domínio N-

terminal junto com o C-terminal) da Aha1 não é conhecido. Porém, a existência de um gene para a co-chaperona Aha, denominada aqui como PfAha2, é encontrada no genoma do parasita (Figura 24). Esta proteína apresenta dois domínios canônicos N-terminais (estrutura 3N72 do PDB), o primeiro localizado na primeira extremidade da proteína, estando separado do segundo (que está na parte C-terminal) através de um *linker*. Há um 2º gene para Aha em *P. falciparum*, denominada como PfAha4, que é composta apenas pelo domínio C-terminal e será melhor compreendida neste capítulo 2 da tese. Ela apresenta sua estrutura depositada no PDB (PDB ID 3NI8), porém inexistem registros científicos de caracterização estrutural.

Figura 24- Estrutural tridimensional da PfAha4 (PDB ID 3NI8), PfAha2 (PDB ID 3N72) e yAha1 (PDB ID 1USU).



Fonte: Autoria própria.

2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é a realização da caracterização estrutural da proteína Aha4 identificada no genoma de *P. falciparum* por diferentes técnicas e a caracterização de sua atividade com o auxílio da proteína Hsp90 de *P. falciparum* através de calorimetria de titulação isotérmica.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar a proteína Aha4 de *P. falciparum* (PfAha4);

- Realizar caracterização estrutural da PfAha4 através de espectropolarimetria de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, desnaturação térmica, desnaturação química por Gnd-HCl e ureia, além de ultracentrifugação analítica e SAXS;
- Realizar a caracterização da interação da PfAha4 com a PfHsp90 através da calorimetria de titulação isotérmica.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Bioinformática

A sequência de aminoácidos da PfAha4, encontrada no *Protein Data Bank* (PDB ID 3NI8), foi alinhada com as sequências das proteínas yAha1N (PDB ID 1USV), yAha1C (Swiss-Prot Q12449.1, resíduos 211-351), Hch1/yAha3 (*GenBank* KZV08344.1), PfAha2N (PDB ID 3N72), PfAha2C (PDB ID 3N72) utilizando o programa *Clustal omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.4.2 Expressão e purificação

O DNA codante para a PfAha4, otimizado para expressão em sistemas bacterianos, foi preparado no vetor de expressão pET28a, o qual foi adquirido comercialmente junto à empresa *Epoch Lifesciences*. Para a expressão, uma colônia de *E. coli* da cepa BL21(DE3), previamente transformada com o plasmídeo pET28a::PfAha4 foi crescida em meio LB contendo o antibiótico canamicina 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sob agitação constante de 200 rpm à 37 °C. Este crescimento foi monitorado até que a $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ atingisse o intervalo de 0,6 a 0,8 unidades de absorvância. Quando esse valor foi atingido, IPTG 0,4 mM foi adicionado ao meio para que as células fossem induzidas a expressar a proteína. O período de indução escolhido foi de 4 h à 30 °C.

A purificação ocorreu através de três passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel (realizada antes e após a clivagem da *His-tag* com trombina) e cromatografia de exclusão molecular. Primeiramente, o *pellet* bacteriano foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,4) contendo NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Em seguida, ficou em incubação no gelo por 30 minutos após a adição de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lisozima (Sigma) e 5 U de DNase (Sigma). A lise mecânica ocorreu por sonicação. Em seguida, o material foi centrifugado a 15.700 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membranas 0,45 μm . A coluna *HisTrap 5 mL* (*GE Healthcare Life Sciences*) foi equilibrada com o tampão acima mencionado, o

sobrenadante foi injetado e a proteína eluiu com a adição do tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,4) contendo NaCl 500 mM e imidazol 500 mM. Em seguida, a proteína foi dialisada na presença de trombina (Sigma) *overnight* a 4 °C para a retirada da *His-tag* contra tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,4) contendo NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Para a separação das frações de proteína em que a clivagem foi eficiente das frações em que ela não foi eficiente, foi feita uma nova cromatografia de afinidade ao níquel como descrito acima, coletando-se agora o *flowthrough*. A eficiência da clivagem foi monitorada através de SDS-PAGE 15%.

A segunda cromatografia utilizada foi a CEM e a coluna utilizada foi a *HiLoad Superdex 26/60 200 prep grade (GE Healthcare Lifesciences)* acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Prime plus (GE Healthcare Lifesciences)* em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) contendo NaCl 150 mM. Após a purificação, a proteína foi dialisada *overnight* a 4 °C em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0), NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e todos os experimentos para a caracterização estrutural foram feitos neste tampão. A eficácia da purificação foi avaliada por SDS-PAGE 15%. A concentração da proteína foi medida por espectrofotometria a 280 nm, de acordo com a Equação 1, utilizando-se o ϵ estimado a partir da sequência de aminoácidos da PfAha4 desprovida da *His-tag*.

2.4.3 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

A avaliação das estruturas secundárias da PfAha4 ocorreu conforme descrito no capítulo 1 desta tese, com modificações. O equipamento usado também foi o espectropolarímetro J-815 (*Jasco*). Foi utilizada cubeta de quartzo de 0,2 mm contendo 15 μ M de proteína, velocidade de 50 nm/min e 30 acumulações. O tratamento de dados foi feito como descrito na Equação 2. Para a estimativa do conteúdo de estrutura secundária presente na PfAha4, o programa *Dichroweb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) foi utilizado.

2.4.4 Espectroscopia de fluorescência

Para avaliar a estrutura terciária local de onde estão inseridos os triptofanos na PfAha4, 50 μ M da proteína foi colocada em microplaca com 96 poços, fundo plano, preto (*Greiner Bio-One*). Em seguida, a placa foi colocada no equipamento *Varioskan Lux (Thermo Scientific)* e os comprimentos de onda de excitação escolhidos foram 280 nm e 295 nm. Os comprimentos de onda de emissão selecionados variaram de 313 nm a 420 nm quando o λ de excitação ocorreu em 295 nm, e 299 nm a 420 nm quando a excitação

foi em 280 nm. Para garantir a qualidade do enovelamento da proteína, ela foi incubada por 1 h a temperatura ambiente com ureia 7 M preparada no mesmo tampão que a proteína. Os λ analisados foram também os descritos acima e os dados foram analisados de acordo com a Equação 3.

2.4.5 Desnaturação térmica

A fim de obter a temperatura média de desenovelamento (a temperatura em que 50% da quantidade total de proteína encontra-se enovelada e 50% desenovelada) da PfAha4, 50 μ M da proteína foi colocada em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. O espectropolarímetro J-815 (Jasco) foi utilizado com uma taxa de aquecimento de 1 °C/ min. O monitoramento da coleta de dados ocorreu em 220 nm a cada 1 °C. Foram feitas 3 coletas diretas e 3 reversas, em que a temperatura variou de 15 °C até 90 °C e, em seguida, retornou a 15 °C. No *software OriginPro 8.0*, os dados foram normalizados para elipticidade residual molar (Equação 2) e a média dos experimentos foi ajustada por uma função sigmoïdal para a obtenção do valor de T_m .

2.4.6 Desnaturação química por cloridrato de guanidina

Para estudar a estabilidade da PfAha4 frente a agentes químicos, inicialmente foi feita a preparação da solução de Gnd-HCl conforme descrito em (Pace et al., 2008). A determinação da concentração da solução foi realizada por refratometria, utilizando a Equação 7:

$$M_{\text{Gnd-HCl}} = 57,147(\Delta n) + 38,68(\Delta n)^2 - 91,60(\Delta n)^3 \quad (\text{Equação 7})$$

em que $M_{\text{Gnd-HCl}}$ é a concentração molar de Gnd-HCl e Δn é a diferença entre os índices de refração da solução desnaturante e do tampão.

Com o objetivo de obter a C_m (concentração média de desnaturante em que 50% da quantidade total de proteínas encontra-se enovelada e 50% desenovelada), 50 μ M de PfAha4 foi incubada com concentrações crescentes de Gnd-HCl que foram de 0 M até 7 M em microplaca com 96 poços, fundo plano, preto (*Greiner Bio-One*). A incubação foi feita por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi colocada no equipamento *Varioskan Lux (Thermo Scientific)* e os comprimentos de onda de excitação escolhidos foram 280 nm e 295 nm. Os comprimentos de onda de emissão selecionados variaram de 313 nm a 420 nm quando a excitação ocorreu em 295 nm e 298 nm a 420 nm quando a excitação foi em 280 nm.

O $\langle \lambda \rangle$ para cada concentração do agente desnaturante também foi calculado de acordo com a Equação 3.

2.4.7 Desnaturação química por ureia

A preparação da solução desnaturante de ureia foi feita de acordo com a Equação 8:

$$M_{\text{Ureia}} = 117,66(\Delta n) + 29,753(\Delta n)^2 + 185,65(\Delta n)^3 \text{ (Equação 8)}$$

em que M_{Ureia} é a concentração molar de ureia e Δn é a diferença entre os índices de refração da solução desnaturante e do tampão.

O equipamento, concentração de proteína, placa e comprimentos de onda escolhidos foram os mesmos descritos para a desnaturação com Gnd-HCl. A concentração de ureia utilizada variou de 0 M a 7,5 M. Os pontos da curva também foram ajustados segundo uma função sigmoïdal com o auxílio do *software OriginPro 8.0*.

2.4.8 Experimentos de ultracentrifugação analítica

A ultracentrifugação analítica para a PfAha4 foi realizada através da técnica de velocidade de sedimentação no equipamento *Optima XL-A (Beckman)* equipado com o rotor AN-60 Ti (40.000 rpm) e o perfil de sedimentação foi monitorado por absorbância a 239 nm e a 20 °C. As amostras estavam nas concentrações de 0,2 mg.mL⁻¹, 0,4 mg.mL⁻¹, 0,6 mg.mL⁻¹, 0,8 mg.mL⁻¹ e 1,0 mg.mL⁻¹. O programa *SedFit 12.1* foi utilizado no tratamento dos dados com a inserção dos valores de densidade e viscosidade do tampão (1,0037 g/cm³ e 0,0102307 poise, respectivamente) e o volume parcial específico da PfAha4 (0,741435 cm³/g), os quais foram estimados pelo programa *Sednterp*. Os parâmetros obtidos foram a massa molecular aparente (MM_{app}), coeficiente de sedimentação (s), razão friccional (f/f_0) e $s_{20,w}^0$, que é o coeficiente de sedimentação em condições padrão e a 0 mg.mL⁻¹ de proteína (Borges e Ramos, 2011).

2.4.9 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os experimentos de SAXS foram realizados na linha D02A-SAXSS2, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP. O feixe monocromático de raios-X de λ de 1,488 Å foi utilizado com uma distância da amostra até o coletor de 1 m. A célula com janela de mica possuía aproximadamente 1 mm de caminho óptico.

A PfAha4 foi dialisada *overnight* em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) contendo NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e β -mercaptoethanol 1 mM e levada nas concentrações de 1, 2 e 3 mg.mL⁻¹. Os perfis de espalhamento das amostras e do tampão foram coletados durante o tempo de 300 segundos.

Os dados foram analisados pelo Dr. Thiago Vargas Seraphim (Departamento de Bioquímica, Universidade de Toronto, Canadá). A curva obtida do espalhamento do tampão foi subtraída da curva da amostra. Em seguida, para verificar se houve agregação proteica, a aproximação de Guinier foi utilizada ($I(q)$ versus q^2 , em valores de baixo q). O raio de giro (R_g) e valores de $p(r)$ foram obtidos com o auxílio do *software GNOM*. O modelo *ab initio* foi obtido pelo *software DAMMIN*. Para a validação e predição das propriedades hidrodinâmicas deste modelo, foi utilizado o *software HydroPro*.

2.4.10 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica

Para realizar a caracterização da interação da PfAha4 com a PfHsp90, elas foram dialisadas *overnight* a 4 °C em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5) contendo KCl 5 mM após a CEM. Em seguida, 200 µM da PfAha4 foi colocada na seringa do microcalorímetro *MicroCal itc200 (GE Healthcare Life Sciences)*. A PfHsp90 foi colocada na cela na concentração de 10 µM (concentração de dímero). Os experimentos de interação foram feitos a 20 °C, 19 injeções, volume de injeção de 2 µL, duração de 2 segundos e espaçamento de 120. Os dados foram analisados utilizando o *software Origin 7.0* fornecido juntamente com o equipamento.

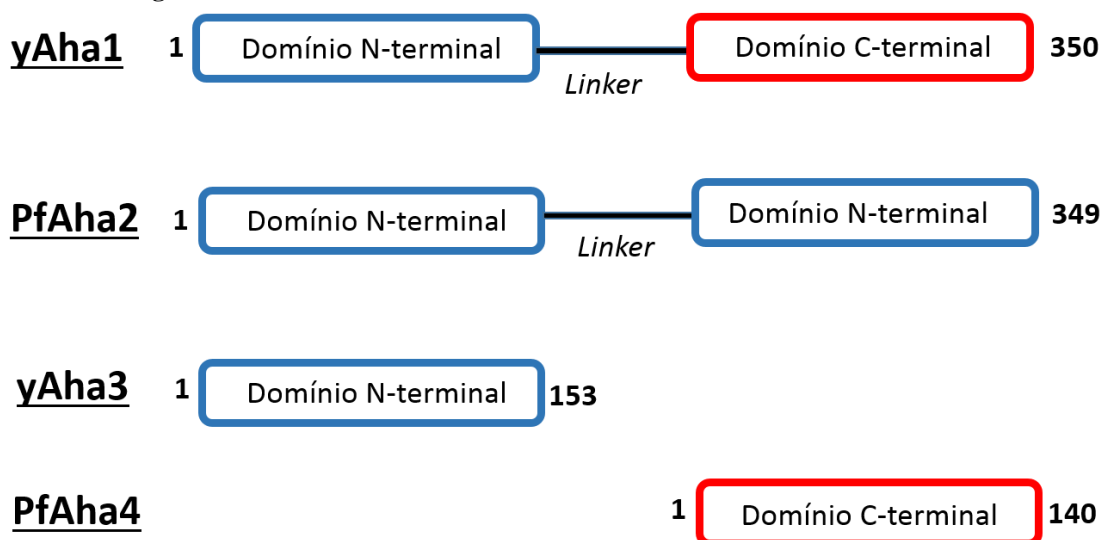
Posteriormente, esses experimentos foram feitos nas mesmas condições de volume, duração e intervalo de injeções, mudando apenas as temperaturas, que passaram a ser 25 °C e 30 °C. Deste modo, as funções termodinâmicas ΔG_{app} , ΔH_{app} , $-T\Delta S_{app}$ foram graficadas em função da temperatura e a $\Delta C_{p,app}$ foi calculada como sendo o coeficiente angular da reta da ΔH_{app} .

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Análises de sequência

A Figura 25 mostra uma representação esquemática de como algumas das proteínas Ahas são organizadas estruturalmente em *S. cerevisiae* e *P. falciparum*, uma vez que já foram descritas proteínas desta família que apresentam o domínio N-terminal ligado ao domínio C-terminal (yAha1- Figura 25), a Aha2 apresenta dois domínios N-terminais, a Aha3 é composta apenas pelo domínio N-terminal canônico e a Aha4, apenas pelo domínio C-terminal canônico.

Figura 25- Representação esquemática de como as proteínas yAha1, yAha3, PfAha2 e PfAha4 são estruturalmente organizadas.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 26 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios yAha1N, yAha1C, PfAha2N, PfAha2C com as sequências de aminoácidos das proteínas yAha3 e PfAha4 realizados com o programa *Clustal omega* e a Tabela 20 mostra a identidade de sequência entre estas proteínas.

Tabela 20- Identidade de sequências entre as proteínas PfAha4, PfAha2, yAha1 e yAha3.

Proteína	yAha1C	PfAha4	PfAha2N	PfAha2C	yAha1N	yAha3
yAha1C	100%	26%	11%	11%	16%	25%
PfAha4	-	100%	18%	15%	13%	15%
PfAha2N	-	-	100%	22%	27%	26%
PfAha2C	-	-	-	100%	20%	18%
yAha1N	-	-	-	-	100%	39%
yAha3	-	-	-	-	-	100%

Fonte: Autoria própria.

Figura 26- Alinhamento de sequência entre as proteínas utilizando o programa *Clustal omega*. A) PfAha4, yAha1C e yAha3. B) PfAha4, PfAha2N, PfAha2C, yAha1N e yAha3.

A)

```

yAha3      MVVLNPNNWHWVDKNTLPWSKDYLNGLKLTSLSTVSSDGKSKIELTQVSSITGDSNVSQRK 60
PfAha4     ----- 0
yAha1C     ----- 0

yAha3      GKPICYFDLQLSMNVKVTNLDTNKDEDDDGILADGKLEIPEFMHDESDIPILSQGFDAF 120
PfAha4     ---M-SFEITEEYYVPEVLFNAFTD--AYTLTRLS--RG---SLAEVDL-KVGGKFSLF 48
yAha1C     GNST-SIYLEPTFNVPSELYETFLD--KQRILAWT--RSAQFFNSGPKL-ETKEKFELF 54
           : : * * * : . : * . *

yAha3      DGLVRSEFVPKVETLLKYQDDL-----IKEHSKDIQV----- 153
PfAha4     SGSILGEFTEITKPHKIVEKWKFRDWNEDYSTVTVEFISVKENH-TKLKLTNNIPASN 107
yAha1C     GGNVISELVSCEKDKLVFHWKLDWSAPFNSTIEMTFHESQEFHETKLVQVKTGIPVGE 114
           . * : . * . : : : : : * . . . . :

yAha3      ----- 153
PfAha4     KYNEGGVLERCKNGWTQNFLHNIEVILGYPKKK 140
yAha1C     -----EDRVRANFEEYYVRSIKLTFGFGAVL 140

```

B)

```

PfAha4     --MSFEITEEYYVPEVLFNAFTDAYTLTRLSRG-----SLAEVD 38
PfAha2C    -----EKCLTKWAI EELQNIFN-KSIELSNNIFLEF-FSCDVEGEASSS 43
PfAha2N    MSGSVWNSNS-WHWEERNYNKWAESYIKYNLSNLKIEKEDLTIYFDN---LQVSGNACVS 56
yAha3     --MVVLNPNN-WHWVDKNTLPWSKDYLNGLKLTSLSTVSSDGKSKIELTQVSSITGDSNVS 57
yAha1N    --MVVNNPNN-WHWVDKNCIGWAKEYFKQKLVGVEAGSVKDKKYARIKSVSSIEGDCEVN 57
           : : : : . . .

PfAha4     LKVGKFSLSFSGSILGEFTEITKPHKIVEKWKFRDWNED-----YSTVTV---EFI 87
PfAha2C    LRKKKILMYDLKI-----TSEWKAYQKNKNQQ----IEIESKGHVSINDIL 86
PfAha2N    IRKKGQINSFEYII-----KFEWLYS-----KKKEGKDYFGGSVEIPDFS 96
yAha3     QRKKGPICYFDLQL-----SMNVKVTNLDTNKDEDDDGILADGKLEIPEFM 104
yAha1N    QRKGVISLFDLKI-----TVLIE-----GHVDSKDGSA L PFE G S I N V P E V A 99
           : : . : : : : :

PfAha4     --SVKENHTK L K L T H N N I P A S N K Y N -- E G G V ----- L E R C K N G W T Q N F L H N I E V I L G 135
PfAha2C    SDFSSDDNTKYSYFIFDNKTDEYN-QINDVIKLEGPNKINQIIDDFILKMREK----- 139
PfAha2N    TFSLEE--NDYAINIERTDESENLRFIYDSILKKEGKEKIKECLKNFQEDLLKHDKNESN 154
yAha3     HDE-SD-----IPIL--SQGFD-AFDGLVRSEFVPKVETLLKYQDDLIKEHSKDIQ 152
yAha1N    FDS-EA--SSYQFDISIFKETS ELS-EAKPLIRSELLPKLRQIFQQFGKDLLATHGNDIQ 155
           . : : : : :

PfAha4     YPKKK-- 140
PfAha2C    ----- 139
PfAha2N    KE-LKIK 160
yAha3     V----- 153
yAha1N    VPESQVK 162

```

Fonte: Autoria própria.

Pode-se notar que a PfAha4 ocupa o lugar do C-terminal da proteína Aha1 de *S. cerevisiae*, apresentando cerca de 26% de identidade com a yAha1C. Já a proteína Aha3 de *S. cerevisiae* corresponde ao domínio N-terminal da proteína canônica yAha1 (composta por um domínio N-terminal e um C-terminal). A Aha3 compartilha 39% de identidade de sequência com a yAha1N. A PfAha2 apresenta dois domínios N-terminais canônicos com identidade de sequência de aminoácidos de 22%. Como a maioria das

identidades apresentadas é menor do que 30%, pode-se considerar baixa a identidade de sequência (baixo grau de conservação) entre estas proteínas, resultado semelhante ao apresentado por (Seraphim *et al.*, 2013). Logo, estes resultados podem indicar mecanismos de interação das Ahas com as Hsp90s apresentando peculiaridades entre as espécies (Seraphim *et al.*, 2013).

A PfAha4 é o alvo deste capítulo, portanto foi feita uma análise utilizando o programa *Sednterp*, que evidenciou parâmetros como ϵ em 280 nm, pI e MM da proteína, que podem ser vistos na Tabela 21.

Tabela 21- Parâmetros encontrados pelo *Sednterp* para a proteína PfAha4. Na tabela são mostrados para a PfAha4 com e sem a *His-tag* conferida pelo pET28a, massa molecular, ponto isoelétrico, número de resíduos de triptofanos, tirosinas, cisteínas e o ϵ em 280 nm.

Proteína	MM (Da)	pI	W	Y	C	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
PfAha4 sem <i>His-tag</i>	16156,5	7,17	3	6	2	25565
PfAha4 com <i>His-Tag</i>	18319,8	8,07	3	6	2	25565

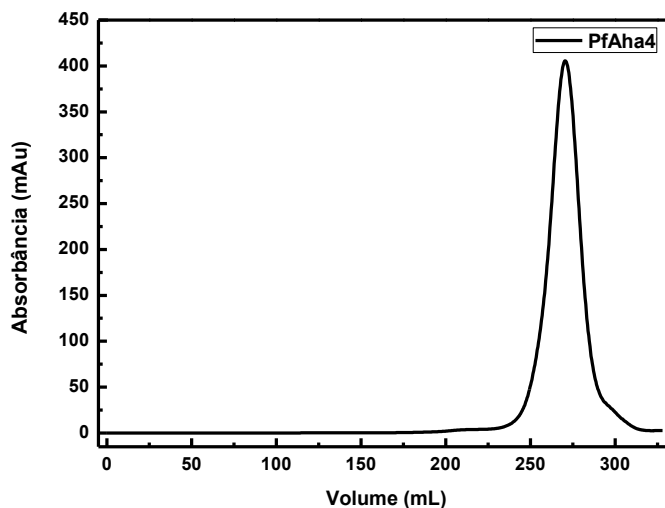
Fonte: Autoria própria.

2.5.2 Expressão e purificação

O vetor de expressão da PfAha4 foi adquirido comercialmente através da empresa *Epoch Lifesciences*. A sequência codificante da PfAha4 está otimizada para *E. coli* e está clonada entre os sítios de restrição *Nde I* e *Eco RI* do plasmídeo pET28a.

Como descrito na seção material e métodos, a PfAha4 foi expressa e purificada em três passos cromatográficos: duas cromatografias de afinidade ao níquel e uma CEM. Por aparentemente não possuir a *His-tag* muito acessível à trombina, parte da proteína permanece com a *His-tag*, por isso a necessidade de uma cromatografia de afinidade ao níquel adicional. O cromatograma do último passo, a CEM preparativa, está representado na Figura 27. Pode-se notar que a amostra não apresentou agregados (que seriam eluídos no V_0 da coluna em torno de 120 mL) e que a proteína eluiu como um pico único, com volume de eluição em torno de 270 mL, indicando homogeneidade da amostra.

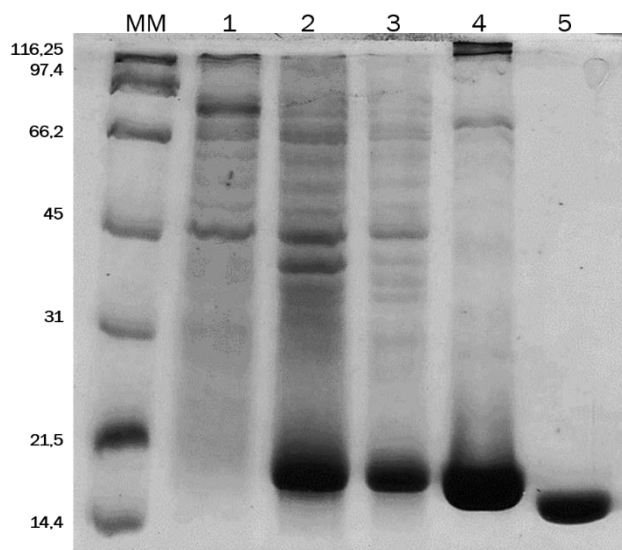
Figura 27- Cromatograma da purificação da PfAha4. A coluna utilizada foi a *HiLoad Superdex 26/60 200 prep grade* (GE Healthcare Lifesciences) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Prime plus* (GE Healthcare Lifesciences) em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) contendo NaCl 150 mM.



Fonte: Autoria própria.

O SDS-PAGE 15% confirma que ela foi purificada com alto grau de pureza, aparece como uma banda de tamanho esperado, que é de aproximadamente 16 kDa e teve a *His-Tag* retirada de forma eficiente (Figura 28).

Figura 28- SDS-PAGE 15% da purificação da PfAha4. MM- Marcador de massa molecular, 1- fração não induzida, 2- fração induzida, 3- sobrenadante, 4- afinidade ao níquel, 5- cromatografia de exclusão molecular após clivagem da *His-Tag*.

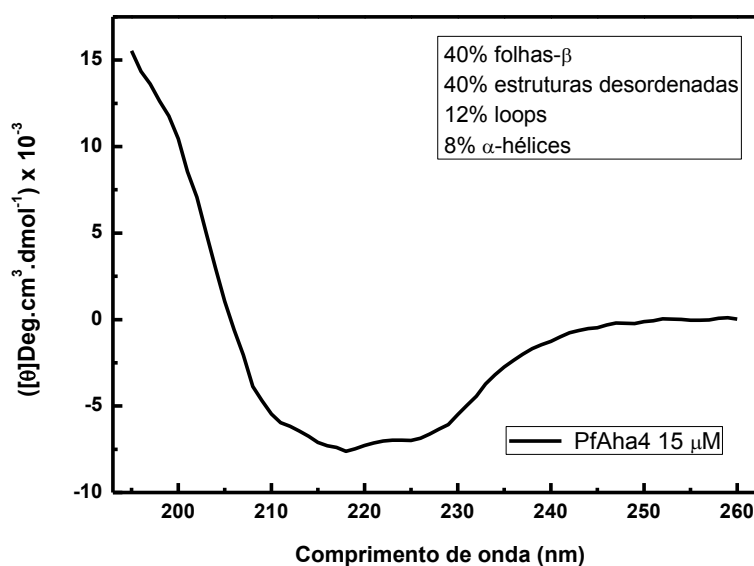


Fonte: Autoria própria.

2.5.3 Dicroísmo circular no UV distante

A fim de verificar o enovelamento da PfAha4 em termos de estrutura secundária, foram feitos experimentos de espectropolarimetria de dicroísmo circular. Os dados foram analisados de acordo com a Equação 2 e podem ser observados na Figura 29.

Figura 29- Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular no UV distante. O espectro foi obtido a partir da PfAha4 na concentração de 15 μM . O espectropolarímetro J-815 (*Jasco*) foi utilizado e a deconvolução dos dados mostrou que a proteína é composta predominantemente por folhas- β (40%) e estruturas desordenadas (40%). Estão presentes também α -hélices (8%) e *loops* (12%).



Fonte: Autoria própria.

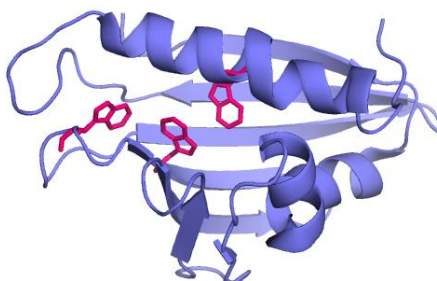
A deconvolução do espectro utilizando o *software Dichworeb* mostrou que a proteína é composta predominantemente por folhas- β (40%) e estruturas desordenadas (40%). Estão presentes também α -hélices (8%) e *loops* (12%). Estes valores estão de acordo com o PDB disponível para a proteína (Figura 23), que mostra grande parte da proteína composta por folhas- β e estruturas desenoveladas. Porém, são também observadas duas α -hélices e os *loops*.

Estes valores são também compatíveis com os encontrados para a proteína Aha1 completa de *L. braziliensis* (Seraphim et al., 2013), cuja composição também é de folhas- β majoritariamente. Os valores também estão em concordância com alguns valores encontrados na literatura para o domínio N-terminal da Aha1 de *S. cerevisiae* (Meyer et al., 2004), para o domínio C-terminal da Aha1 humana (PDB:1X53) e outras Ahas (Koulov et al., 2010; Retzlaff et al., 2010), por exemplo.

2.5.4 Espectroscopia de fluorescência

A PfAha4 possui 3 triptofanos, que estão enterrados no interior da proteína e estão representados na Figura 30.

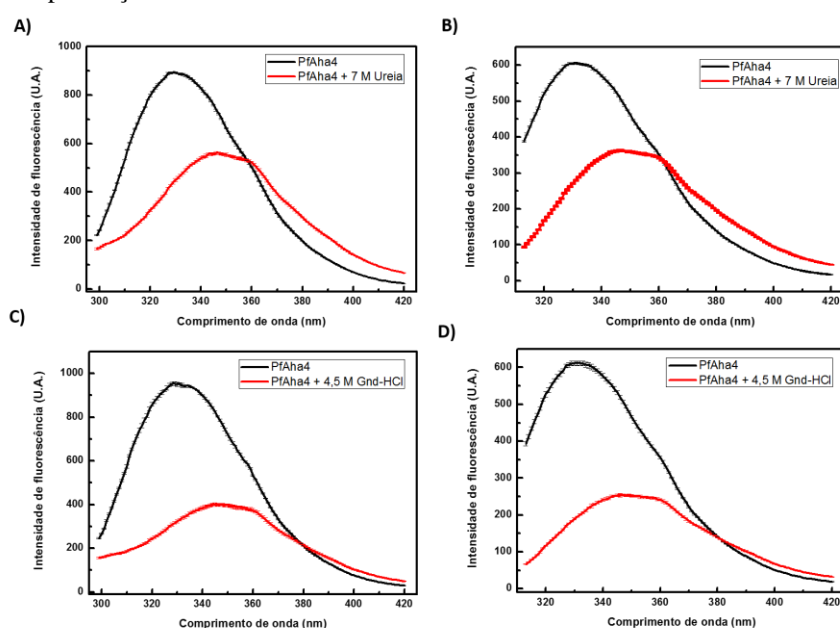
Figura 30 - Estrutural tridimensional da PfAha4 (PDB ID 3NI8). São mostrados os três triptofanos presentes na proteína (rosa).



Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a estrutura terciária local de onde estão localizados estes três triptofanos da PfAha4, sendo que 2 deles estão conservados na yAha1C e um deles na PfAha2C e PfAha2N (Figuras 25A e 25B), foi feita a espectropolarimetria de fluorescência, em λ de excitação 280 nm e 295 nm, na ausência e presença dos agentes desnaturantes ureia e Gnd-HCl. Os espectros podem ser observados na Figura 31 e os valores calculados de λ_{MAX} e $\langle \lambda \rangle$ estão na Tabela 22.

Figura 31- Avaliação da estrutura terciária por espectroscopia de fluorescência para a proteína PfAha4. Os experimentos foram feitos na presença e ausência dos agentes desnaturantes Gnd-HCl e ureia. A) λ 280 nm e presença de ureia. B) λ 295 nm e presença de ureia. C) λ 280 nm e presença de Gnd-HCl. D) λ 295 nm e presença de Gnd-HCl.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 22- Valores de λ_{MAX} e $\langle\lambda\rangle$ observados para a PfAha4 na espectroscopia de fluorescência.

Condição	λ_{EXC} 280 nm (nm)	λ_{EXC} 295 nm (nm)
λ_{MAX} , ausência de desnaturante	329	331
λ_{MAX} , presença de 7 M de ureia	347	346
λ_{MAX} , presença de 4,5 M de Gnd-HCl	345	347
$\langle\lambda\rangle$, ausência de desnaturante	$339,8 \pm 0,1$	$344,7 \pm 0,2$
$\langle\lambda\rangle$, presença de 7 M de ureia	$351,9 \pm 0,1$	$357,1 \pm 0,1$
$\langle\lambda\rangle$, presença de 4,5 M de Gnd-HCl	$350,9 \pm 0,1$	$357,1 \pm 0,1$

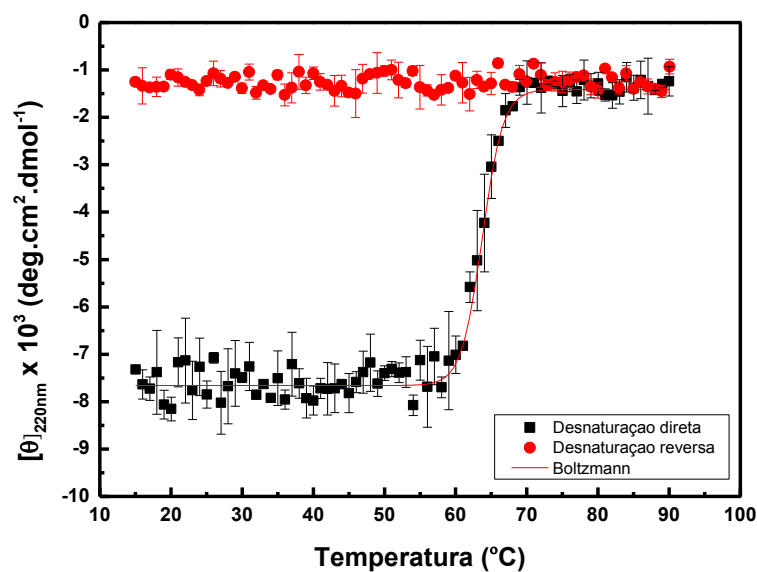
Fonte: Autoria própria.

Os valores da Tabela 22 sugerem que, na média, os três triptofanos apresentam-se enterrados na proteína (λ_{MAX} em torno de 330 nm), dados que convergem ao observado na estrutura presente no PDB (Figura 30). Quando a proteína foi incubada com os agentes desnaturantes, o λ_{MAX} passou a ser aproximadamente 346 nm, o que significa que os triptofanos ficaram expostos ao solvente, e conseqüentemente, a proteína perdeu a estrutura terciária local que originalmente possuía. Deste modo, o deslocamento para comprimentos de onda maiores indica que a proteína recombinante foi obtida no estado enovelado.

2.5.5 Desnaturação térmica

Para verificar a estabilidade térmica da PfAha4, foi utilizada a técnica de desnaturação térmica acompanhada por CD 220 nm. O resultado da desnaturação térmica pode ser observado na Figura 32.

Figura 32- Desnaturação térmica da PfAha4 monitorada por dicroísmo circular. Os quadrados pretos representam a desnaturação térmica direta e os círculos vermelhos representam a desnaturação térmica reversa.



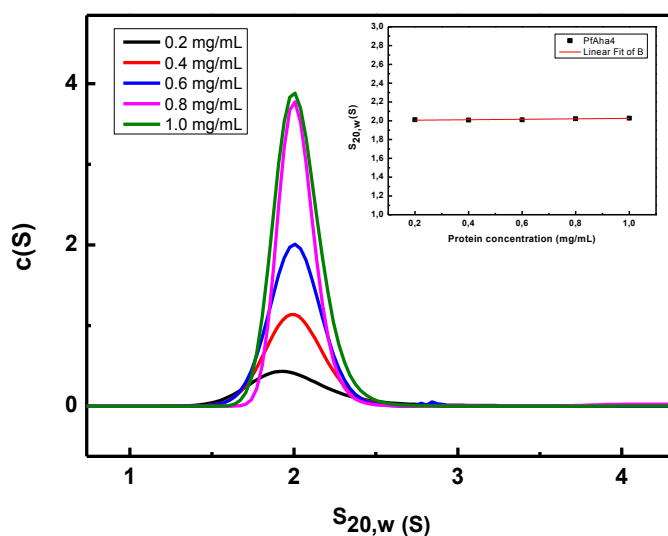
Fonte: Autoria própria.

Na desnaturação direta, uma única transição cooperativa é observada e na reversa não existem transições observáveis, o que mostra que a desnaturação térmica é irreversível. A análise dos dados no programa *OriginPro 8.0* mostrou que a T_m obtida foi $64,0 \pm 0,5$ °C.

2.5.6 Experimentos de ultracentrifugação analítica

A ultracentrifugação analítica foi utilizada para a obtenção de parâmetros hidrodinâmicos e estruturais, como: massa molecular, f/f_0 e o coeficiente de sedimentação. A Figura 33 mostra o perfil de distribuição das espécies de cinco diferentes concentrações da PfAha4 obtidos pela técnica.

Figura 33- Ultracentrifugação analítica da PfAha4. As concentrações centrifugadas foram 0,2 mg.mL⁻¹, 0,4 mg.mL⁻¹, 0,6 mg.mL⁻¹, 0,8 mg.mL⁻¹ e 1,0 mg.mL⁻¹. O inserto mostra o $s_{20,w}$ corrigido pelas concentrações da proteína.



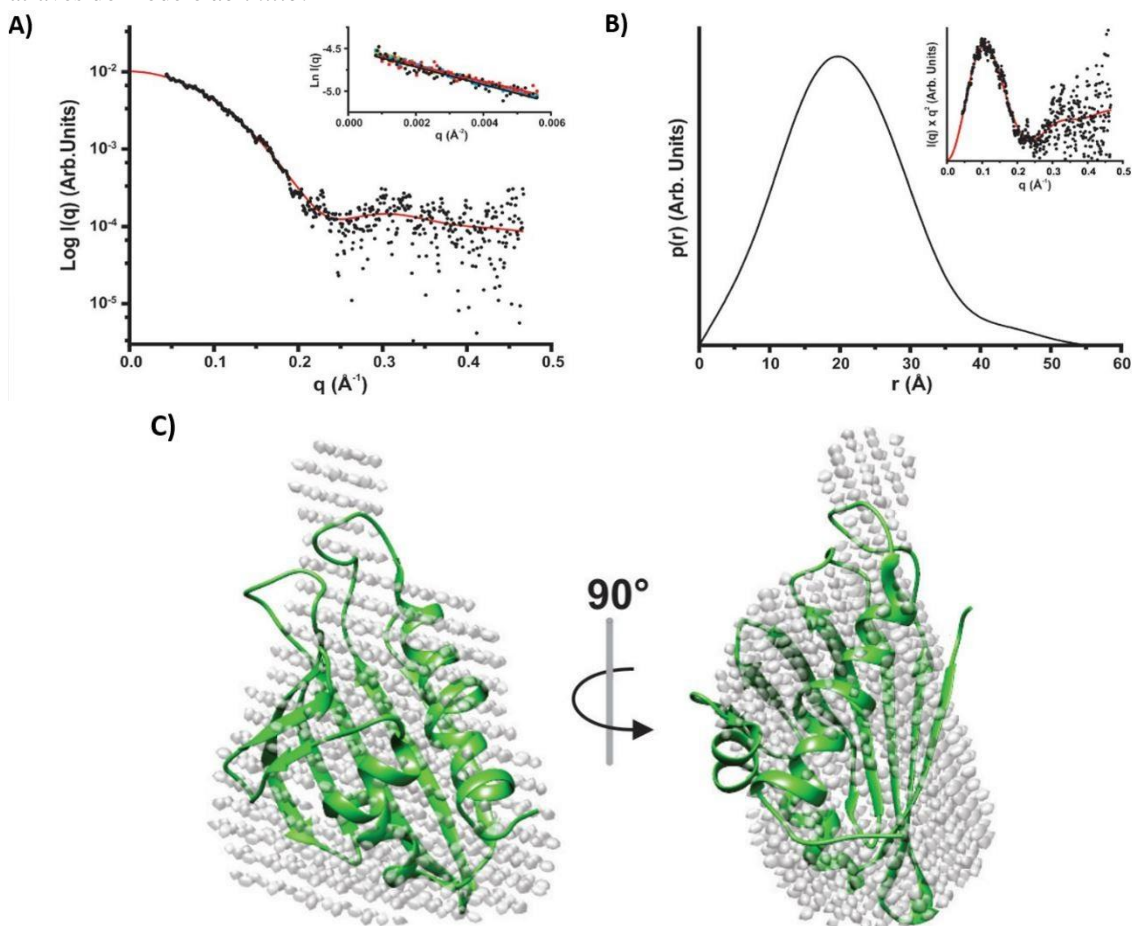
Fonte: Autoria própria.

Após a análise dos dados, o perfil de sedimentação sugeriu a presença de uma espécie homogênea em solução e com MM de $15,6 \pm 0,8$ kDa. O $s_{20,w}^0$ obtido foi $2,00 \pm 0,01$ S e a f/f_0 foi $1,08 \pm 0,04$. Portanto, os dados sugerem que a PfAha4, que é composta por um domínio único, pode ser considerada um monômero globular em solução, diferentemente de outras Ahas, que são compostas por dois domínios e se apresentam como monômeros alongados em solução (Seraphim *et al.*, 2013).

2.5.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

O SAXS foi realizado a fim de verificar como é o envelope da partícula em solução. A Figura 34 A mostra a curva de espalhamento dos raios-X. A região de Guinier (Figura 34A- *inserto*) mostra que a amostra não sofreu aparente agregação durante o tempo do experimento.

Figura 34- Análise de dados de SAXS da PfAha4. Experimentos de SAXS foram feitos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEM, Campinas-SP). A) Perfil de SAXS da PfAha4. *Inserto:* Análise de Guinier mostrando que a amostra se apresentou monodispersa. B) Curva $p(r)$ da PfAha4 sugere que ela é uma proteína globular. *Inserto:* Gráfico de Kratky mostrando o perfil de dispersão da proteína indicando amostra compacta. C) A estrutura 3D da PfAha4 foi ajustada manualmente ao envelope obtido através do modelo *ab initio*.



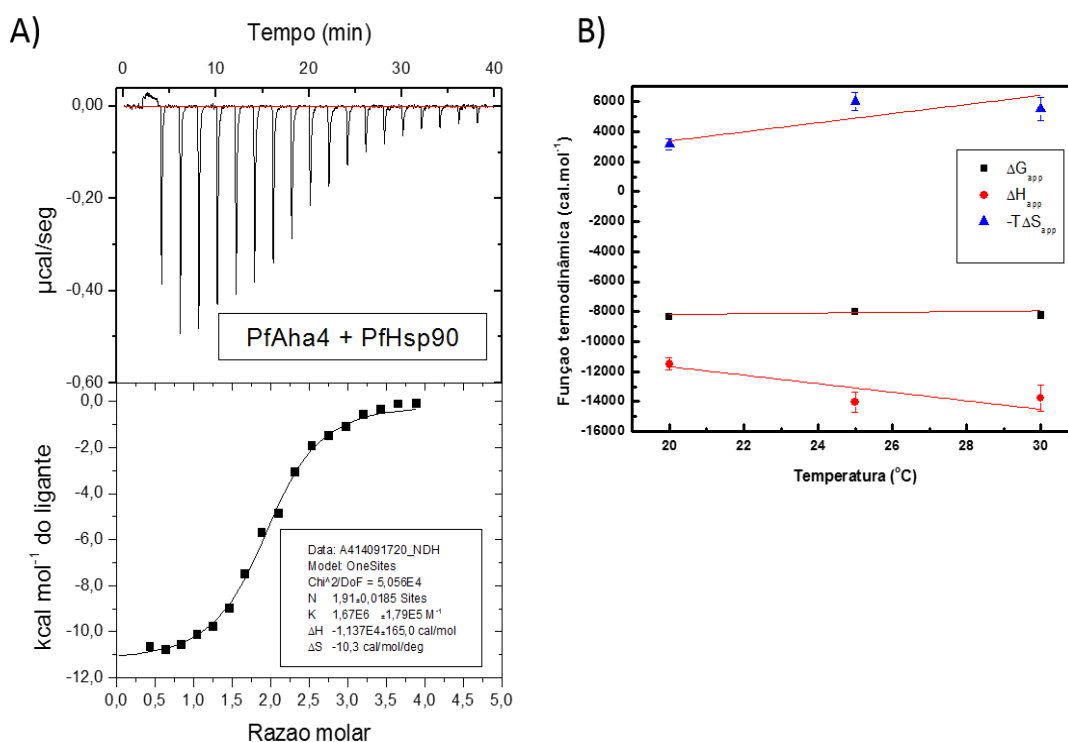
Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Figura 34B (função de distribuição de distâncias – $p(r)$), a distância máxima (D_{max}) obtida foi $55 \pm 5 \text{ \AA}$. O inserto da Figura 34B mostra o gráfico de Kratky, cujo perfil sugere que a PfAha4 é uma proteína compacta. O R_g obtido tem como valor $17,2 \pm 0,2 \text{ \AA}$ (Guinier). O modelo de envelope obtido (Figura 33C) foi validado e teve as propriedades previstas pelo *software HydroPro*. Os resultados previstos para o modelo *ab initio* mostraram R_g de $17,6 \text{ \AA}$ e $s_{20,w}$ de $1,66 \text{ S}$. Juntos, estes resultados mostram que o modelo *ab initio* pode representar a proteína PfAha4 em solução. A proteína apresenta o formato de uma esfera e a sua estrutura cristalográfica pode ser ajustada para esse envelope. Portanto, esses dados convergem com os dados de ultracentrifugação analítica, que mostram que a proteína é um monômero globular em solução.

2.5.8 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica

A caracterização da interação da PfAha4 com a PfHsp90 por ITC foi realizada como descrito no item 2.3.10 da seção material e métodos. Um isotermograma exemplificativo da interação é representado na Figura 35. Esses experimentos de interação foram feitos em quadruplicata e a média encontrada para cada um dos parâmetros termodinâmicos está indicada na Tabela 23. Além disso, essa interação foi observada em mais duas temperaturas testadas: 25 °C e 30 °C. Vale destacar que a Equação 5 do capítulo 1 dessa tese foi utilizada aqui para a obtenção dos parâmetros faltantes nos isotermogramas.

Figura 35- Interação entre a PfAha4 e a PfHsp90 por ITC. A) Isotermograma típico da interação entre a PfAha4 e a PfHsp90 por ITC. A Hsp90 (20 µM, concentração de monômero) foi colocada na cela e a PfAha4 (200 µM) foi colocada na seringa. O experimento foi realizado a 20 °C. Os parâmetros estequiometria (n), constante de associação (K_A), ΔH_{app} e ΔS_{app} foram obtidos após a análise dos dados. B) Funções termodinâmicas ΔG_{app} , ΔH_{app} e $-\Delta S_{app}$ para 3 temperaturas: 20 °C, 25 °C e 30 °C.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 23- Parâmetros termodinâmicos da interação entre a PfAha4 e a PfHsp90 em diferentes temperaturas.

Parâmetros	20 °C	25 °C	30 °C
n	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1
K_A (M⁻¹.10⁻⁵)	16,0 ± 1,0	9,2 ± 0,3	8,9 ± 0,9
K_D (μM)	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
ΔG_{app} (kcal.mol⁻¹)	-8,33 ± 0,04	-8,00 ± 0,02	-8,25 ± 0,06
ΔH_{app} (kcal.mol⁻¹)	-11,5 ± 0,4	-14,0 ± 0,7	-13,8 ± 0,9
ΔS_{app} (cal.mol⁻¹.K⁻¹)	-11 ± 2	-20 ± 2	-18 ± 3
ΔCp_{app} (cal.mol⁻¹.K⁻¹)		-290 ± 90	

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Tabela 23, os dados sugerem a estequiometria de 2:1 (duas moléculas de Aha4 interagem com um dímero de Hsp90) e que essa interação é dirigida pela entalpia ($\Delta H_{app} < 0$) com existência de um custo entrópico em todas as temperaturas testadas ($\Delta S_{app} < 0$), provavelmente devido à restrição dos graus de liberdade da PfHsp90, que inicialmente existia como um equilíbrio de múltiplos estados conformacionais e, com a ligação da Aha4 provavelmente em interfaces opostas do dímero, ficou restrita em poucos estados conformacionais (Seraphim *et al.*, 2013).

A K_D que variou entre $0,6 \pm 0,1$ e $1,1 \pm 0,1$ está na mesma faixa reportada para outras Ahas ortólogas de *L. braziliensis*, humana e de *S. cerevisiae* (Meyer *et al.*, 2004; Siligardi *et al.*, 2004; Retzlaff *et al.*, 2010; Seraphim *et al.*, 2013). O ΔG_{app} permaneceu constante (em torno de -8 kcal.mol^{-1}) em todas as temperaturas, indicando compensação entalpia-entropia.

O ΔH_{app} foi um termo altamente negativo em todas as temperaturas e, quando os valores foram plotados nas três temperaturas, obteve-se a ΔC_{papp} de $-290 \pm 90 \text{ cal.mol}^{-1} \text{K}^{-1}$. Este valor negativo indica que a interação envolve eventos de dessolvatação. Este mecanismo de interação é diferente para o observado na yAha1 e a Aha1 de *L. braziliensis*, cuja ΔC_{papp} positiva indica que a interação com a Hsp90 envolve interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (Meyer *et al.*, 2004; Seraphim *et al.*, 2013).

2.6 CONCLUSÕES

A proteína PfAha4 foi expressa, purificada e obtida com alto grau de pureza e com a massa molecular esperada, o que pôde ser observado no SDS-PAGE 15% contendo as amostras da purificação. Ela estava enovelada, possuindo estrutura secundária composta predominantemente por folhas- β e estruturas desordenadas, o que foi verificado por espectropolarimetria de dicroísmo circular. A proteína também possui estrutura terciária

local, o que foi evidenciado por espectroscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que os três triptofanos presentes na proteína encontram-se enterrados em seu interior, o que também pode ser visto na estrutura cristalográfica da PfAha4 disponível no *Protein Data Bank*. Foram feitos também ensaios de desnaturação térmica e química, esta última utilizando como agentes desnaturantes ureia e Gnd-HCl. Os testes mostraram que a proteína estava enovelada antes de 64 °C e que ela sofre desenovelamento térmico irreversível. Os testes de desenovelamento químico mostraram os valores de T_m em que a proteína se encontra 50% enovelada e 50% desenovelada. A ultracentrifugação analítica sugere que a proteína é um monômero globular em solução, o que foi confirmado pela técnica de SAXS. Estes dados divergem para outras Ahas conhecidas que, diferentemente da PfAha4, são compostas por dois domínios e apresentam-se como monômeros alongados em solução. A PfAha4 foi capaz de interagir com a PfHsp90 por calorimetria de titulação isotérmica em uma estequiometria de 2:1 (duas moléculas de PfAha4 provavelmente interagindo em interfaces opostas de cada dímero de PfHsp90) mostrando que ela é funcional. Os parâmetros termodinâmicos dessa interação indicaram que ela é dirigida pela entalpia, porém apresenta custo entrópico, provavelmente devido à restrição dos graus de liberdade da PfHsp90 durante a ligação da PfAha4. O valor negativo de $\Delta C_{p,app}$ indicou que a interação envolve eventos de dessolvatação, diferentemente do que ocorre para outras Ahas. Portanto, a PfAha4 apresentou características estruturais intrínsecas de proteínas da família Aha, porém, apresentou diversas peculiaridades, tornando-a um alvo extremamente interessante de estudo, visto principalmente a necessidade da prospecção de novos alvos no combate à malária.

2.7 REFERÊNCIAS

ALI, M. M. et al. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1013-7, Apr 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625188> >.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 61, p. 223-74, 2006. ISSN 0065-308X.

AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 2, p. 266-74, Aug 2007. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690398> >.

ANGULO, J.; ENRÍQUEZ-NAVAS, P. M.; NIETO, P. M. Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates. **Chemistry**, v. 16, n. 26, p. 7803-12, Jul 2010. ISSN 1521-3765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496354> >.

BATISTA, F. A. et al. From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/Hsp90 Network. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 16, n. 8, p. 735-53, 2015. ISSN 1875-5550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25961397> >.

BIAMONTE, M. A. et al. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. **J Med Chem**, v. 53, n. 1, p. 3-17, Jan 2010. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055425> >.

BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 18709-13, May 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611889> >.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Arch Biochem Biophys**, v. 452, n. 1, p. 46-54, Aug 2006. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806043> >.

_____. Analysis of molecular targets of Mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 9, p. 1276-85, 2011. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366535> >.

CHEN, B., PIEL, W. H., GUI, L., BRUFORD E., MONTEIRO, A. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. **Genomics**, v. 86, p. 627 – 637, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269234>>.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure of the ATP-binding domain of Plasmodium falciparum Hsp90. **Proteins**, v. 78, n. 13, p. 2738-44, Oct 2010. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20635416> >.

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

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotrophic allosteric mechanism. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 2, p. 132-42, Feb 2011. ISSN 1875-5305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121894> >.

DA SILVA, V. C. et al. Conformational and functional studies of a cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90 from sugarcane. **Plant Physiol Biochem**, v. 68, p. 16-22, Jul 2013. ISSN 1873-2690. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619240> >.

DORES-SILVA, P. R. et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0117170, 2015. ISSN 1932-6203.

EUSTACE et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. **Nature cell biology**, v. 6, p. 507-514, 2004. doi:10.1038/ncb11312004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146192> >.

FORSBERG, L. K. et al. Exploiting polarity and chirality to probe the Hsp90 C-terminus. **Bioorg Med Chem**, Apr 2018. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29720349> >.

GARNIER, C. et al. Binding of ATP to heat shock protein 90 - Evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 14, p. 12208-12214, 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < ISI:000174846400079 >.

GHOSH, S. et al. Hsp90 C-terminal inhibitors exhibit antimigratory activity by disrupting the Hsp90 α /Aha1 complex in PC3-MM2 cells. **ACS Chem Biol**, v. 10, n. 2, p. 577-90, Feb 20 2015. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25402753> >.

GOMES, A. P. et al. Malária grave por Plasmodium falciparum. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 358-369, 2011. ISSN 0103-507X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2011000300015&nrm=iso >.

HAINZL, O. et al. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 34, p. 22559-67, Aug 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553666> >.

HESSLING, M.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 3, p. 287-93, Mar 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234467> >.

JANIN, Y. L. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 9-10, p. 342-53, May 2010. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230904> >.

JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **J Mol Recognit**, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999 Jan-Feb 1999. ISSN 0952-3499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398392> >.

KOULOV, A. V. et al. Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 6, p. 871-884, 2010. ISSN 1059-1524.

KRUKENBERG, K. A. et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. **Q Rev Biophys**, v. 44, n. 2, p. 229-55, May 2011. ISSN 1469-8994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414251> >.

LADBURY, J. E.; KLEBE, G.; FREIRE, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 23-7, Jan 2010. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960014> >.

LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 5, p. 560-6, Oct 2001. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785756> >.

LESKOVAR, A., WEGELE, H., WERBECK, N.D., BUCHNER, J., AND REINSTEIN, J. The ATPase cycle of the mitochondrial Hsp90 analog trap1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p.11677-11688, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287101> >.

LI, J. et al. Structure insights into mechanisms of ATP hydrolysis and the activation of human heat-shock protein 90. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 44, n. 4, p. 300-6, Apr 2012. ISSN 1745-7270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318716> >.

MAIER, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **J Chem Theory Comput**, v. 11, n. 8, p. 3696-713, Aug 11 2015. ISSN 1549-9626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574453> >.

MANTA, B. et al. Tools to evaluate the conformation of protein products. **Biotechnol J**, v. 6, n. 6, p. 731-41, Jun 2011. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567963> >.

MARCU, M. G. et al. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. **J Biol Chem**, v. 275, n. 47, p. 37181-6, Nov 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945979> >.

MARTINEZ, L. et al. Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 49, p. 20717-22, Dec 8 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926848> >.

MAYER, M.; MEYER, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 38, n. 12, p. 1784-1788, 1999. ISSN 1433-7851. Disponível em: < [ISI://WOS:000081136700021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414845) >.

_____. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **J Am Chem Soc**, v. 123, n. 25, p. 6108-17, Jun 27 2001. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414845> >.

MCLAUGHLIN S. H. , VENTOURAS L. A., LOBBEZOO B., JACKSON S. E. Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform. **J Mol Biol.**, v. 344, p. 813-826, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533447> >.

MCLAUGHLIN, S. H.; SMITH, H. W.; JACKSON, S. E. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. **J Mol Biol**, v. 315, n. 4, p. 787-98, Jan 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812147> >.

MEAGHER, K. L.; REDMAN, L. T.; CARLSON, H. A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. **J Comput Chem**, v. 24, n. 9, p. 1016-25, Jul 15 2003. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759902> >.

MEYER, P. et al. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. **Molecular cell**, v. 11, n. 3, p. 647-658, 2003. ISSN 1097-2765.

_____. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO J**, v. 23, n. 6, p. 1402-10, Mar 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039704> >.

MILLER, B. R., 3RD et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **J Chem Theory Comput**, v. 8, n. 9, p. 3314-21, Sep 11 2012. ISSN 1549-9618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26605738> >.

MINARI, K., AZEVEDO, E. C., KIRALY, V. T. R., BATISTA, F. A. H., MORAES, F. R., MELO, F. A., NASCIMENTO, A. S., GAVA, L. M., RAMOS, C. H. I., BORGES, J. C. Thermodynamic analysis of interactions of the Hsp90 with adenosine nucleotides: a comparative perspective (submetido).

NGUYEN, E. V. et al. Identification of novel response and predictive biomarkers to Hsp90 inhibitors through mass spectrometry-based proteomic profiling of patient-derived

prostate tumor explants. **Mol Cell Proteomics**, Apr 2018. ISSN 1535-9484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632047> >.

OBERMANN, W. M. et al. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. **J Cell Biol**, v. 143, n. 4, p. 901-10, Nov 1998. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817749> >.

OWEN, B.A.L., SULLIVAN, W.P., FELTS, S.J., AND TOFT, D.O. Regulation of Heat Shock Protein 90 ATPase Activity by Sequences in the Carboxyl Terminus. **J.Biol.Chem**, v. 277, p.7086-7091, 2002. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/277/9/7086.long> >.

PACE, C. N.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M. Denaturation of proteins by urea and guanidine hydrochloride. **Protein Science Encyclopedia**, 2008. ISSN 3527610758.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Sci**, v. 4, n. 11, p. 2411-23, Nov 1995. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8563639> >.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from Plasmodium falciparum and Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J Biol Chem**, v. 285, n. 49, p. 37964-75, Dec 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837488> >.

PANARETOU, B., PRODROMOU, C., ROE, S.M., O'BRIEN, R., LADBURY, J.E., PIPER, P.W., AND PEARL, L.H. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. **EMBO J.**, v. 17, p. 4829-4836, 1998. Disponível em : < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170812/> >.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and in vivo function of Hsp90. **Curr Opin Struct Biol**, v. 10, n. 1, p. 46-51, Feb 2000. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679459> >.

_____. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 271-94, 2006. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756493> >.

PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods**, v. 19, n. 2, p. 213-21, Oct 1999. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527727> >.

PIZARRO JC, HILLS T, SENISTERRA G, WERNIMONT AK, MACKENZIE C, et al. (2013) Exploring the Trypanosoma brucei Hsp83 Potential as a Target for Structure. Guided Drug Design. PLoS Negl Trop Dis 7(10): e2492. doi:10.1371/journal.pntd.0002492.

POSFAI, D. et al. Identification of Hsp90 Inhibitors with Anti-Plasmodium Activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 4, Apr 2018. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29339390> >.

PRODROMOU, C. et al. Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65-75, 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400803141> >.

RAMSEY, S. et al. Solvation thermodynamic mapping of molecular surfaces in AmberTools: GIST. **J Comput Chem**, v. 37, n. 21, p. 2029-37, Aug 2016. ISSN 1096-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317094> >.

RATZKE, C.; BERKEMEIER, F.; HUGEL, T. Heat shock protein 90's mechanochemical cycle is dominated by thermal fluctuations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 1, p. 161-6, Jan 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184223> >.

RATZKE, C.; HELLENKAMP, B.; HUGEL, T. Four-colour FRET reveals directionality in the Hsp90 multicomponent machinery. **Nat Commun**, v. 5, p. 4192, Jun 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947016> >.

RATZKE, C. et al. From a ratchet mechanism to random fluctuations evolution of Hsp90's mechanochemical cycle. **J Mol Biol**, v. 423, n. 3, p. 462-71, Oct 2012. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878379> >.

RETZLAFF, M. et al. Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. **Mol Cell**, v. 37, n. 3, p. 344-54, Feb 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159554> >.

RICHTER K., SOROKA J., SKALNIAK L., LESKOVAR A., HESSLING M., REINSTEIN J., BUCHNER J. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. **J Biol Chem**. v. 283, p.17757-17765. 2008. doi: 10.1074/jbc.M800540200.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E., 3RD. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **J Chem Theory Comput**, v. 9, n. 7, p. 3084-95, Jul 9 2013. ISSN 1549-9618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583988> >.

SAHASRABUDHE, P. et al. The Plasticity of the Hsp90 Co-chaperone System. **Mol Cell**, v. 67, n. 6, p. 947-961.e5, Sep 2017. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28890336> >.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 10, p. 630-42, Oct 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026055> >.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993. ISSN 0022-2836. Disponível em: < ISI:A1993MK79900020 >.

SCHOPF, F. H.; BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 345-360, Jun 2017. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28429788> >.

SERAPHIM, T. V. et al. Low resolution structural studies indicate that the activator of Hsp90 ATPase 1 (Aha1) of *Leishmania braziliensis* has an elongated shape which allows its interaction with both N- and M-domains of Hsp90. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66822, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826147> >.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania Parasites. In: HOURY, W. A. (Ed.). **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**. New York, NY: Springer New York, 2014. p.445-481. ISBN 978-1-4939-1130-1.

SERAPHIM, T. V. et al. Insights on the structural dynamics of *Leishmania braziliensis* Hsp90 molecular chaperone by small angle X-ray scattering. **Int J Biol Macromol**, v. 97, p. 503-512, Apr 2017. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104372> >.

SHEN, M. Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Sci**, v. 15, n. 11, p. 2507-24, Nov 2006. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075131> >.

SILIGARDI, G. et al. Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 51989-98, Dec 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466438> >.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. **BBA-Proteins Proteom.**, v. 1834, n. 1, p. 351-361, 2013a. ISSN 1570-9639. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157096391200177X?v=s5> >.

SILVA, N. S. M. et al. Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in *Plasmodium falciparum* genome. **Int J Biol Macromol**, v. 108, p. 193-204, Mar 2018. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191421> >.

SINGH, C.; ATRI, N. Chemo-informatic design of antibiotic geldenamycin analogs to target stress proteins HSP90 of pathogenic protozoan parasites. **Bioinformation**, v. 9, n. 7, p. 329-33, 2013. ISSN 0973-2063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750075> >.

SMITH, H. L.; LI, W.; CHEETHAM, M. E. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 40, p. 142-52, Apr 2015. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770416> >.

SOUTHWORTH, D. R.; AGARD, D. A. Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. **Mol Cell**, v. 32, n. 5, p.

631-40, Dec 2008. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061638> >.

STREET, T. O.; LAVERY, L. A.; AGARD, D. A. Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. **Mol Cell**, v. 42, n. 1, p. 96-105, Apr 2011. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474071> >.

TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Anal Biochem**, v. 296, n. 2, p. 179-87, Sep 2001. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554713> >.

TSUTSUMI, S.; NECKERS, L. Extracellular heat shock protein 90: A role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. **Cancer Sci**, v. 98, n. 10 | p.1536–1539, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645779> >.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng**, v. 8, n. 2, p. 127-34, Feb 1995. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7630882> >.

WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **J Biol Chem**, v. 283, n. 27, p. 18473-7, Jul 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18442971> >.

WANG, T. et al. Differences in conformational dynamics between Plasmodium falciparum and human Hsp90 orthologues enable the structure-based discovery of pathogen-selective inhibitors. **J Med Chem**, v. 57, n. 6, p. 2524-35, Mar 2014. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24580531> >.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. In: (Ed.). **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**: Springer, 2004. p.1-44.

WEGELE, H., MUSCHLER, P., BUNCK, M., REINSTEIN, J., AND BUCHNER, J.. Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90. **J Biol Chem**, v. 278, p. 39303-39310, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890674> >.

WEIKL, T., MUSCHLER, P., RICHTER, K., VEIT, T., REINSTEIN, J., and BUCHNER, J. C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. **J Mol Biol**, v. 303, p. 583-592, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054293> >.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-16, Nov 2001. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694568> >.

YAN, L. et al. BIIB021: A novel inhibitor to heat shock protein 90–addicted oncology. **Tumor Biology**, v. 39, n. 4, 2017. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1010428317698355> >.

YOUNG, J.C., AND HARTL, F.U. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. **EMBO J**, v. 19, p. 5930-5940, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060043> >.

ZHANG, H. et al. A dynamic view of ATP-coupled functioning cycle of Hsp90 N-terminal domain. **Sci Rep**, v. 5, p. 9542, Apr 13 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867902> >.

ZHAO, R. et al. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 715-27, Mar 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766533> >.

_____. Tamoxifen enhances the Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e9934, Apr 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376192> >.

ZIERER, B. K. et al. Importance of cycle timing for the function of the molecular chaperone Hsp90. **Nat Struct Mol Biol**, v. 23, n. 11, p. 1020-1028, Nov 2016. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27723736> >.

ZUBRIENÉ, A. et al. Thermodynamics of radicicol binding to human Hsp90 alpha and beta isoforms. **Biophys Chem**, v. 152, n. 1-3, p. 153-63, Nov 2010. ISSN 1873-4200. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943306> >.

ZURAWSKA, A. et al. Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 5, p. 575-83, May 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226818> >.