

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Glessler Silva Almeida

Estudo Funcional Comparativo das Co-Chaperonas Moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*

São Carlos

2014

Estudo Funcional Comparativo das Co-Chaperonas Moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Glessler Silva Almeida

Estudo Funcional Comparativo das Co-Chaperonas Moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética e Evolução, da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Evolutiva e Biologia Molecular, na área de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A447ef Almeida, Glessler Silva.
Estudo funcional comparativo das co-chaperonas
moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania
braziliensis* / Glessler Silva Almeida. -- São Carlos : UFSCar,
2014.
76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Proteínas. 2. Chaperona molecular. 3. Co-chaperona.
4. Hsp90. 5. p23. 6. *Leishmania braziliensis*. I. Título.

CDD: 574.19296 (20^a)

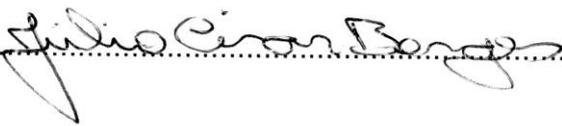
“Estudo Funcional Comparativo das Co-Chaperonas
Moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*”

Dissertação de Mestrado de

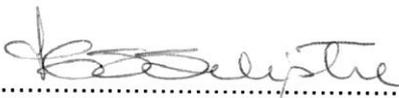
GLESSLER SILVA ALMEIDA

Banca Examinadora

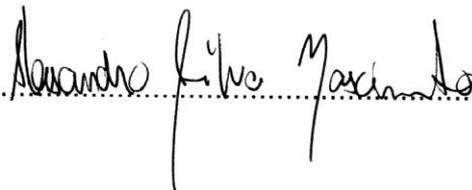
Prof. Dr. Júlio César Borges

.....

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

.....

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento

.....

Dedico esse trabalho à minha família e às pessoas que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família. Aos meus pais, Izilda Silva Almeida e Raimundo de Deus Almeida, por todo amor, carinho, dedicação e paciência que tiveram comigo ao longo da vida. Agradeço o apoio que eles me deram (e continuam me dando) em todo momento e por serem os maiores exemplos de seres humanos que eu tenho na vida. Agradeço a minha tia, Joana, meu tio, José Bento, e a minha avó, Conceição, por todos os esforços que tiveram na minha formação pessoal. Amo todos vocês.

Agradeço a minha noiva, Camila, por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos. Por sempre acreditar em mim e me apoiar em diversos momentos. Obrigado por me “aguentar” por todos esses anos. Amo você *forever*.

Agradeço ao Prof. Dr. Júlio César Borges pela orientação nessa dissertação de mestrado.

Agradeço à Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar) e ao Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (USP/IFSC) por participarem da minha banca de defesa de mestrado e por contribuírem na melhora dessa dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann (USP/IFSC) e à Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo (USP/IFSC) por participarem da minha qualificação de mestrado e pela contribuição que deram para esse mestrado.

Agradeço a todos os amigos de laboratório, por toda a ajuda, discussões e suporte ao longo desses anos. Vocês foram fundamentais em diversos momentos e são parte importante na minha formação pessoal e profissional.

Agradeço aos meus amigos de São Paulo que, mesmo longe, estiveram ao meu lado desde o primeiro dia que cheguei a São Carlos.

Agradeço a todos os professores (ensino fundamental, médio e superior) que tive ao longo dessa jornada acadêmica. Todos vocês foram fundamentais para minha formação pessoal.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar e a secretária desse Programa, Ivanildes, por todo o suporte e ajuda durante esse mestrado.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos/USP por todo o suporte e ajuda durante o mestrado, além disso, agradeço ao Grupo de Biofísica Molecular e ao Grupo de Química Medicinal, ambos do IQSC, e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pela infraestrutura na realização de alguns experimentos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento e Pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro ao projeto e ao CNPq pela bolsa de mestrado.

“Expectation is the root of all heartache”.

(Anônimo)

RESUMO

O enovelamento proteico é essencial para a correta função biológica das proteínas. Falhas nesse processo podem levar à formação de proteínas mal enoveladas e/ou agregados proteicos. Para tentar evitar esse problema, a célula expressa uma família de proteínas denominadas de chaperonas moleculares ou proteínas de choque térmico (Hsp). As chaperonas moleculares auxiliam no enovelamento correto de outras proteínas, entre outras funções importantes para as células. A família das Hsp90 são chaperonas importantes por auxiliarem no enovelamento proteico e prevenirem a agregação de proteínas. A Hsp90 é regulada por diversas co-chaperonas, como, por exemplo, a p23. A p23 é uma pequena proteína ácida que regula a atividade ATPásica da Hsp90. Ela possui um domínio N-terminal estruturado em folhas-beta e um domínio C-terminal desestruturado. Além do papel regulatório, inibindo a atividade ATPásica da Hsp90, ela possui atividade chaperona. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi estudar comparativamente as duas p23 identificadas no genoma do protozoário *Leishmania braziliensis* (Lbp23A e Lbp23B). As proteínas foram expressas, purificadas e caracterizadas estrutural e funcionalmente. Além disso, foram desenvolvidos experimentos funcionais como: atividade chaperona; inibição da atividade ATPásica da Hsp90 de *L. braziliensis* (LbHsp90) e identificação *in vivo* por *western blotting*. Os resultados indicam que essas duas proteínas são similares estruturalmente, porém, possuem estabilidade química e térmica notavelmente diferente. Ambas Lbp23 apresentam diferenças em relação à atividade chaperona e inibição da atividade ATPásica da LbHsp90. A identificação *in vivo* mostrou a presença das duas Lbp23 em extratos de *L. braziliensis*; além de sugerir possíveis modificações pós-traducionais na Lbp23B. Os resultados indicam que ambas as Lbp23 de *L. braziliensis* são inequivocamente p23, pois possuem sinais estruturais e função desta co-chaperona.

ABSTRACT

Protein folding is essential for proteins' proper biological function. Failures in this process can lead to the formation of poorly unfolded proteins and/or protein aggregates. In order to avoid this problem, the cells express a family of proteins known as molecular chaperones. The molecular chaperones are proteins that assist the correct folding of other proteins, and other important functions in the cells. The Hsp90 family is important for protein folding and it assists in preventing protein aggregation. Hsp90 is regulated by several co-chaperones, for example, p23. The p23 is a small acidic protein that regulates the ATPase activity of Hsp90. It has a structured N-terminal beta-sheet and an unstructured C-terminal domain. In addition to the regulatory role, as an inhibitor of ATPase activity of Hsp90, it also has chaperone activity in itself. Thus, the aim of this study was to investigate comparatively two p23 identified in the *Leishmania braziliensis* (Lbp23A and Lbp23B) genome. The proteins were expressed, purified and structurally and functionally characterized. Furthermore, functional assays such as intrinsic chaperone activity and inhibition of ATPase activity of Hsp90 *L. braziliensis* (LbHsp90) and identifying *in vivo* by western blotting were developed. The results indicate that these two proteins are structurally similar, however, demonstrated significant differences in chemical and thermal stability. The Lbp23 also differ in relation to chaperone activity and inhibition of ATPase activity of LbHsp90. The *in vivo* identification revealed the presence of both Lbp23 in extracts of *L. braziliensis*; besides suggesting possible post-translational modifications in Lbp23B. The results indicate that both Lbp23 are undoubtedly p23, since they show p23-like function and structural signs.

Lista de Figuras

Figura 1 - Os quatro níveis de organização das proteínas	16
Figura 2 - Função de Proteínas	18
Figura 3 - Diferentes conformações adotadas pela Hsp90	22
Figura 4 - Diagrama esquemático da Hsp90 humana	23
Figura 5 - Ciclo Funcional das Hsp90	26
Figura 6 - Gêneros e espécies de Leishmania	29
Figura 7 - Ciclo de Vida do Parasita Leishmania	30
Figura 8 - Alinhamento da Sequência de Aminoácidos das Lbp23 com a hp23	45
Figura 9 - Alinhamento global da p23 de protozoários	48
Figura 10 - Expressão e Purificação das Co-chaperonas Lbp23A (A) e Lbp23B (B)	49
Figura 11 - Dicroísmo Circular da Lbp23A e Lbp23B	50
Figura 12 - Fluorescência Intrínseca do Triptofano	52
Figura 13 - Ensaio de Ultracentrifugação Analítica com a Lbp23A e com a Lbp23B	53
Figura 14 - Desenovelamento Térmico das Lbp23 por Monitorado por CD	55
Figura 15 - Desenovelamento Térmico das Lbp23 Monitorado por DSC	56
Figura 16 - Desenovelamento Químico das Lbp23 por Ureia Monitorada por Fluorescência	57
Figura 17 - Atividade Chaperona das Co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B	59
Figura 18 - Inibição da Atividade ATPase da Lbp23A e da Lbp23B	60
Figura 19 - Ensaio de identificação in vivo da Lbp23A por Western Blotting	62
Figura 20 - Ensaio de identificação in vivo da Lbp23B por Western Blotting	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais Famílias de Chaperonas Moleculares	20
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das proteínas de estudo	38
Tabela 3 - Valores de similaridade e identidade entre as Lbp23 e a hp23	45
Tabela 4 - Organismos selecionados para construção da árvore de alinhamento	47
Tabela 5 - Potenciais Sítios de Fosforilação nas Lbp23	64

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 Proteínas	14
1.2 Chaperonas Moleculares	19
1.3 As Hsp90	20
1.4 Ciclo Funcional das Hsp90	24
1.5 A Co-chaperona Molecular p23	26
1.6 O gênero Leishmania	28
2.0 OBJETIVOS GERAIS	33
2.1 Objetivos Específicos	33
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Expressão e Purificação da Lbp23A e da Lbp23B	34
3.1.1 Linhagens Bacterianas de Expressão Proteica	34
3.1.2 Transformação Bacteriana	34
3.1.3 Expressão da Lbp23A, Lbp23B e da LbHsp90	35
3.1.4 Lise Bacteriana	35
3.1.5 Purificação da Lbp23A e da Lbp23B	36
3.1.6 SDS-PAGE	36
3.1.7 Determinação da Concentração de Proteína	37
3.2 Propriedades Físico-químicas das Proteínas de Estudo	38
3.3 Identificação das Proteínas e Alinhamento das Sequências de Aminoácidos.	38
3.4 Similaridades entre diferentes p23	39
3.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular	39
3.6 Desenvolvimento Térmico monitorado por CD	39
3.7 Fluorescência Intrínseca do Triptofano	40
3.9 Calorimetria de Varredura Diferencial	41
3.10 Atividade Chaperona	42
3.11 Inibição da Atividade ATPásica	42
3.12 Estudos <i>in vivo</i>	43
	12

3.12.1 Crescimento do protozoário	43
3.12.2 Western blotting	44
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Estudo da estrutura primária das Lbp23.	45
4.2 Expressão e purificação das Lbp23	49
4.3 Estrutura secundária	50
4.4 Estrutura terciária local	51
4.5 Caracterização Hidrodinâmica das Lbp23	52
4.6. Estabilidade Térmica e Química	54
4.7 Atividade Chaperona	57
4.8 Inibição da atividade ATPásica da LbHsp90	59
4.9 Identificação <i>in vivo</i>	61
5.0 CONCLUSÕES	65
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNAS

Entre as macromoléculas mais abundantes presentes nas células dos seres vivos estão as proteínas (ALBERTS et al., 2002). A estrutura nativa possui papel importantíssimo em sua atividade biológica, sendo que na sequência de aminoácidos estão presentes todas as informações necessárias para o enovelamento proteico (ANFENSEN, 1973). Além da grande versatilidade e complexidade biológica, as proteínas estão envolvidas em quase todos os processos biológicos (HARTL et al., 2011).

Os aminoácidos são a matéria-prima para a formação das proteínas. De uma maneira geral, existem 20 tipos diferentes de aminoácidos, cada qual com uma propriedade físico-química distinta, sendo todos eles α -aminoácidos. Um α -aminoácido consiste em um átomo de carbono central (carbono-alfa) ligado a um grupo amina, um grupo carboxílico, um átomo de hidrogênio e a um grupo R (ou cadeia lateral). Diferenças na estrutura, no tamanho e na carga elétrica, entre os aminoácidos, são resultantes das cadeias laterais. Vale destacar que, além desses 20 aminoácidos, há outros aminoácidos menos comuns, contudo não são constituintes das proteínas (NELSON; COX, 2008; BERG et al., 2002).

As proteínas são formadas pela união entre os aminoácidos, sendo esses ligados covalentemente pela ligação peptídica. O grupo amina de um aminoácido reage com o grupo carboxílico de outro aminoácido, com consequente eliminação de uma molécula de água. Cada proteína possui sua própria sequência de aminoácidos, sendo essa determinada pela sequência de nucleotídeos do DNA, e a diversidade de proteínas encontrada na natureza é enorme (ALBERTS et al., 2002; WHITFORD, 2005).

Além da grande diversidade e complexidade apresentadas pelas proteínas, elas apresentam diferentes graus estruturais, que vão desde a simples sequência de aminoácidos até a interação entre diferentes proteínas. Como mencionado anteriormente, a sequência de aminoácidos se constitui no primeiro estágio estrutural de uma proteína, ou seja, a estrutura primária

emerge da sequência linear dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, sendo esses aminoácidos unidos covalentemente pela ligação peptídica. A informação para a estrutura primária está contida na sequência de nucleotídeos, no DNA, e é específica para cada proteína (NELSON; COX, 2008; WHITFORD, 2005).

A estrutura primária leva ao segundo nível organizacional dessas macromoléculas: a estrutura secundária. Essa estrutura se caracteriza pela conformação local da cadeia polipeptídica e pela relação entre os resíduos de aminoácidos que estão perto devido à estrutura primária. Os grupos N-H e C=O na cadeia principal interagem por meio de ligações de hidrogênio, sem envolver as cadeias laterais, possibilitando esse tipo de estrutura. Em proteínas globulares, os três tipos básicos de estrutura secundária são: hélice-alfa, folha-beta e voltas (ALBERTS et al., 2002; WHITFORD, 2005).

A hélice-alfa foi inicialmente encontrada numa proteína chamada alfa-queratina, muito comum em pele, cabelo, unha e chifre. A hélice-alfa é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e C=O da cadeia principal (BERG et al., 2002). De maneira geral, o grupo C=O de cada aminoácido forma uma ligação de hidrogênio com o grupo N-H de um aminoácido situado quatro resíduos adiante da sequência de aminoácidos. Com isso, temos uma hélice regular com voltas completas a cada 3,6 resíduos de aminoácidos.

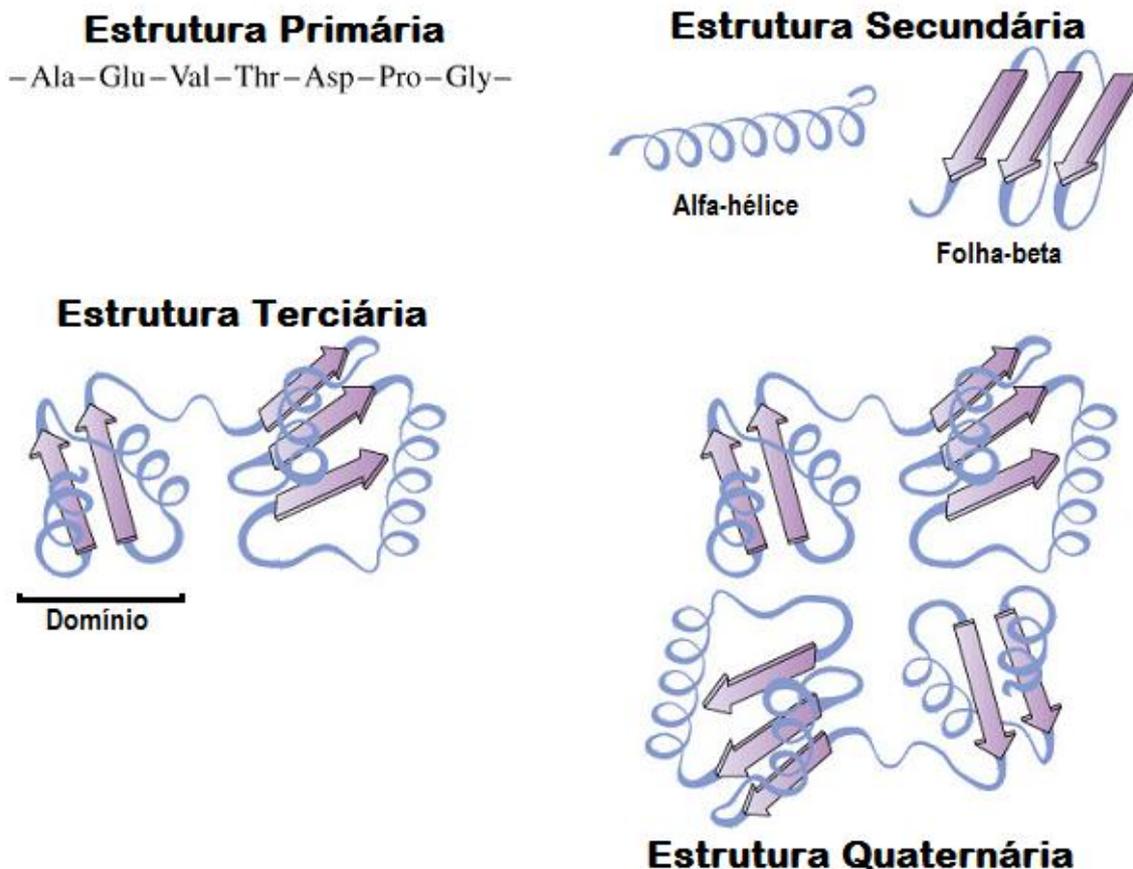
Na folha-beta, descoberta na fibroína (presente na seda), a cadeia polipeptídica é estendida na forma de zigue-zague, ao invés da estrutura em hélice; desta forma, o arranjo é organizado numa série de dobras. Nesse arranjo, as ligações de hidrogênio são formadas com os seguimentos adjacentes da cadeia polipeptídica (NELSON; COX, 2008; WHITFORD, 2005).

Em proteínas com estrutura compacta, como as proteínas globulares, aproximadamente, um terço dos resíduos de aminoácidos formam *loops*, onde a cadeia polipeptídica muda de direção; essas conexões recebem o nome de voltas (NELSON; COX, 2008).

Interações distantes ou não locais caracterizam a estrutura terciária (ou arranjo tridimensional), sendo que a interação de regiões com estruturas e sem estruturas secundárias permitem esse tipo de enovelamento. Esse enovelamento é fruto, também, de diversos fatores externos, como a temperatura, força iônica, acidez, etc. (RUDDON; BEDOWS, 1997).

A estrutura quaternária é a associação entre duas, ou mais, macromoléculas proteicas (ou subunidades), formando um complexo tridimensional, sendo a hemoglobina, talvez, o exemplo mais citado quando se fala nesse tipo de estrutura (NELSON; COX, 2008).

Figura 1 - Os quatro níveis de organização das proteínas.



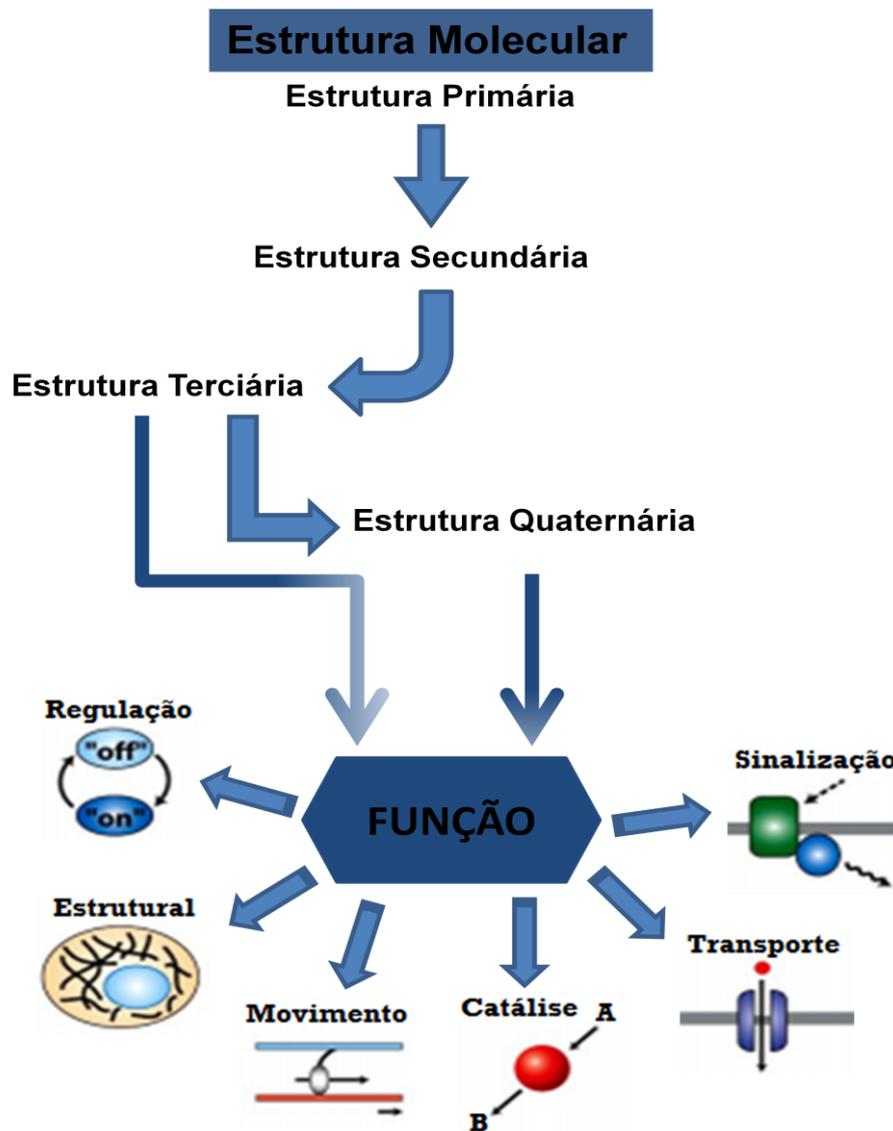
(Modificada de http://www.bioinformaticaindeklas.nl/en_oud/basicsa.html).

As proteínas possuem diversas funções biológicas, possuindo uma ampla gama de atuações dentro do organismo. Sendo assim, podemos citar seu papel enzimático, catalisando diversas reações químicas; sua atuação no

transporte de moléculas, por exemplo, a hemoglobina; sua função na defesa do organismo contra antígenos, entre outras funções (NELSON; COX, 2008).

Como já dito anteriormente, a atividade biológica de uma proteína depende de um enovelamento correto, sendo este estritamente relacionado com a sequência de aminoácidos que compõe a proteína. Contudo, as proteínas podem interagir de maneira inadequada em certas condições de estresse, como aumento da temperatura e variações de concentrações iônicas, através de regiões hidrofóbicas expostas, formando agregados que tendem a se precipitar (JAENICKE et al., 1987). Diversas doenças parecem estar relacionadas com agregações proteicas, como: mal de Alzheimer, mal de Parkinson, fibrose cística, doença de Huntington, alguns tipos de câncer, entre outras (RUDDON; BEDOWS, 1997; BEISSINGER; BUCHNER, 1998; CHAI et al., 1999; HARTL; HAYER-HARTL, 2002).

Figura 2 - Função de Proteínas.



Buscando contornar o problema da agregação proteica, a célula expressa uma classe de proteínas, em condições normais e em condições de estresse, para auxiliar no correto enovelamento proteico, assim como para recuperar proteínas agregadas, entre outras funções biológicas. Tais proteínas são denominadas proteínas de choque térmico (do inglês, *Heat shock proteins* - Hsp) ou chaperonas moleculares, e são alvos de diversas revisões científicas (FINK, 1999; BORGES; RAMOS, 2005; TREPEL et al., 2010; BARDWELL; JAKOB, 2012; ROHL et al., 2013; HARTL et al., 2011) assim como de diferentes linhas de pesquisa.

1.2 CHAPERONAS MOLECULARES

O nome chaperona molecular foi inicialmente usado para descrever o papel da nucleoplasmina na oligomerização das histonas na cromatina. A nucleoplasmina evita a agregação das histonas, promovendo uma correta oligomerização, porém sem participar da estrutura final, ou seja, não modificando a estrutura nativa da proteína-cliente, podendo tal estrutura ser alcançada tanto na presença quanto na ausência da chaperona molecular (LASKEY et al., 1978).

Essas proteínas de choque térmico abrangem uma ampla família de polipeptídeos altamente conservados. O paradigma básico das chaperonas é que elas reconhecem e se ligam seletivamente às proteínas não enoveladas, parcialmente enoveladas ou agregadas, mas não às nativas, formando assim um complexo estável (ELLIS, 1999), sendo que, na maioria dos casos, esses complexos são dissociados pela ligação e hidrólise do ATP (FINK, 1999). Contudo, há chaperonas ATP-independente, uma vez que elas operam em compartimentos celulares sem ATP (periplasma) ou porque elas trabalham em condições de estresse de ATP (estresse oxidativo) (BARDWELL; JAKOB, 2012).

Por conseguirem interagir com tantas proteínas, as chaperonas moleculares possuem funções vitais na homeostase celular. Essa classe de proteínas participa de diversos processos dentro da célula, como: estabilizar proteínas recém-sintetizadas, promover transporte e translocação de macromoléculas, auxiliar no enovelamento e no reenovelamento proteico, evitar agregação de polipeptídios, entre outras funções (HENDRICK; HARTL, 1993).

Na transição entre os estados de desenovelamento e enovelamento, as proteínas passam por estados intermediários, nos quais tem o potencial de se agregar. Isso leva, na célula, a formação de corpos de inclusão, especialmente quando ocorre superexpressão proteica. Para evitar isso, diversas chaperonas se ligam nessas proteínas desenoveladas, ou parcialmente enoveladas, prevenindo, assim, a agregação (FINK, 1999).

As chaperonas, apesar de possuírem diferentes mecanismos de funcionamento, reconhecem e se ligam às superfícies hidrofóbicas de proteínas parcial ou totalmente desenoveladas. Podemos classificá-las, devido à massa molecular, em cinco famílias (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e smHsp). Contudo, para o pleno funcionamento das chaperonas moleculares, regulando ou modulando suas atividades, é necessária a presença de co-fatores ou das co-chaperonas moleculares (BORGES; RAMOS, 2005).

Tabela 1: Principais Famílias de Chaperonas Moleculares

Chaperona	Co-chaperona	M.M. (kDa)	Informações Gerais
Hsp100	?	~100	Atividade ATPase; recupera proteínas de agregados.
Hsp90	HIP, HOP, p23	~90	Previne agregação proteica; liga ATP; interage com diversas proteínas; constitutiva.
Hsp70	Hsp40, GrpE	~70	Atividade ATPase; liga peptídeos de cadeia nascente; envolvida em enovelamento; transporte entre membranas.
Hsp60 (GroEL)	Hsp10 (GroES)	~60	Atividade ATPase; auxilia no enovelamento.
smHsp	?	~15-30	ATP-independente; envolvida em termotolerância.

(Modificado de BORGES; RAMOS, 2005).

1.3 As Hsp90

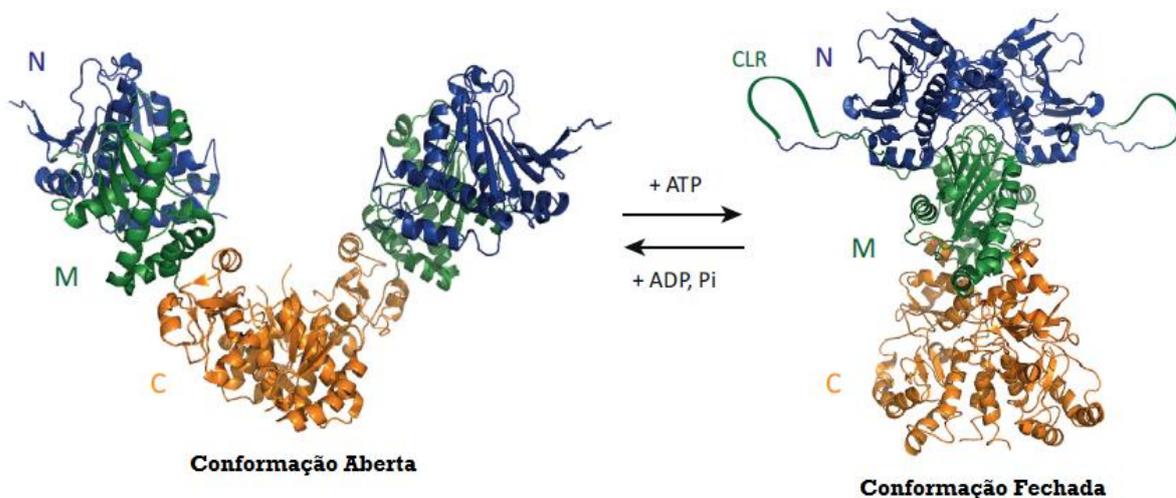
Hsp90, ou *Heat Shock Protein 90*, é uma chaperona molecular ATP-dependente que participa da maturação, ativação e estabilidade de várias proteínas-clientes (NECKERS; WORKMAN, 2012). Ela é a chaperona molecular mais abundante em células eucarióticas, constituindo, aproximadamente, 2% do material proteico de uma célula não submetida ao estresse (ROHL et al., 2013).

As Hsp90 mostram uma grande capacidade de interagir, por meio dos seus vários domínios, com diferentes substratos e co-chaperonas ao mesmo tempo (MEYER et al., 2004). Atualmente, se conhece mais de 300 proteínas com capacidade de interagir com a Hsp90, sendo essas proteínas-clientes importantes reguladoras das mais diversas reações biológicas celulares, fato esse que explica o importante papel da Hsp90 como regulador metabólico (ROHL et al., 2013).

O fato de conseguir interagir com proteínas tão diversas deve-se aos vários estados conformacionais que a Hsp90 pode assumir; motivo esse que explica a dificuldade que foi obter o cristal completo dessa proteína (ALI et al., 2006; SHIAU et al., 2006; KRUKENBERG et al., 2011). A flexibilidade conformacional apresentada, pelas Hsp90, também está relacionada à atividade ATPase dessa proteína, uma vez que o seu domínio N-terminal é capaz de ligar e hidrolisar ATP (ROHL et al., 2013).

A Figura 3 representa dois importantes estágios conformacionais da Hsp90, e mostra como a hidrólise do ATP influencia na estrutura desta chaperona. Na ausência do nucleotídeo a Hsp90 adota uma conformação aberta, onde o domínio N-terminal não se encontra dimerizado. Contudo, uma vez que ocorre na ligação do ATP, no domínio N-terminal, a Hsp90 assume uma conformação fechada. Após a hidrólise do ATP, e a consequente liberação de ADP e fosfato inorgânico, a Hsp90 volta a sua conformação aberta (ROHL et al., 2013).

Figura 3 - Diferentes conformações adotadas pela Hsp90. Conformação aberta: Hsp90 de *Escherichia coli*. Conformação fechada: Hsp90 de *Saccharomyces cerevisiae*.



(Modificado de ROHL et al., 2013).

A Hsp90 é encontrada como um homodímero, possuindo massa molecular entre 82 e 96 kDa, sendo que o monômero é constituído por três domínios: o domínio N-terminal (N), o domínio intermediário (M) e o domínio C-terminal (C) (Figura 4). O domínio N-terminal (~25 kDa) tem sido associado com a fraca atividade ATPase da Hsp90 e pode estar envolvido com as co-chaperonas moleculares e com algumas proteínas-clientes. Além disso, há indícios que em certas situações o domínio N-terminal pode se dimerizar, como quando a Hsp90 liga-se ao ATP ou interage com algum inibidor, causando influência na ligação com proteínas-clientes ou com suas co-chaperonas (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006; PEARL; PRODROMOU, 2006).

O domínio intermediário, M (~35 kDa), tem sido indicado como o principal sítio de interação com proteínas-clientes; possuindo influência na atividade ATPase, exercida pelo domínio N. Os domínios N e M são separados por uma sequência de aminoácidos carregados (*charged linker*), de aproximadamente 60 resíduos, sendo esse *linker* ausente nos procariotos (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006).

Já o domínio C-terminal (~30 kDa) é responsável pela dimerização permanente da Hsp90 e possui sítios de interação com substratos e co-chaperonas (NEMOTO et al., 1995; STEBBINS et al., 1997; MARUYA et al., 1999; PEARL; PRODROMOU, 2006; WANDINGER et al., 2008). Além disso, a

extremidade C-terminal possui a sequência motivo MEEVD, que permite a ligação de proteínas portadoras do domínio TPR (*Tetratricopeptide Repeat*) como a HOP e CHIP (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006), entre outras co-chaperonas.

Figura 4 - Diagrama esquemático da Hsp90 humana



(Adaptado de MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006).

Alguns estudos mostram que modificações pós-traducionais - fosforilações nas serinas, treoninas e tirosinas; acetilação nas lisinas e S-nitrosilação em cisteínas (MAYER, 2010) - podem regular as interações apresentadas entre a Hsp90 e seus substratos (BLANK et al. 2003; WANDINGER et al. 2008).

Em *Leishmania donovani* a montagem de complexos funcionais é possível após mudanças como acetilação e fosforilação nas Hsp90 (MORALES et al., 2010). Atuando na resposta ao estresse térmico, as Hsp90 são importantes para o ciclo de vida de diversos organismos, incluindo de diferentes protozoários, como *Plasmodium falciparum* e a *L. donovani* (WIESGIGL; CLOS, 2001; PAVITHRA et al., 2004).

Os diferentes domínios da Hsp90 interagem com diferentes inibidores, desta forma, o ciclo funcional dessa proteína torna-se comprometido, inviabilizando sua atividade. O domínio N-terminal é o sítio de ligação dos inibidores geldanamicina (GA) e radicicol (RDC). Já o domínio C-terminal é o sítio de ligação do inibidor novobiocina (MARCU et al., 2000; YUN et al., 2004) e do agente antineoplásico cisplatina (ITOH et al., 1999; SOTI et al., 2002). Allan e colaboradores (2006) sugerem que os antibióticos do tipo cumarina, como a novobiocina, induzem a monomerização da Hsp90.

As Hsp90 citoplasmáticas são auxiliadas por várias co-chaperonas, como, por exemplo, a HOP (*Hsp70-Hsp90 Organizing Protein*), a Aha1 e a p23

(ver item 1.5), entre outras. Uma das mais bem conhecidas, a HOP atua como um mediador entre as Hsp90 e as Hsp70, intermediando a apresentação às Hsp90 de proteínas clientes primeiramente reconhecidos pelas Hsp70 (PRODROMOU et al., 1999; WEGELE et al., 2004).

A HOP é uma proteína que possui um domínio TPR, caracterizado pelo motivo hélice-volta-hélice, que reconhece um segmento MEEVD da região C-terminal das Hsp90, e outro domínio TPR que reconhece o mesmo motivo na porção C-terminal das Hsp70 citoplasmáticas (SCHEUFLER et al., 2000; WEGELE et al., 2004; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006; PEARL; PRODROMOU, 2006).

A proteína Aha1 (*Activator of Hsp90 ATPase 1*), que possui massa molecular de aproximadamente 38 kDa, se liga ao domínio intermediário da Hsp90. Essa co-chaperona atua como ativador da atividade ATPase das Hsp90, sofrendo competição por parte de outras co-chaperonas, como, por exemplo, a p23 (HARST et al., 2005; PANARETOU et al., 2002; MEYER et al., 2004; LOTZ et al., 2003). Por meio da via de ubiquitinação, a proteína conhecida como CHIP também interage com as Hsp90, encaminhando proteínas ligadas ao complexo Hsp90 para a degradação (JIANG et al., 2001; PEARL; PRODROMOU, 2006).

1.4 CICLO FUNCIONAL DAS HSP90

O sistema mínimo necessário, em eucariotos, para o funcionamento do ciclo funcional das Hsp90 conta com a participação de cinco proteínas: Hsp90, Hsp70, Hsp40, HOP e p23 (YOUNG et al., 2001; WEGELE et al., 2004), embora haja no ciclo auxílio de mais de 10 diferentes co-chaperonas (BUCHNER, 1999; WEGELE et al., 2004; SERAPHIM et al., no prelo).

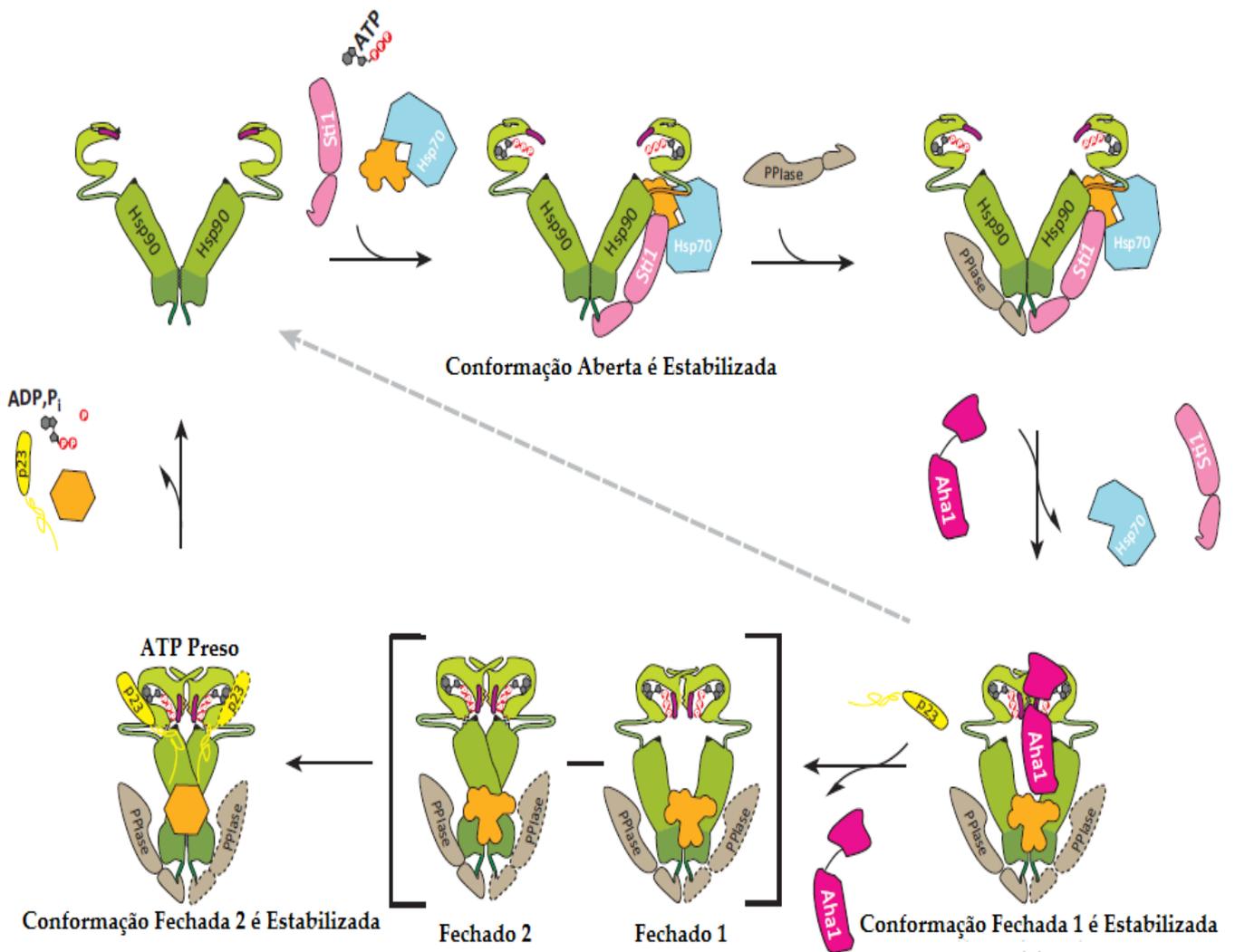
O ciclo funcional da família Hsp90 pode ser dividido em duas vias: a via das Hsp70 e a das Hsp90, ambas interligadas pela HOP. A priori, com a ligação de um substrato à Hsp70, via Hsp40, há a formação de um primeiro heterocomplexo (WEGELE et al., 2004). Esse heterocomplexo, substrato-Hsp70-Hsp40, interage com a HOP, que o conecta a Hsp90, permitindo a

transferência do substrato para a Hsp90. A dissociação da Hsp90 da Hsp70, Hsp40 e HOP ocorre com a ligação de ATP. A Hsp90 pode hidrolisar o ATP, estimulado pela Aha1, ocasionando mudanças conformacionais que levam a liberação do substrato (WANDINGER et al., 2008). Deste modo a Hsp90 fica disponível para um novo ciclo funcional (YOUNG et al., 2001; WEGELE et al., 2004; WANDINGER et al., 2008). Alternativamente, a p23 interage com o domínio N-terminal dimerizado da Hsp90, inibindo o ciclo funcional, o que pode estimular a liberação da proteína cliente da Hsp90 ou o seu encaminhamento para vias degradativas (YOUNG; HARTL, 2000; WANDINGER et al., 2008).

O ciclo funcional pode ser modificado pela presença dos inibidores da Hsp90, GA e RDC, que podem levar a proteína cliente para a degradação proteica, atuando no início do ciclo, (SCHNEIDER et al., 1996; WHITESELL et al., 1994; HÖHFELD et al., 2001; MALONEY; WORKMAN, 2002).

A Figura 5 mostra a proteína-cliente, ligada à Hsp70, sendo transferida para a Hsp90 via Sti1 (ou Hop). Nessa fase do ciclo, a Hsp90 se encontra na conformação aberta e a Sti1 se liga simultaneamente à Hsp90 e à Hsp70. Essas ligações geram uma assimetria nesse complexo, Hsp90-Sti1-Hsp70-proteína-cliente, sendo esse estabilizado por uma co-chaperona denominada PPIase (peptidyl-prolyl isomerase). A dimerização do domínio N-terminal só é possível com a saída das proteínas Sti1 e Hsp70 e com a ligação do ATP. A co-chaperona Aha1 acelera a formação do estado conformacional fechado 1 e aumenta a taxa de hidrólise da Hsp90. Finalmente, a ligação da co-chaperona molecular p23 promove a retirada da Aha1, prendendo o ATP no domínio N-terminal da Hsp90 e levando a Hsp90 para o estágio conformacional fechado 2 (mais compacto que o estado conformacional fechado 1). A p23 inibe a hidrólise do ATP da Hsp90, dando mais tempo para essa atuar na proteína-cliente. Após a hidrólise do ATP, a proteína-cliente é liberada, juntamente com a p23 e a PPIase, e a Hsp90 volta para sua conformação aberta, sem o ATP no domínio N-terminal (YOUNG et al., 2001; ROHL et al., 2013).

Figura 5 - Ciclo Funcional das Hsp90.



O substrato, ou proteína-cliente, é transferido da Hsp70 para a Hsp90, processo este auxiliado pela co-chaperona Sti1/HOP. A Hsp90 liga-se ao substrato na presença de ATP, sendo, posteriormente, a ligação do ATP um dos responsáveis por induzir a dimerização do domínio N-terminal. A ligação da co-chaperona p23 ocorre num estágio tardio do ciclo funcional e possui, primordialmente, a função de inibir a hidrólise do ATP da Hsp90, dando maior tempo para essa proteína atuar na proteína-cliente. Por fim, com a hidrólise do ATP, o substrato é liberado e a Hsp90 reinicia novamente seu ciclo funcional. (Adaptado de ROHL, et al., 2013).

1.5 A CO-CHAPERONA MOLECULAR P23

A p23 é uma co-chaperona das Hsp90 que participa da estabilização do estado dimerizado do domínio N-terminal ligado ao ATP (PEARL; PRODROMOU, 2006). A p23 é uma pequena proteína de caráter ácido, com tamanho aproximado entre 18-25 kDa e domínio N-terminal enovelado em folha

β -pregueada (WEAVER et al., 2000). Essa proteína, conservada durante a evolução, pode ser encontrada de leveduras até humanos, com possíveis ortólogos em vegetais (GARCIA-RANEA et al., 2002). Apesar da baixa identidade na sequência de aminoácidos, as p23 apresentam grande conservação em aminoácidos envolvidos na interação com as Hsp90 (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006).

A interação entre a Hsp90 e a p23 ocorre num estado tardio do ciclo, sendo que essa interação é dependente de ATP (CHUA et al., 2010). A p23 se liga à Hsp90 e inibe a hidrólise do ATP, possibilitando um maior tempo para que a Hsp90 interaja com outros substratos (FORAFONOV et al., 2008). Há, contudo, estudos que sugerem que a própria p23 tenha atividade chaperona por interagir com proteínas desnaturadas e parcialmente desnaturadas, prevenindo a agregação e mantendo-as em seu estado competente para o reenovelamento (WEIKL et al., 1999; WEAVER et al., 2000).

Em um estudo, conduzido por McLaughlin e colaboradores (2006), foi demonstrado que a p23 se liga à Hsp90 tanto na presença quanto na ausência de ATP, porém a afinidade da ligação é maior na presença do ATP. Segundo esses autores, a interação entre a Hsp90 e a p23 ocorre através do domínio N-terminal, com uma razão de duas moléculas de p23 por dímero de Hsp90. Outra função deste mesmo domínio é ligar-se com proteínas parcialmente enoveladas (WEIKL et al., 1999). Já a região C-terminal da p23 é uma região ácida desprovida de estrutura organizada (WEIKL et al., 1999; WEAVER et al., 2000). Esta região atua com um “flutuador”, mantendo o substrato acoplado à p23 em solução, ou para interagir com outras proteínas (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006). Um fato importante, no estudo funcional do ciclo dessa proteína, foi que alguns estudos mostraram que a deleção da região C-terminal não inibe a associação da p23 com a Hsp90, sugerindo que esta região não é vital para a interação dessas duas proteínas (WEIKL et al., 1999; MCLAUGHLIN et al., 2006).

Para a perfeita formação do complexo Hsp90-p23 há a necessidade do ATP, sendo que após a ligação da p23 com a Hsp90, há a inibição da atividade de quebra do ATP, contudo o entendimento dessa etapa do ciclo continua

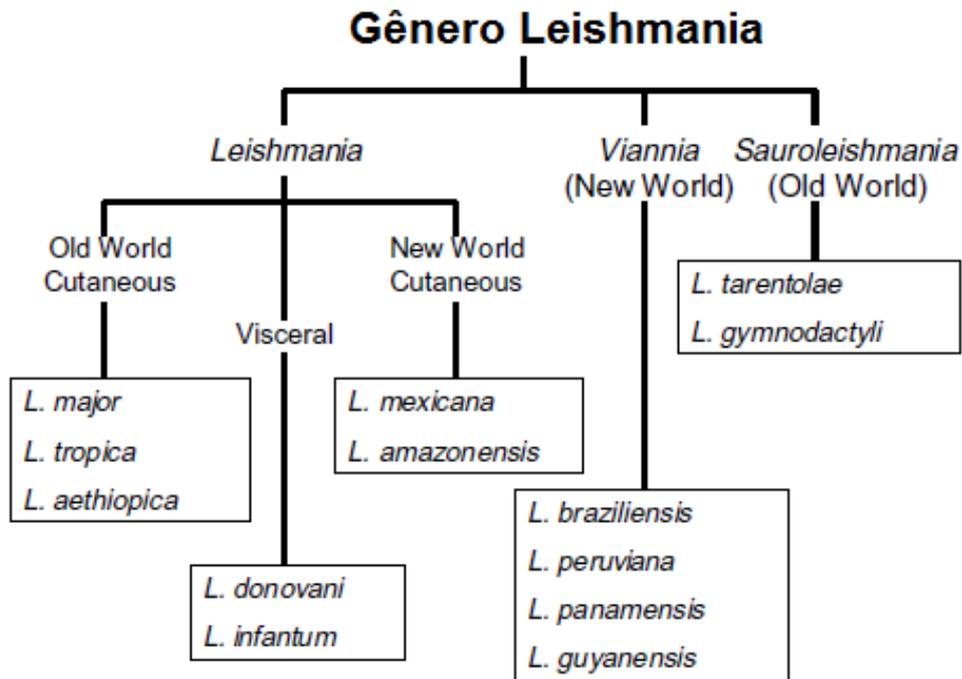
sendo um mistério (FORAFONOV et al., 2008; CHUA et al., 2010; KARAGÖZ et al., 2011). Dados recentes mostram que a ligação da p23 com a Hsp90 induzem mudanças conformacionais no sítio de ligação de nucleotídeos. Isso permitiria a p23 reduzir a atividade de hidrólise do ATP das Hsp90, regulando o ciclo funcional desta chaperona por mudanças no ambiente dos nucleotídeos (KARAGÖZ et al., 2011). Mudanças conformacionais no domínio M das Hsp90 também são relatadas após a ligação das p23 (KARAGÖZ et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Ali e colaboradores (2006), mostrou-se que as proteínas Hsp90 e p23 de levedura, respectivamente Hsp82 e Sba1, interagem pelo domínio N-terminal e que a participação da Sba1 no ciclo funcional das Hsp82 é de extrema importância. A interação entre essas duas proteínas ocorre na fase tardia do ciclo, sendo dependente de ATP (SULLIVAN et al., 1997; SULLIVAN et al., 2002). Em mais detalhes, a Sba1 “paralisa” a Hsp82 no estado ligado ao ATP e diminui a taxa de hidrólise dessa molécula, proporcionando maior tempo para a Hsp82 interagir com suas respectivas proteínas-clientes (MCLAUGHLIN et al., 2006).

1.6 O GÊNERO LEISHMANIA

O gênero *Leishmania* corresponde a protozoários parasitas, da família Trypanosomatidae, responsáveis pela leishmaniose. Essa doença representa um sério problema de saúde pública, sendo endêmica em aproximadamente 100 países de cinco continentes. Com 12 milhões de pessoas infectadas, sendo que há registros de até 2 milhões de novos casos todos os anos, e mais de 350 milhões em áreas de risco, essa doença é motivo de diversos estudos (DESJEUX, 1996). Mais de 30 espécies de *Leishmania* já foram identificadas, sendo que várias delas são de grande importância médica e veterinária (BATES; ASHFORD, 2006; LAINSON; SHAW, 2006). As principais síndromes encontradas em humanos são de três tipos – cutânea, mucocutânea e visceral – dependendo do contágio com as diferentes espécies de *Leishmania* (BATES; ROGERS, 2004; WHO, 2010). Os sintomas vão desde leves lesões cutâneas até graves lesões fatais nas vísceras (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Figura 6 - Gêneros e espécies de Leishmania.



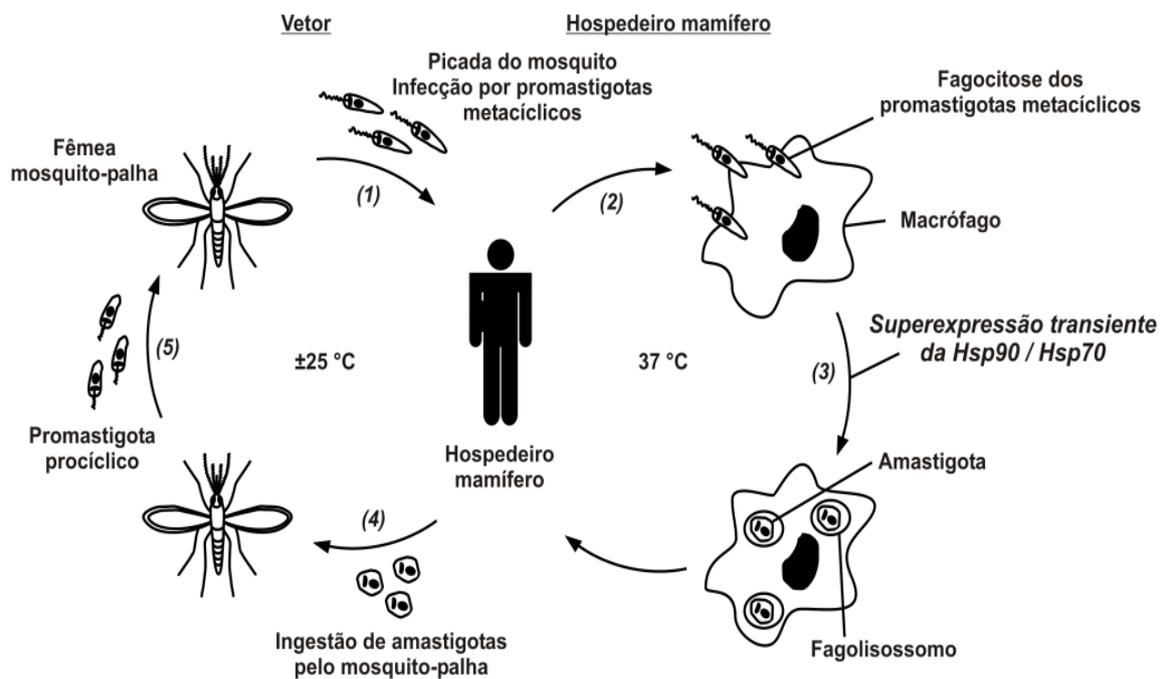
(Adaptado de ASSCHE et. al., 2011).

A infecção se dá pela picada da fêmea do flebotomíneo, um díptero pertencente à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, com mais de 700 espécies descritas, sendo que, aproximadamente, 30 dessas espécies são capazes de servir como vetor para a leishmaniose (LANE, 1993). Esses insetos são pequenos, medem entre 1,5 - 2,0 mm, e são típicos das regiões tropicais e subtropicais (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012). *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são, até o momento, os dois únicos gêneros de inseto capazes de servir como vetores da *Leishmania*, sendo assim de grande importância e interesse médico (KILLICK-KENDRICK, 1999; DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

A *Leishmania* possui dois ciclos de vida distintos – a fase extracelular flagelada ou promastigota, no inseto flebotomídeo, e a fase intracelular ou mastigota, nos macrófagos de mamíferos. O ciclo de vida desse parasita inicia-se quando a fêmea do inseto flebotomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro mamífero (homem, cães e roedores); nesse momento ocorre a transmissão dos promastigotas flagelados do inseto para os mamíferos. Dentro do hospedeiro, os promastigotas são fagocitados pelas células do sistema imune, e essa mudança de ambiente gera uma série de transformações no

parasita. Dentro dos macrófagos, onde temos uma diminuição do pH e um aumento na temperatura, o parasita se diferencia em amastigotas, caracterizados, entre outras coisas, pela perda do flagelo e por mudanças na superfície celular. Por fim, quando a fêmea se alimenta dos macrófagos contaminados com os amastigotas, esses sofrem uma nova série de modificações, no intestino, até se desenvolverem em promastigotas, encerrando, assim, o ciclo de vida desse parasita. O ciclo no inseto é relativamente curto, podendo ser completado dentro de uma semana (PIMENTA et al., 1992; BATES; ROGERS, 2004; BEATTIE; KAYE, 2011; LEIFSO et al., 2007).

Figura 7 - Ciclo de Vida do Parasita Leishmania.



(1) a infecção do hospedeiro mamífero ocorre com a transferência da forma promastigota do parasita através da picada do mosquito (2) após a infecção, os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos (3) dentro dos fagolisossomos ocorre a diferenciação dos promastigotas em amastigotas dentro dos fagolisossomos (4) ao se alimentar do sangue do hospedeiro, o mosquito se contamina com a forma amastigota do parasita (5) após uma nova série de diferenciações, a forma amastigota se diferencia em promastigotas, a qual pode, novamente, infectar um novo hospedeiro. (Adaptado de SERAPHIM et al., no prelo).

Vale destacar que esse gênero conseguiu evoluir e, assim, se desenvolver em dois ambientes distintos, sendo locais onde normalmente se digerem, degradam ou destroem patógenos estranhos, além das diferentes e contrastantes condições de pH e temperatura. Deste modo, eles conseguem sobreviver dentro do trato digestivo do inseto, junto com todas as suas enzimas digestivas e escapar dos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro e dos mecanismos de defesa dentro dos macrófagos, como o óxido nítrico e espécies reativas do oxigênio (PETERS; SACKS, 2006; COHEN-FREUE, 2007; LEIFSO et al., 2007).

A partir dos anos de 1920, o antimônio (Sb) vem sendo utilizado como primeira medida de tratamento da leishmaniose em diversos países (WHO, 2010; ASSCHE et al., 2011). O tratamento com injeção de antimonial pentavalente (pró-droga), além de ser caro para a maioria dos países afetados, é longo, tóxico e doloroso. Apesar do mecanismo de ação não ser totalmente compreendido, a atividade do antimônio se deve pela interação com o sistema antioxidante do parasita (ASSCHE et al., 2011). Somado a isso, em grande parte dos casos, devido ao aumento da resistência, torna-se necessária a administração de uma segunda linha de medicamentos, como, por exemplo, a pentamidina, tornando assim o tratamento ainda mais custoso (WHO, 2010).

Como já mencionado, o sucesso do ciclo de vida do protozoário *Leishmania* envolve dois hospedeiros distintos: um invertebrado e um mamífero. Além do ambiente celular, a diferença na temperatura corporal - inseto (25°C) e mamífero (37°C) - entre os hospedeiros possui um papel importante em uma série de alterações morfológicas e metabólicas que ocorrem nesse protozoário (SERAPHIM et al., no prelo).

As chaperonas desempenham papel vital no desenvolvimento desses protozoários, uma vez que condições estressantes desencadeiam uma superexpressão dessa classe de proteínas, a fim de facilitar a adaptação do organismo no ambiente (SHAPIRA et al., 1988; VAN DER PLOEG et al., 1985). O efeito da temperatura foi verificado por Shapira e colaboradores (1988), onde promastigotas foram submetidos a variações térmicas, a fim de simular a transferência do parasita entre o inseto e o mamífero, o que culminou em

diferenciações morfológicas durante a transformação de promastigota em amastigota (BANUMATHY et al., 2003; GRAEFE et al., 2002, MORALES et al., 2010).

Por participarem de diversas vias de regulação celular, as chaperonas emergem como um alvo terapêutico interessante contra diversas doenças. Inibidores da Hsp90 tem sido associados como uma promissora forma ao combate de diversas formas de cânceres (SÕTI et al., 2005; BANERJI et al., 2003).

Diversos trabalhos citam o potencial uso de vacinas no desenvolvimento de fármacos contra diversas doenças negligenciadas, sendo as chaperonas moleculares um potencial alvo em alguns desses estudos (WAN et al., 2013; OMMEN et al., 2010; VAUGHAN et al., 2010; VANBUSKIRK et al., 2009; MUELLER et al., 2005).

A co-chaperona p23 tem papel importante no ciclo funcional da família Hsp90 (PEARL; PRODROMOU, 2006). No genoma de humano e levedura é identificado apenas um gene correspondente à proteína p23, fato esse que não ocorre com o protozoário *L. braziliensis*. Buscas no genoma deste protozoário levou a identificação de duas sequências genômicas putativas ortólogas para a p23 (SILVA, 2012). Desta forma, o estudo estrutural e funcional dessas proteínas pode fornecer valiosas informações no combate a essa doença.

2.0 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho de dissertação de mestrado visou à caracterização comparativa das co-chaperonas p23 encontradas no genoma de *L. braziliensis* (Lbp23A e Lbp23B) quanto aos seus parâmetros estruturais, de estabilidade e funcionais, incluindo a sua identificação *in vivo*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver estudos biofísicos comparando as duas proteínas - Lbp23A e Lbp23B - tanto estruturalmente quanto aos seus níveis de estabilidade.
 - ✓ avaliar a estrutura secundária das macromoléculas;
 - ✓ avaliar a estrutura terciária local;
 - ✓ avaliar o estado oligomérico das proteínas; e
 - ✓ avaliar a estabilidade química e térmica das Lbp23.
- Desenvolver estudos da funcionalidade com as proteínas Lbp23A e Lbp23B, tais como:
 - ✓ avaliar a atividade chaperona das duas Lbp23; e
 - ✓ avaliar o efeito inibitório das Lbp23 na atividade de hidrólise do ATP da LbHsp90.
- Identificar as duas Lbp23 em cepas de *L. braziliensis*.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o processo de clonagem, expressão e purificação das proteínas-alvo, desta dissertação, foram realizados conforme descrito em 2012 na tese de Silva.

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LBP23A E DA LBP23B

3.1.1 LINHAGENS BACTERIANAS DE EXPRESSÃO PROTEICA

Nesse mestrado foram utilizadas duas linhagens de bactérias *Escherichia coli* para a expressão das proteínas de interesse: BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS. A linhagem BL21(DE3) apresenta níveis de expressão reduzidas de proteases, favorecendo, assim, a não agregação proteica. Essa cepa possui o gene DE3 responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase controlado pelo promotor lacUV5 que, por sua vez, responde ao IPTG. A linhagem BL21(DE3)pLysS, além de possuir as características apresentadas acima, possui níveis mais altos de expressão da lisozima. A lisozima inibe a T7 RNA polimerase, o que anula os níveis basais de expressão dos genes controlados pelo promotor T7. Essa cepa é interessante, pois pode ser utilizada quando a própria proteína-alvo é tóxica para a célula. Como última informação, essa linhagem é resistente ao antibiótico cloranfenicol, podendo auxiliar no passo de seleção de bactérias.

3.1.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A técnica de transformação bacteriana foi utilizada para inserir dentro das cepas competentes de *E. coli* o plasmídeo de interesse – pET28a::Lbp23A, pET28a::Lbp23B e pET28a::LbHsp90. A transformação ocorreu por choque térmico. Inicialmente, incubou-se o vetor plasmidial com as bactérias competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, essa suspensão foi submetida à temperatura de 42°C por 90 segundos e, posteriormente, submetida ao gelo por 3 minutos. Aproximadamente, 800 µL de meio de cultura Luria-Bertani (meio LB) foram adicionados a essa suspensão, e incubados por 45 minutos sob agitação e temperatura controlada (200 ciclos/minuto, 37°C).

Por fim, espalhou-se toda suspensão bacteriana numa placa de meio sólido (meio de cultura LB + Ágar), que foram incubadas por 16 horas em estufa a 37°C.

3.1.3 EXPRESSÃO DA LBP23A, LBP23B E DA LBHSP90

Um clone crescido em meio sólido (meio LB/ágar + antibiótico) foi selecionado e inoculado em meio LB + antibiótico sob agitação e temperatura controlada (200 ciclos/minuto; 37°C) por 16 horas. Esse inóculo foi diluído 100 vezes em 500 mL de meio LB, com os respectivos antibióticos.

A proteína recombinante Lbp23A foi expressa em cepa de *E. coli* BL21(DE3) à 37°C, sendo a Lbp23B expressa em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS à 30°C. De maneira geral, ambas as células cresceram à 37°C até atingirem uma OD_{600 nm} 0,4-0,6, sendo induzidas com a adição de 0,4 mM de IPTG por 4 horas. Após esse tempo, as células foram centrifugadas (8.000 rpm por 15 minutos) e armazenadas a -20 °C.

A expressão da proteína recombinante LbHsp90 foi necessária para a realização de alguns testes desse projeto de mestrado. Essa proteína foi expressa em cepas de *E. coli* BL21(DE3) à 30°C por 4 horas, com adição de 0,4 mM de IPTG como indutor da síntese proteica. Após o período de indução, as células foram centrifugadas e armazenadas a -20 °C no freezer. Para maiores informações sobre a LbHsp90 ver trabalho de Silva e colaboradores (2013).

3.1.4 LISE BACTERIANA

Na etapa de lise celular, o pellet bacteriano foi ressuspenso com auxílio do tampão de lise - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM KCl - e incubado com 5 unidades (U) de DNase e 30 µg/mL de lisozima. Além da lise química, foi realizada a lise por sonicação no gelo. As células foram centrifugadas – 18.000 rpm por 30 minutos à 4°C – e o sobrenadante foi filtrado numa membrana com poro de 0,45 µm.

3.1.5 PURIFICAÇÃO DA LBP23A E DA LBP23B

A purificação das proteínas-alvo foi realizada, inicialmente, pela cromatografia de afinidade ao níquel e, posteriormente, pela cromatográfica de exclusão molecular.

O pET28a possibilita fusionar uma cauda de poli-histidina em uma (ou em ambas) as extremidades da proteína recombinante. A coluna utilizada nesse passo de purificação foi a Hitrap Chelating de 5 mL (GE Healthcare) acoplada ao equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). Essa coluna foi carregada com o metal níquel, sendo os anéis imidazólicos capazes de se ligarem com a cauda fusionada de histidina, permitindo assim sua purificação. A coluna foi equilibrada com tampão 20 mM fosfato de sódio (pH 7,4), 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, para, em seguida, a amostra (sobrenadante bacteriano filtrado) ser injetada na coluna. Após esse passo, a fração não ligante foi eluída com o mesmo tampão citado anteriormente. A proteína foi eluída da coluna com o tampão 20 mM fosfato de sódio (pH 7,4), 500 mM imidazol, 500 mM NaCl. Parâmetros como absorvância, pressão e fluxo na coluna foram monitorados durante todo o processo de purificação. Após o primeiro passo cromatográfico, as proteínas foram incubadas por 16 horas com 1 U/mg de trombina, a fim de retirar a cauda de histidina.

Após a cromatografia de afinidade ao níquel e a clivagem da cauda de histidina pela trombina, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão molecular. A coluna utilizada foi a HiLoad Superdex 26/60 200 prep grade (GE Healthcare) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento ÄKTA Prime plus (GE Healthcare). A coluna foi lavada com água ultrapura e equilibrada com tampão adequado para esse procedimento de purificação. A amostra proteica foi injetada na coluna e seu perfil de purificação foi monitorado pela absorvância em 280 nm. O tampão utilizado foi o Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e EDTA 2 mM.

3.1.6 SDS-PAGE

Um método utilizado para a separação e caracterização de proteínas é a eletroforese. A eletroforese consiste na migração de proteínas carregadas

frente a um campo elétrico. Esse método não é utilizado para purificar proteínas, contudo é uma poderosa ferramenta analítica (NELSON; COX, 2008).

A eletroforese de proteínas é geralmente realizada em gel de poliacrilamida na presença de um detergente carregado negativamente, o dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS se liga as proteínas fortemente nas regiões hidrofóbicas do polipeptídeo, e confere uma razão carga/massa próxima para todas as proteínas. O gel de poliacrilamida funciona como uma malha, o que facilita a separação da proteína pela massa molecular. O tamanho do poro do gel pode ser ajustado para que a proteína de interesse tenha sua migração na malha retardada (BERG et al., 2002; NELSON; COX, 2008). Um agente redutor pode ser adicionado ao gel para romper possíveis ligações S-S nas proteínas, permitindo que todos os componentes sejam analisados separadamente.

Após as etapas de purificação, as proteínas de interesse foram submetidas ao SDS-PAGE, a fim de verificar a eficiência da cromatografia. Após o término da eletroforese os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue e descorados em ácido acético:etanol:água 3:2:35 (v:v:v).

3.1.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a medida de concentração das proteínas produzidas foi utilizado o método de Edelchoch (1967), que é baseado na estimativa do coeficiente de extinção molar, levando em consideração a proteína desovelada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5) e cloridrato de guanidina 6 M.

A determinação da concentração proteica foi realizada por espectroscopia, onde se mediu a absorvância em 280 nm. O espectro de absorvância foi coletado entre os comprimentos de onda de 250 e 320 nm e, para o cálculo da concentração, foi utilizada a Lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

onde **A** é a leitura de absorvância a 280 nm, **l** é o comprimento do caminho óptico em cm e **C** é a concentração de proteínas em mol/L. As amostras

concentradas foram diluídas, a fim de se respeitar os limites de absorvância (0,2 – 0,8), contudo, quando necessário diluir a amostra, esse fator de diluição foi acrescentando na fórmula acima. A leitura do branco foi descontada do cálculo.

3.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS DE ESTUDO

Algumas propriedades físico-químicas das proteínas de estudo foram obtidas utilizando ferramentas de bioinformática. Por meio do ProtParam (disponível em: <http://web.expasy.org/protparam/>) foi possível obter informações, a partir da sequência de aminoácidos de cada proteína de interesse, como o ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e coeficiente de extinção molar (ϵ).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das proteínas de estudo.

Proteína	GeneBank ID	Nº de AA	MM (Da)	pI	ϵ_{280nm} ($M^{-1}cm^{-1}$)
Lbp23A	gi 154345207	204	22090	4,29	31970
Pfp23B	gi 154336147	210	23045	4,41	25575
LbHsp90*	gi 154343720	1408	161324	5,08	114600

(Fonte: <http://web.expasy.org/protparam/>). *LbHsp90 dimérica.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS.

As sequências de aminoácidos das Lbp23 foram localizadas utilizando a sequência da hp23 (dBEST reference: 4704885) no programa BLASTp (Altschul et al. 1997) para encontrar possíveis p23 no genoma de *L. braziliensis*. As sequências da Lbp23A (GenPept ID: XP_001568545.1), Lbp23B (GenPept ID: XP_001564309.1) e hp23 foram alinhadas e analisadas pelo programa Emboss Needle (disponível em: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) (RICE et al., 2000).

3.4 SIMILARIDADES ENTRE DIFERENTES P23

A partir da estrutura primária das duas Lbp23 foi realizada uma busca de outras p23 em organismos diferentes. Por meio do Blast (disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (ALTSCHUL et al. 1997) foi possível localizar e selecionar diferentes p23, a fim de verificar a existência, ou não, dessa co-chaperona em diferentes parasitas. O software TreeView (Win32) foi utilizado na construção de uma “árvore de alinhamento” das p23, a partir da sequência de aminoácidos de p23 ortólogas de diferentes organismos.

3.5 ESPECTROPOLARIMETRIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

Com o auxílio de uma cubeta de 0,2 mm de caminho ótico e uma concentração de, aproximadamente, 600 µg/mL de proteína, num tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, os espectros de dicroísmo circular (CD) foram coletados num espectropolarímetro Jasco J-815, sendo a temperatura controlada por um sistema *peltier*.

Os valores obtidos com as curvas de CD foram convertidos para elipticidade molar residual média ($[\theta]$), pela equação seguinte:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MM}{c \times l \times n}$$

onde, $[\theta]$ é a elipticidade molar residual média (em graus.cm².dmol⁻¹), **MM** é a MM da proteína em kDa, **c** é a concentração de proteínas em mg/mL, **l** é o caminho ótico em cm e **n** é o número de resíduos da proteína.

3.6 DESENOVELAMENTO TÉRMICO MONITORADO POR CD

O experimento de desenovelamento térmico monitorado por CD verificou a estabilidade térmica da proteína por meio das mudanças na estrutura secundária. O desenovelamento térmico por CD foi monitorado em 231 nm e as amostras foram aquecidas de 20°C à 90°C (1°C/min), sendo os dados

coletados a cada 0,5 °C em uma cubeta de 1,0 mm. Os dados foram normalizados para elipticidade molar residual média. Os parâmetros utilizados para o desenovelamento térmico monitorado por CD foram os mesmos mencionados acima (item 3.5).

3.7 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO

A estrutura terciária local foi monitorada pela técnica de fluorescência intrínseca do triptofano. Os experimentos foram realizados no tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol no fluorímetro F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi), utilizando uma cubeta de passo ótico de 1,0 x 0,2 cm. As proteínas foram excitadas num comprimento de onda de 280 nm e a emissão de fluorescência foi analisada entre 300-420 nm.

O desenovelamento químico por ureia (agente caotrópico) acompanhado pela emissão de fluorescência do triptofano foi realizado nos mesmos parâmetros citados acima. Os espectros coletados foram tratados para centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$) e ajustados pela função de Boltzmann, a fim da obtenção do valor de C_m .

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

onde, $\langle \lambda \rangle$ é o centro de massa espectral, em nm; F_i é a intensidade de fluorescência medida e λ_i são os respectivos comprimentos de onda.

3.8 ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA

Os experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados numa ultracentrífuga Beckman Optima XL-A. Os testes de velocidade de sedimentação (Sedimentation velocity-SV) com a Lbp23A e a Lbp23B foram feitos em concentrações de 100 à 800 µg/mL em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, à 20° C, 40.000 rpm (AN-60Ti rotor), sendo os dados coletados em 280 nm.

O programa SedFit foi utilizado para calcular a distribuição dos coeficientes de sedimentação ($c(s)$). O coeficiente, ou razão, friccional (f/f_0) foi utilizado como parâmetro de regularização, e como forma de avaliar a assimetria das proteínas. O $s_{20,w}$ (coeficiente de sedimentação a 20°C em água) foi empregado como forma de normalização das condições padrões. Já o s^0_{20w} (coeficiente de sedimentação a 0 mg/mL), um parâmetro de normalização entre proteínas diferentes, foi calculado a partir do gráfico de $S_{20,w}$. O programa Sednterp forneceu informações como a viscosidade ($\eta = 0,010185$ poise) e densidade do tampão ($\rho = 1,00307$ g/mL), além do volume parcial de cada proteína estudada (V_{bar} : Lbp23A = 0,7199 cm³/g; Lbp23B = 0,7249 cm³/g), a partir da sequência de aminoácidos.

3.9 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

A calorimetria de varredura diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) é uma técnica de análise que observa como a capacidade térmica de um material varia com a temperatura. De maneira geral, a capacidade térmica (C_p) é uma grandeza relacionada ao material presente no corpo, sendo a relação entre a quantidade de calor fornecida a um corpo e a variação de temperatura observada nesse corpo, que aumenta com temperaturas mais altas. O DSC permite estudar transições conformacionais em macromoléculas biológicas.

Um parâmetro possível de estimar pelo DSC é a T_m de uma proteína, ou seja, a temperatura média na qual metade das moléculas da proteína está enovelada e metade desenovelada. Quanto maior a T_m de uma proteína, mais estável ela é termicamente, sendo assim, menos ela é suscetível a desenovelamentos.

A calorimetria de varredura diferencial foi feita no Nano DSC (TA Instruments), sendo que a concentração das duas Lbp23 estava em torno de 1,1 a 1,4 mg/mL, no tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,0), 100 mM NaCl. A temperatura durante o experimento foi elevada em 1°C/min entre 15° C-90° C. Os termogramas foram coletados no software DSC-Run (TA Instruments).

3.10 ATIVIDADE CHAPERONA

O papel de chaperona molecular das duas Lbp23 foi testado utilizando a malato desidrogenase (MDH), de coração de porco (Porcine heart_Sigma M2634), e a luciferase (*Photinus pyralis*_Sigma C3260) como proteínas-clientes; sendo assim, as duas co-chaperonas foram avaliadas quanto a sua capacidade de evitar a agregação proteica.

Nesse experimento, 1,0 μ M das proteínas-cliente foram submetidas a um estresse térmico (40° C) por um determinado tempo (3 horas), juntamente com as Lbp23, as quais foram utilizadas em concentrações crescentes de 1,0-10, 0 μ M. O procedimento experimental foi realizado numa placa de 96 poços e a agregação proteica foi avaliada por meio da medida do sinal de espalhamento de luz em 320 nm no equipamento Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis Microplate Spectrophotometer. Todos os experimentos foram realizados no tampão Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl e 1,0 μ M β -mercaptoetanol.

Como controle foram realizados experimentos contendo só as proteínas-modelo (MDH e luciferase), a fim de verificar a taxa de agregação dessas proteínas, e só as co-chaperonas Lbp23, a fim de observar o comportamento dessas proteínas sob essa condição de estresse.

3.11 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA

Foi verificado o papel inibitório da Lbp23A e da Lbp23B na atividade de hidrólise do ATP da LbHsp90. A quantidade de 1,0 μ M de LbHsp90 (dímero) foi incubada com 1,0 mM of ATP, 5,0 mM MgCl₂ em 37 °C por 3 horas, na ausência e na presença de quantidades crescentes de Lbp23 (0-30 μ M). Todas as amostras foram preparadas no tampão 40 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM de KCl em uma placa de 96 poços.

Após as três horas foi utilizado o kit EnzChek Phosphate Assay (Invitrogen) para mensuração da quantidade de fosfato hidrolisado (Pi ou fosfato inorgânico) na reação explicada acima. Na presença de Pi, o substrato

MESG (2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribosídeo) é convertido no produto ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina pela enzima PNP (purina nucleosídeo fosforilase). Sendo assim, utilizou-se esse protocolo de acordo com as informações do produtor. A quantidade de fosfato inorgânico é proporcional à taxa de hidrólise. Após incubação por 30 minutos com os reagentes desse kit, a reação foi mensurada pela medição da absorção em 360 nm. O experimento foi lido num espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis Microplate Spectrophotometer. A absorbância do controle (sem a LbHsp90) foi monitorada e descontada da absorbância obtida das amostras.

3.12 ESTUDOS *IN VIVO*

3.12.1 CRESCIMENTO DO PROTOZOÁRIO

Nesse trabalho foi utilizado a forma promastigota da espécie *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Os protozoários cresceram em meio M199, suplementados com 10% de soro fetal bovino (inativado pelo calor), 50 µg/mL de gentamicina, 40 mM de HEPES (pH 7,4), 1,0 µg/mL de biotina, 14 µg/mL de hipoxantina, 0,36 mg/mL de bicarbonato de sódio, 0,1 mM de adenina, 6,0 mM de biopterina e 250 µg/mL de hemina, a 26°C.

Após chegarem numa fase de crescimento logarítmica (aproximadamente 10^7), os parasitas foram divididos em dois tubos contendo 30 mL de cultura e foram incubados à 26° C e 37° C. Após três tempos de incubação (2 horas, 4 horas e 6 horas), as alíquotas dos parasitas (10 mL) foram centrifugadas a 800xg, 4° C por 10 minutos e lavadas três vezes com meio RPMI (Sigma).

O pellet foi ressuscitado com 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) contendo 5,0 mM de NaCl, 1% de Nonidet-P e um coquetel inibidor de protease (Roche), seguido de uma incubação por 10 minutos. Três ciclos de congelamento e descongelamento (nitrogênio líquido e banho de 37° C) foram realizados para romper a parede do parasita. As amostras foram centrifugadas 350xg, 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado em – 80 °C.

3.12.2 WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western Blotting* se baseia na construção do complexo anticorpo-proteína. A ligação do anticorpo é específica e ela ocorre numa proteína imobilizada numa membrana. Por fim, esse complexo é identificado por algum método de revelação.

Os experimentos de western blotting foram feitos em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm, utilizando anticorpos policlonais, produzidos em coelhos, contra as proteínas recombinantes Lbp23A e Lbp23B (Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos). A revelação com o anticorpo secundário foi realizada com o *anti-rabbit* IgG conjugado com a fosfatase alcalina.

Após correr um gel SDS-PAGE com as amostras de *L. braziliensis* foi feita a transferência do conteúdo do gel para a membrana de nitrocelulose. O tampão utilizado para a transferência foi 48 mM de Tris, 39 mM de Glicina e 200 mL de metanol para 1,0 L de tampão. Os parâmetros da fonte para a transferência foram de 100 V (constante) e 350 mA por 80 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada, por 16 horas, com o tampão de bloqueio: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,2% Tween 20, 5% de leite em pó.

Em seguida, ocorreu a incubação, por duas horas, com o anticorpo primário, no mesmo tampão da solução de bloqueio, diferindo apenas pela diminuição na quantidade de leite em pó - 3% - e pela presença do anticorpo anti-Lbp23 (1:25.000). Após esse tempo, foram realizadas 3 lavagens, a fim de retirar quaisquer resquícios de anticorpo primário (tampão de lavagem - Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,2% Tween 20).

A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 1 hora com o tampão foi o Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,2% Tween 20, 3% de leite em pó, juntamente com o anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina (1:30.000). Após essa última incubação foi feita, novamente, três lavagens com o tampão de lavagem. Por fim, foi realizada a etapa de revelação do western blotting; sendo esse passo feito com o kit da Bio-rad AP Conjugate substrate, conforme especificações do fabricante.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS LBP23.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das Lbp23A, Lbp23B e hp23 foi realizado com o programa Emboss Needle (disponível em: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) (RICE et al. 2000). Em amarelo estão destacados os resíduos de triptofano que se mostram conservados nas três proteínas; apenas o último triptofano na hp23 não é conservado entre os três organismos. Entre as p23 de *L. braziliensis* a identidade entre a sequência de aminoácidos foi de 22%. A hp23 apresentou 31% de identidade com a Lbp23A e 25% de identidade com a Lbp23B.

Figura 8 - Alinhamento da Sequência de Aminoácidos das Lbp23 com a hp23.

```

Lbp23A_gi | 154345206      ----MSHLPIKWAERKDRVFITVEAMTASDVHVTFOEKTVSISGYVGTAKGSEPHTLKG 55
Lbp23B_gi | 154336146      MSASGSLVPPISWAQRPEYVLVTIPLQDTTGVTVEIKDEGRELL---FACCAPEGKQYAC 57
hp23_gi | 23308579         ----MQPASAKWYDRRDYVFI EFCVEDSKDVNVNFEKSKLTFS----CLGGSDNFKHLN 51
      . . * : * : * : : . . . * * : : . . :

Lbp23A_gi | 154345206      ELHLLKEIVPEDSTFKVLGVS IQICAMK-----KDQG-YWNRLVEEPTKLTKSWSLSA 106
Lbp23B_gi | 154336146      TIHFYGAISSEESQHVVRPRQIELKLRKKLTRSLEDADDEVEWPRLTKKVKYPN--ITI 115
hp23_gi | 23308579         EIDLFHCIDPND SKHKRTDRSILCCLRK-----GESGQSWPRLTKERAKLN--WLSV 101
      : : * : : * . . * * : : * * : : * * : : * * : :

Lbp23A_gi | 154345206      DWNLWKDEDE-AEEDAAASNF GGYGDMGMDMGSMGGMGGMGMDMESMMASMGKAG 165
Lbp23B_gi | 154336146      DWSKWKDEDEGATDDLGD FGLGGDAMDG-QYSEMLSQMLQ TQGGKDAEELAGLPPGTI 174
hp23_gi | 23308579         DFNNWKDWEDD-SDEMSNFDR-----FSEMNMNMGDEDEDV DLPEDVG--ADDD 148
      * : . * * * : * : : * . . . . . . . . . . . . . . . .

Lbp23A_gi | 154345206      GDSDEEMADSEGE EQADDECEKSEEPADISDLNA 201
Lbp23B_gi | 154336146      PEFGSAQRQEATHGASAAAAGDDSEMPPLEDDM--- 207
hp23_gi | 23308579         QDSDEKMPDLE----- 160
      : . . : :
    
```

Em amarelo estão destacados os resíduos de triptofano e na caixa está destacada a sequência característica de p23.

Tabela 3 - Valores de similaridade e identidade entre as Lbp23 e a hp23.

Proteínas	Similaridade (%)	Identidade (%)
Lbp23A-Lbp23B	33	22
Lbp23A-hp23	43	31
Lbp23B-hp23	43	25

Tanto a identidade quanto a similaridade entre as Lbp23 são baixas, sendo de 22% e 33% respectivamente. Contudo, quando alinhadas com a p23 de humanos (hp23), apresentaram valores de similaridade e identidade maiores (ver Tabela 3). O alinhamento mostra também que os resíduos de triptofanos são conservados entre as três p23.

Weaver e colaboradores (2000) citam a sequência WPRLTKE (Figura 8, caixa) como uma sequência característica entre as p23, sendo uma região de possível interação com outras proteínas. Já Zhao e colaboradores (2006) demonstram a presença de um domínio conservado entre p23, localizado entre os resíduos 8 e 114, onde apresentam os aminoácidos W, K, W, L e W nas posições 8, 79, 86, 89 e 106, respectivamente.

Com as sequências de aminoácidos das Lbp23 foi possível buscar outras p23 em outros protozoários. O intuito não foi verificar relações filogenéticas, mas sim verificar se, além de apresentarem p23, esses organismos possuíam duas p23, assim como o protozoário *Leishmania braziliensis*.

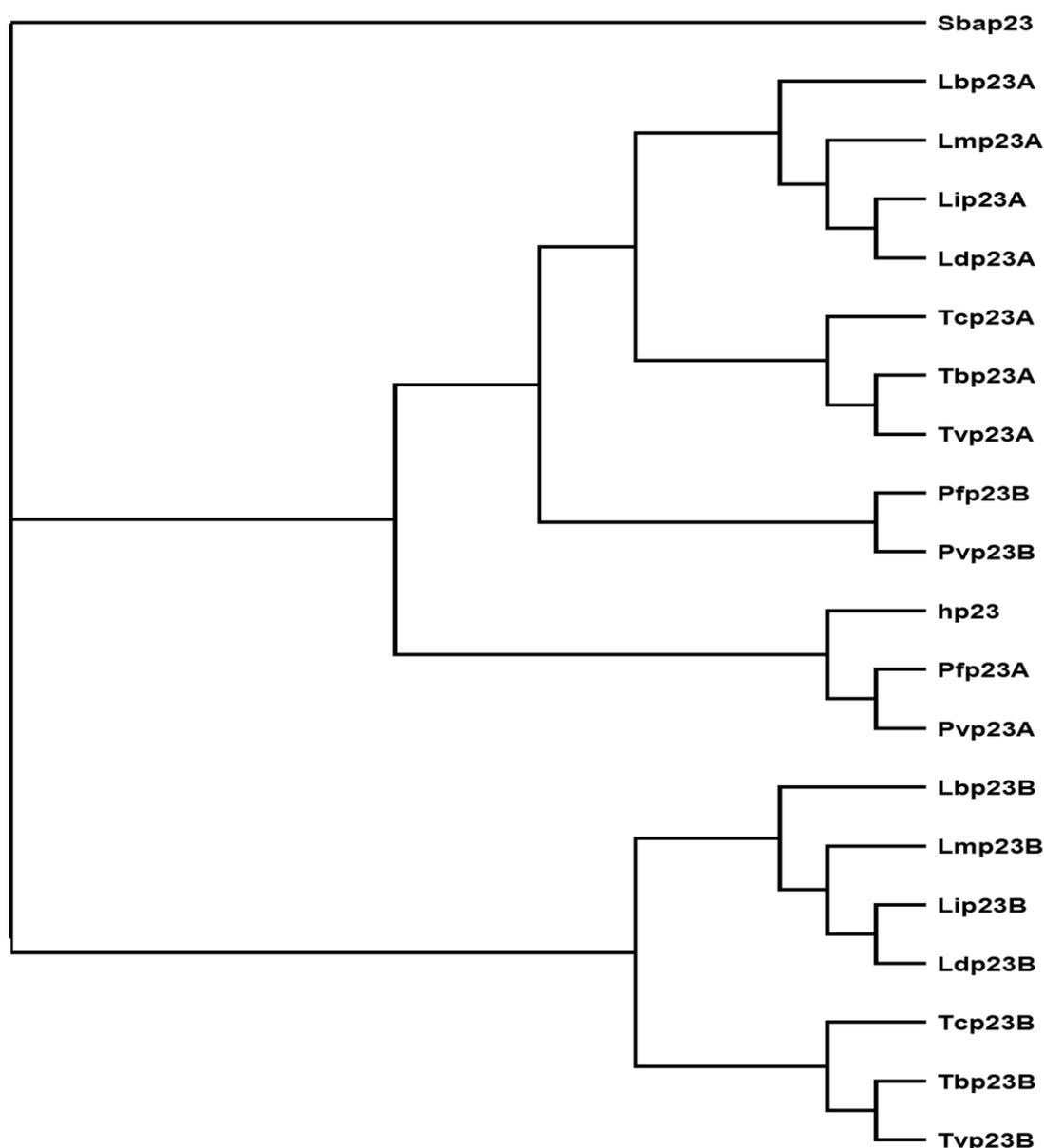
A busca por essas sequências foi realizada pelo Blast (disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (ALTSCHUL et al. 1997). A partir da posse dessas sequências, foi realizado um alinhamento global entre as p23 de diferentes espécies de protozoários. A construção de uma árvore de alinhamento foi realizada com o software *TreeView (Win32)*.

Tabela 4 - Organismos selecionados para construção da árvore de alinhamento.

Proteína	Organismos	Código de Acesso	Nº de aminoácidos
Lbp23A	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	gi 154345207	201
Lbp23B	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	gi 154336147	207
hp23	<i>Homo sapiens</i>	gi 23308579	160
Pfp23A	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	gi 124507087	156
Pfp23B	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	gi 124809800	276
Lip23A	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	gi 146102004	199
Lip23B	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	gi 146098542	209
Tbp23A	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> strain 927/4 GUTat10.1	gi 71745370	168
Tbp23B	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> strain 927/4 GUTat10.1	gi 71746920	192
Lmp23A	<i>Leishmania major</i> strain Friedlin	gi 389595243	199
Lmp23B	<i>Leishmania major</i> strain Friedlin	gi 157875439	209
Ldp23A	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1	gi 398023739	199
Ldp23B	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1	gi 398022052	209
Sbap23	<i>Sba1p Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	gi 6322732	216
Tvp23A	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	gi 340056302	163
Tvp23B	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	gi 340056871	192
Pvp23A	<i>Plasmodium vivax</i> Sal-1	gi 156097546	156
Pvp23B	<i>Plasmodium vivax</i> Sal-1	gi 156100251	266
Tcp23A	<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener	gi 71651746	181
Tcp23B	<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener	gi 71664255	196

Informações como cepa do organismo, código de acesso ao GeneBank e número de aminoácidos podem ser encontradas acima.

Figura 9 - Alinhamento global da p23 de protozoários identificadas na Tabela 4.



Na árvore de alinhamento entre sequências de aminoácidos (Figura 9) é possível observar a formação de dois grandes grupos de p23, ou seja, o agrupamento entre as p23A e as p23B de protozoários. Essa busca mostrou que vários protozoários possuem duas p23, sendo uma característica interessante, uma vez que o genoma de outros organismos, como, por exemplo, humanos e leveduras, possuem apenas uma p23.

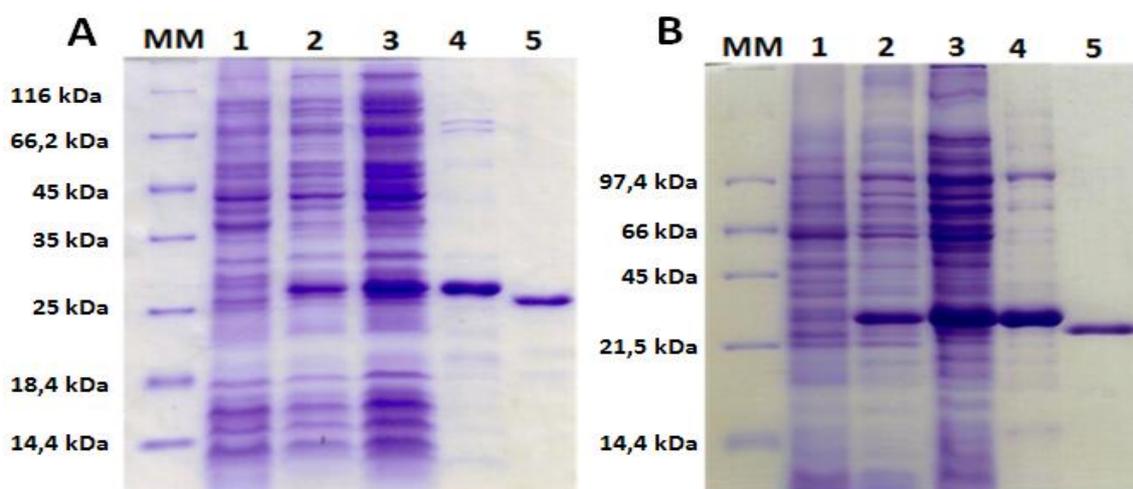
Um trabalho com p23 de anfioxo (*Branchiostoma belcheri*) demonstrou, por meio de uma análise filogenética, que esta proteína estava na base do

clado de vertebrados e invertebrados, sugerindo que a divergência do gene p23 entre eles ocorreu antes da separação invertebrado/vertebrado de seu ancestral comum, por volta de 550 milhões de anos atrás (ZHAO et al., 2006).

4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS LBP23

Tanto a expressão em cepas de *E. coli* quanto a purificação por técnicas cromatográficas das proteínas Lbp23A e Lbp23B foram etapas desenvolvidas com sucesso. A amostra eluída da cromatografia de afinidade ao níquel foi incubada com trombina, a fim de retirar a cauda de histidina. Por fim, a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, onde espécies maiores, como agregados proteicos, foram separadas. A pureza obtida na purificação possibilitou a realização dos ensaios estruturais e funcionais desse projeto.

Figura 10 - Expressão e Purificação das Co-chaperonas Lbp23A (A) e Lbp23B (B).



MM – Marcador Molecular; 1 – Não-induzido; 2 – Induzido 4 horas; 3 – Sobrenadante; 4 – Proteína Purificada pela Cromatografia de Afinidade ao Níquel; 5 – Proteína Purificada pela Cromatografia de Exclusão Molecular e Após a Clivagem da His-tag com Trombina.

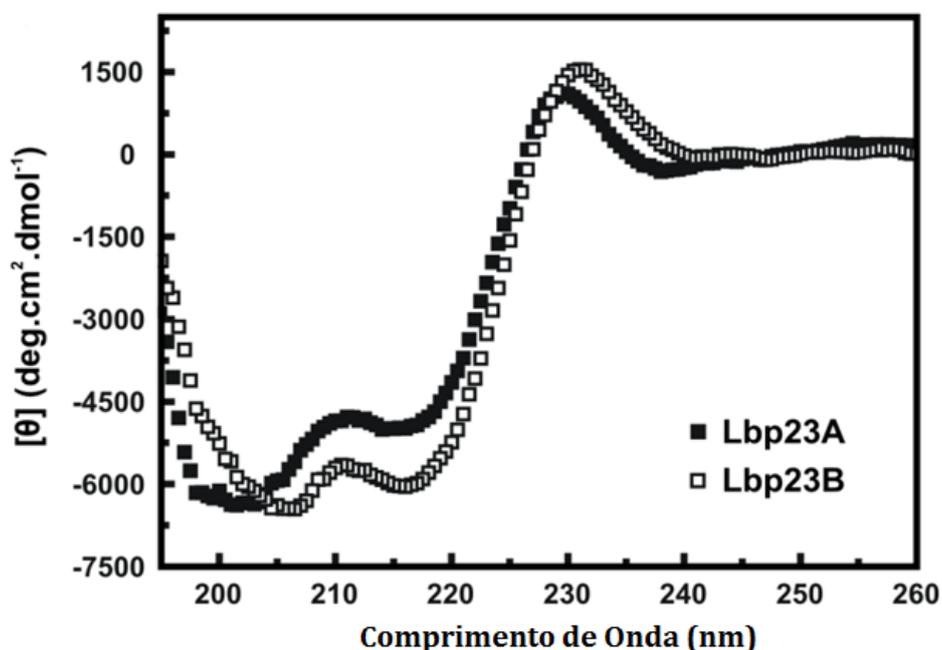
Os resultados de expressão e purificação de ambas as proteínas foram bastante satisfatórios, o que permitiu realizar os experimentos de caracterização estrutural e funcional.

4.3 ESTRUTURA SECUNDÁRIA

Para o estudo da estrutura secundária das proteínas-alvo foram realizados experimentos com a técnica de CD; técnica essa que se baseia na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada no sentido horário ou anti-horário. Os espectros de CD permitem estimar as quantidades de cada tipo de estrutura secundária.

Os espectros de dicroísmo circular (Figura 11) mostraram que as proteínas recombinantes possuem estrutura secundária. Apesar de apresentarem espectros de CD bastante parecidos, é possível observar algumas diferenças nesses espectros, como, por exemplo, a Lbp23A apresentando um sinal maior em 200 nm e menor em 218 nm, em relação a Lbp23B. Outra característica de sinal compartilhada pelas duas proteínas foi o sinal positivo na região dos 230 nm.

Figura 11 - Dicroísmo Circular da Lbp23A e Lbp23B



Experimentos de dicroísmo circular foram realizados com a Lbp23A e com a Lbp23B em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol.

O CD mostrou que ambas apresentam predominância em estrutura secundária do tipo folha-beta, sendo essa predominância já relatada para proteínas p23 ortólogas (WEIKL et al., 1999; ALI et al., 2006; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006). Além disso, elas possuem um sinal em 218 nm, característico de estrutura secundária do tipo folha-beta, sendo um indício do domínio N-terminal, e o sinal por volta de 200 nm, característico de estrutura desenovelada, o que pode representar a região C-terminal (WEIKL et al., 1999; WEAVER et al., 2000).

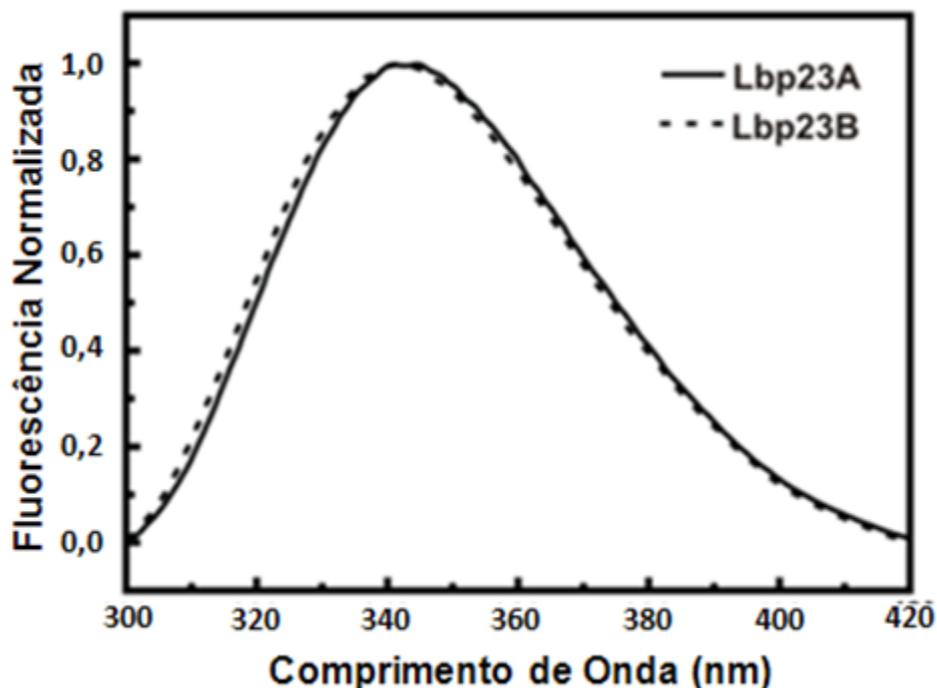
Entretanto, apesar das ligeiras diferenças apresentadas, os espectros de CD das duas proteínas são bastante similares, em termos de estrutura secundária. Vale ressaltar a presença, em ambas, de um sinal positivo em 230 nm, a qual é característica de outras p23, como, por exemplo, de seres humanos (hp23) (WEIKL et al., 1999; MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006). Essa banda característica de p23 pode ser explicada pela presença de aminoácidos aromáticos como o triptofano e tirosinas, sendo, portanto, um indicador de estrutura terciária (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006).

4.4 ESTRUTURA TERCIÁRIA LOCAL

Para proteínas, os aminoácidos tirosina e triptofano podem ser utilizados como sondas intrínsecas de fluorescência. Contudo, uma vez que o triptofano é mais sensível ao seu microambiente e se encontra, geralmente, em menor número na proteína, ele é utilizado como sonda da estrutura terciária local (EFTINK, 1994). Pela análise da estrutura primária (Figura 8) podemos observar a presença de cinco resíduos de triptofano na Lbp23A, enquanto a Lbp23B apresenta quatro resíduos.

Desta forma, experimentos de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizados a fim de monitorar a estrutura terciária local. O comprimento de excitação utilizado para esse experimento foi de 280 nm.

Figura 12 - Fluorescência Intrínseca do Triptofano.



Os experimentos de fluorescência foram realizados com a Lbp23A e com a Lbp23BA emissão de fluorescência foi coletada entre 300 e 420 nm.

Os espectros de emissão de fluorescência de ambas as proteínas são bastante parecidos (Figura 12), sendo que o comprimento máximo de emissão (λ_{max}) para a Lbp23A foi de 342 ± 1 nm e para a Lbp23B foi de 341 ± 1 nm. Além do λ_{max} , foi calculado o $\langle \lambda \rangle$ para ambas as proteínas, sendo de $352,0 \pm 0,4$ nm para a Lbp23A e de $351,2 \pm 0,3$ nm para a Lbp23B. Esse resultado de fluorescência indica que ambas as proteínas possuem estrutura terciária local, e, em conjunto com os dados de CD, que foram produzidas de maneira enovelada. Em adição a isso, a fluorescência obtida, pela média de todos os triptofanos, em ambas às proteínas permite dizer que elas possuem os triptofanos parcialmente expostos ao meio (LAKOWICZ, 2006).

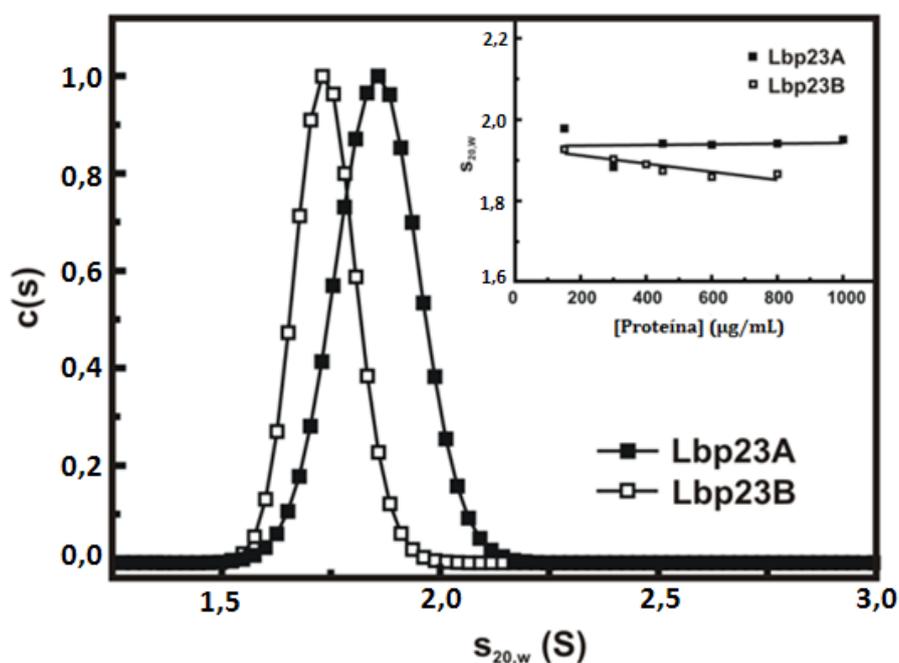
4.5 CARACTERIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DAS LBP23

Após confirmar que as duas Lbp23 foram produzidas de maneira enovelada e que ambas possuíam estrutura secundária e terciária local, iniciou-

se a verificação do estado oligomérico das Lbp23 por ultracentrifugação analítica.

A Figura 13 representa, após normalização da condição padrão do $S_{20,w}$, as curvas de coeficiente de sedimentação das Lbp23 a 800 $\mu\text{g/mL}$. Experimentos de velocidade de sedimentação foram realizados com as duas Lbp23 em diferentes concentrações (100 to 800 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 13 - Ensaio de Ultracentrifugação Analítica com a Lbp23A e com a Lbp23B.



O experimento foi realizado com várias concentrações de Lbp23 (100 to 800 $\mu\text{g/mL}$).

A massa molecular estimada pelo programa SedFit foi de 23 ± 1 kDa para a Lbp23A e de 26 ± 1 kDa para a Lbp23B, o que mostra que elas são monômeras em solução (Tabela 2). Já os valores de $s_{20,w}^0$ foram de $1,94 \pm 0,02$ S e de $1,89 \pm 0,01$ S para a Lbp23A e Lbp23B, respectivamente. Já a razão friccional, a qual nos permite inferir sobre o formato estrutural das proteínas, foi de $1,46 \pm 0,01$ para a Lbp23A e de $1,65 \pm 0,02$ para a Lbp23B, não sendo, portanto, proteínas globulares.

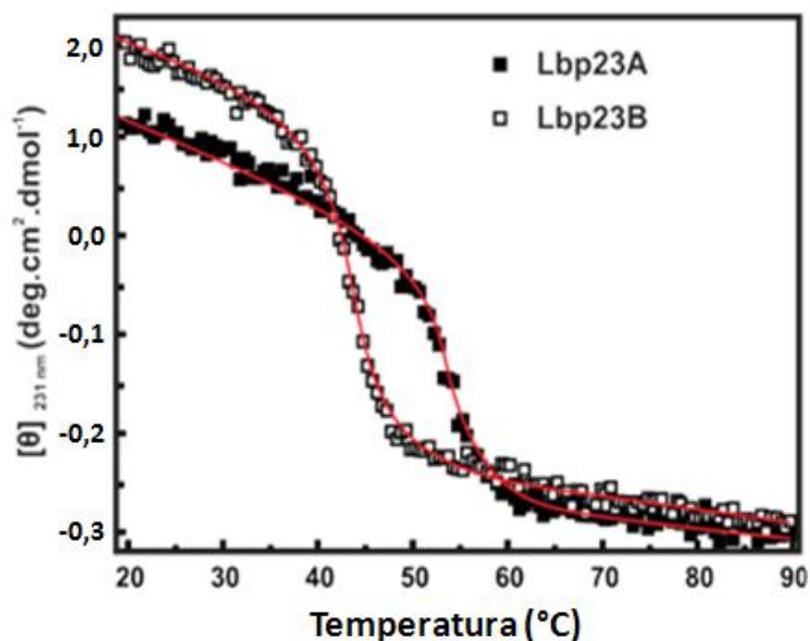
Alguns trabalhos, utilizando a ultracentrifugação analítica, já mostraram que a p23 humana se comporta como um monômero em solução (MCLAUGHLIN et al., 2006; WEAVER et al., 2000). No trabalho de doutorado de Silva (2012) foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular analítica com as duas Lbp23; esses resultados mostram um alto grau de assimetria dessas co-chaperonas. Deste modo, os resultados de AUC confirmam que essas proteínas são monômeros alongados em solução.

4.6. ESTABILIDADE TÉRMICA E QUÍMICA

Os ensaios de estabilidade foram realizados para ambas as proteínas, sempre de forma comparativa, a fim de verificar possíveis singularidades entre as duas Lbp23.

A estabilidade térmica das Lbp23 foi monitorada (Figura 14), após aquecimento constante das amostras, sendo as mudanças, causadas por esse estresse, monitoradas por CD. Desta forma, foi possível acompanhar modificações na estrutura das Lbp23. Esse experimento permitiu calcular a T_m , ou seja, a temperatura onde metade das proteínas está enovelada e a outra metade desenovelada. A Lbp23A apresentou uma T_m de $53,0 \pm 0,5$ °C, enquanto que a Lbp23B apresentou uma T_m de $44,0 \pm 0,5$ °C. Uma vez que o comprimento de onda utilizado foi de 231 nm, o desenovelamento foi monitorado pela perda de estrutura terciária, e não da estrutura secundária.

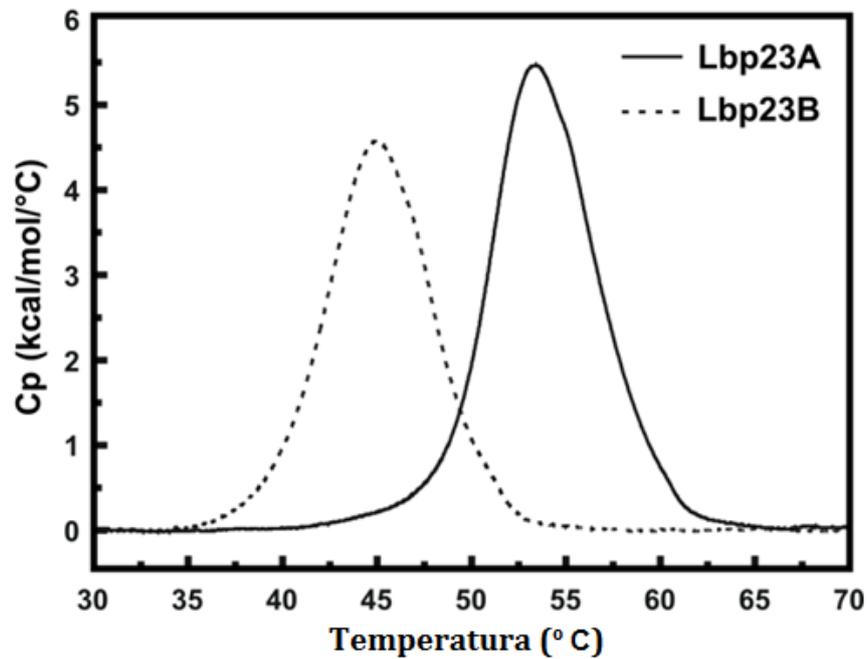
Figura 14 - Desenovelamento Térmico das Lbp23 por Monitorado por CD.



O desenovelamento térmico foi acompanhado por CD em 231 nm utilizando um Jasco J-815 acoplado a um sistema peltier de controle de temperatura. As proteínas foram aquecidas a uma taxa de 1°C/min. Proteínas, numa concentração de 0,5 mg/mL, estavam na presença de tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl e 5 mM β-Mercaptoetanol.

A estabilidade térmica das Lbp23 também foi monitorada por DSC (Figura 15). Mas, igualmente como o desenovelamento térmico monitorado por CD, as amostras foram aquecidas constantemente, a fim de causar desnaturação proteica. Os valores de T_m foram de 53,9 ± 0,2 °C e 53,9 ± 0,2 °C para a Lbp23A e Lbp23B, respectivamente.

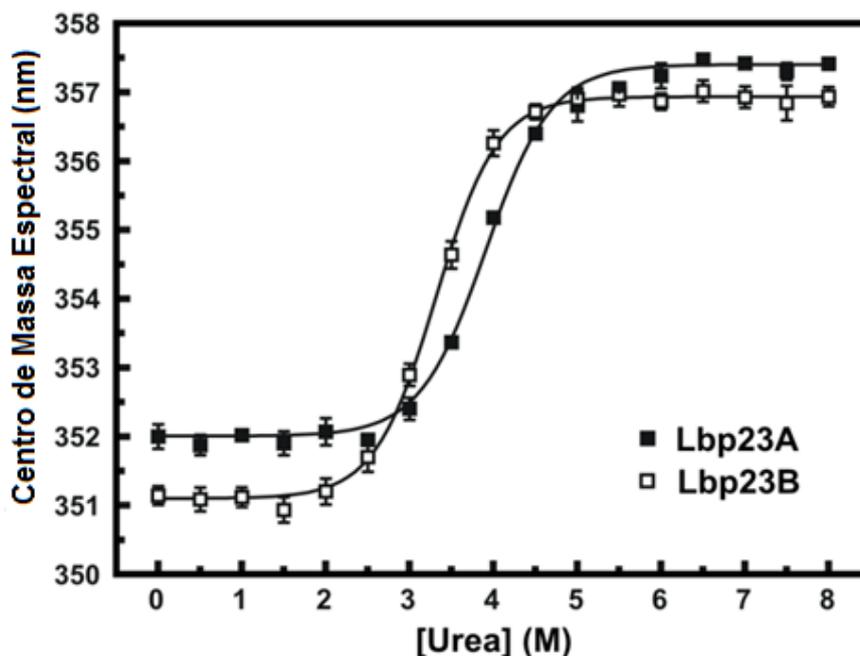
Figura 15 - Desenovelamento Térmico das Lbp23 Monitorado por DSC.



A concentração de Lbp23A e Lbp23B foi de aproximadamente 1,0 mg/mL.

Além dos experimentos de estabilidade térmica, também foi realizado um ensaio de estabilidade química (Figura 16). O desenovelamento químico com ureia das Lbp23 foi monitorado pela fluorescência do triptofano. A ureia é considerada uma agente caotrópico, onde, em altas concentrações, causa a desnaturação de proteínas (MARX; ADIR, 2014). Nesses testes, a C_m (concentração molar de ureia onde 50% da proteína se contra enovelada) foi calculada para ambas as Lbp23. Foi obtida uma C_m de $3,9 \pm 0,1$ mol/L para a Lbp23A e uma C_m de $3,3 \pm 0,1$ mol/L para a Lbp23B.

Figura 16 - Desenovelamento Químico das Lbp23 por Ureia Monitorada por Fluorescência.



Nos experimentos de estabilidade térmica, a T_m obtida para a Lbp23A foi de aproximadamente 10 °C acima da Lbp23B; já no ensaio de desenovelamento químico a Lbp23A apresentou uma C_m aproximadamente 0,5 M de ureia maior que a Lbp23B. Desta forma, em todos os experimentos de avaliação de estabilidade propostos a Lbp23A apresentou caráter mais estável quando comparada a Lbp23B.

Trabalho realizado com a p23 humana, por Weikl e colaboradores (1999), analisou a estabilidade térmica da p23 humana por CD, e verificou que o sinal de CD não se altera até 60°C, diferentemente das Lbp23 que, nessa temperatura, já se encontram desenoveladas.

4.7 ATIVIDADE CHAPERONA

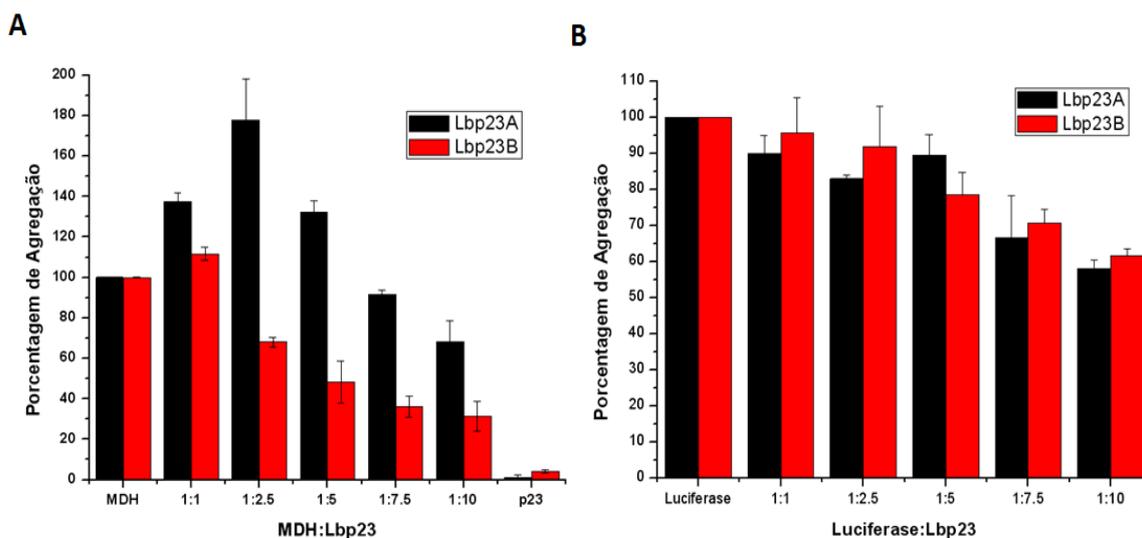
É reportado que as p23 possuem atividade chaperona intrínseca e são capazes de interagir com proteínas-clientes em condições de estresse prevenindo a agregação proteica e mantendo-as em um estado enovelado (WEIKL et al., 1999, WEAVER et al., 2000).

A atividade chaperona das duas Lbp23 foi medida pela prevenção da agregação proteica de duas proteínas-clientes: a MDH e a luciferase. Neste teste, 1,0 μM de proteína-cliente é submetida a um estresse térmico, na presença de concentrações crescente de Lbp23 (1-10 μM). Nessa temperatura as Lbp23 não sofrem perturbações em sua estrutura, como previamente monitorado pelos ensaios de desnaturação térmica (item 4.6). A agregação das Lbp23, monitorada numa concentração de 10 μM , e das proteínas-clientes, consideradas como 100% de agregação foram os controles desse experimento.

Os resultados apresentados na Figura 17A indicam que as duas Lbp23 foram capazes de prevenir a agregação da MDH e não agregaram quando submetidas ao estresse térmico. Entretanto, a Lbp23B se mostrou mais eficiente em todas as concentrações testadas, o que significa que ela age de forma mais eficaz na prevenção da agregação da proteína cliente, quando comparada com a Lbp23A. Na mesma figura, pode-se observar que em baixas concentrações de Lbp23A (1,0 e 2,5 μM), essa proteína, além de não ter sido eficiente em prevenir a agregação da MDH, co-agregou-se com a proteína-cliente, o que explica os valores acima de 100% nesse gráfico.

Já quando a proteína-cliente utilizada foi a luciferase (Figura 17B), ambas as co-chaperonas preveniram a agregação proteica, porém com menor eficiência, quando comparado com os resultados obtidos pela MDH. Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas Lbp23, no que se refere à inibição da agregação proteica da luciferase.

Figura 17 - Atividade Chaperona das Co-chaperonas Lbp23A e Lbp23B.



(A) Prevenção da Agregação Proteica com a MDH. (B) Prevenção da Agregação Proteica com a Luciferase.

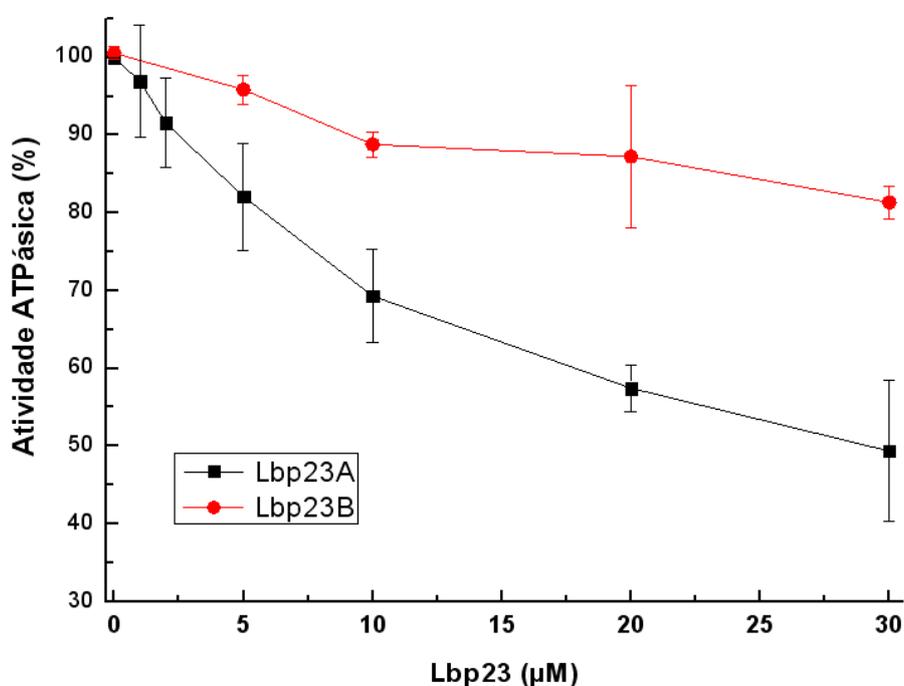
Nesse experimento as Lbp23 foram analisadas comparativamente, sendo que outros experimentos utilizando essas, e outras, proteínas clientes já mostraram essa atividade chaperona das p23 (WEIKL et al., 1999; WEAVER et al., 2000; PATWARDHAN et al., 2013). Outros ensaios mostram a importância da região C-terminal para a atividade chaperona da p23, onde a falta dessa resultou na diminuição da prevenção da agregação proteica da citrato sintase (WEAVER et al., 2000).

4.8 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA DA LBHSP90

Como já discutido, a p23 tem papel fundamental no ciclo funcional da Hsp90. Essa co-chaperona possui a capacidade de inibir a taxa de hidrólise do ATP da Hsp90, o que dá maior tempo para essa proteína atuar sobre a proteína cliente (KARAGOZ et al., 2011). A atividade ATPase da Hsp90 é de vital importância para o ciclo funcional dessa proteína. Ela possui baixa atividade de hidrólise do ATP, sugerindo que os rearranjos conformacionais no complexo estão acoplados a atividade de hidrólise do ATP, portanto um passo limitante (WANDINGER et al., 2008).

Testes de inibição da atividade ATPase da LbHsp90 foram realizados com as duas p23 de *L. braziliensis*. A Figura 18 representa os resultados obtidos no teste de inibição da atividade ATPase. Ambas as Lbp23 reduziram a atividade ATPase da LbHsp90, sendo que a incubação com a Lbp23A representou uma diminuição na atividade em aproximadamente 50%, e a Lbp23B reduziu a atividade da LbHsp90 em aproximadamente 20%, sendo assim, a Lbp23A apresentou uma eficiência maior na inibição da atividade ATPase da LbHsp90, quando comparada com a Lbp23B.

Figura 18 - Inibição da Atividade ATPase da Lbp23A e da Lbp23B.



A LbHsp90 foi incubada (1,0 µM de dímero) com ATP e Mg^{2+} , juntamente com quantidades crescentes de Lbp23.

Os valores estimados para o IC_{50} foram de aproximadamente 16,4 µM para a Lbp23A e de 11 µM para a Lbp23B. McLaughlin e colaboradores (2006), utilizando Hsp90 humana, obteve uma redução completa na atividade ATPase da LbHsp90 com um excesso de 8-10 vezes de p23, determinando o IC_{50} (concentração de inibidor que inibe 50% da atividade de uma enzima) em aproximadamente 5 µM.

A p23 interage com a Hsp90 através do domínio N-terminal da Hsp90, onde duas moléculas dessa co-chaperona interagem com a forma dimérica da Hsp90 (ALI et al., 2006). Posteriormente, foi demonstrado que essa interação também ocorre do domínio M e num segmento, *lid*, importante para a ligação do nucleotídeo (MARTINEZ-YAMOUT et al., 2006; KARAGOZ et al., 2011). Todas essas interações, além de provocar alterações conformacionais na Hsp90, levam a alteração no sítio de ligação do nucleotídeo, o que explica a diminuição da atividade ATPase da Hsp90 (KARAGOZ et al., 2011).

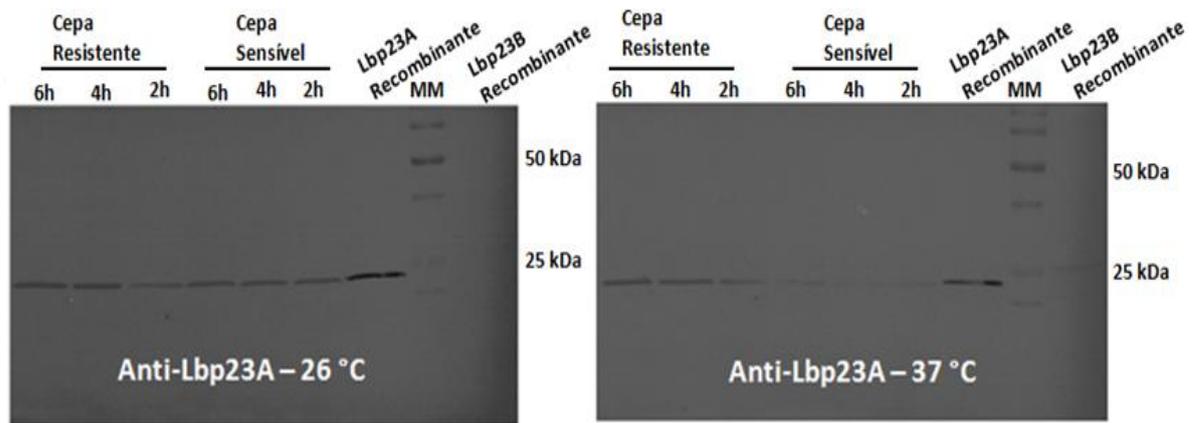
4.9 IDENTIFICAÇÃO *IN VIVO*

Por fim, foi realizada a identificação *in vivo* dessas duas co-chaperonas. Com os experimentos de western blotting foi possível identificar as duas p23 em extratos celulares da forma promastigota do protozoário *L. braziliensis*. Nesse experimento foram utilizadas duas cepas diferentes desse organismo: uma sensível ao antimônio e outra resistente a este composto (LIARTE; MURTA, 2010). Essas cepas foram crescidas em duas temperaturas diferentes (26°C e 37°C), a fim de simular a temperatura corpórea dos dois hospedeiros (inseto e mamífero), sendo que foram recolhidas amostras em 2h, 4h e 6h de indução (janela de expressão das chaperonas).

As Figuras 19 e 20 representam os resultados alcançados e mostram que o título utilizado para os anticorpos conseguiu diferenciar as duas Lbp23, uma vez que as duas Lbp23 recombinantes foram colocadas no gel SDS-PAGE (como controle).

O resultado do experimento sugere que, quando utilizado o anticorpo anti-Lbp23A, a 26°C (Figura 19), não houve diferenças nos níveis de expressão da Lbp23A, tanto na cepa sensível, quanto na cepa resistente ao antimônio. Já a 37°C (Figura 19), o extrato resistente ao antimônio parece apresentar níveis maiores de expressão da Lbp23A nos três diferentes tempos de indução, quando comparado ao extrato sensível.

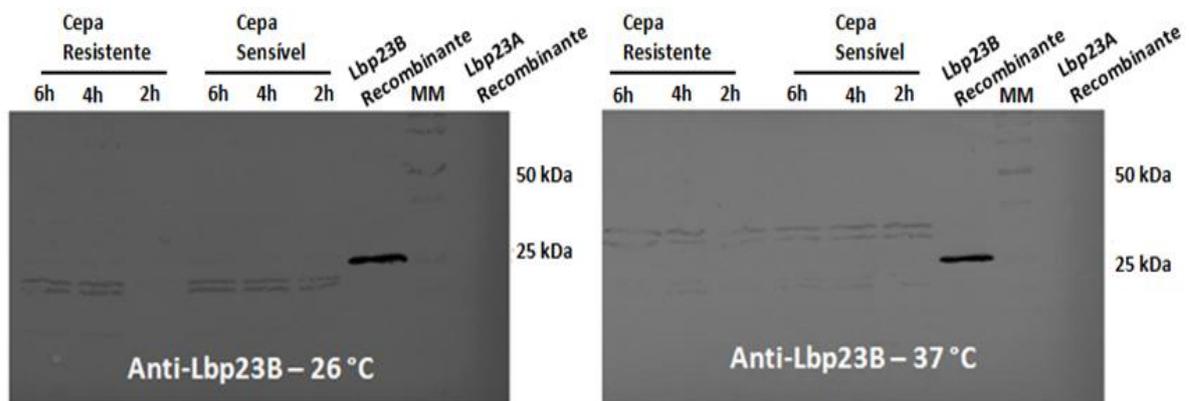
Figura 19 - Ensaio de identificação *in vivo* da Lbp23A por Western Blotting.



A expressão da Lbp23A foi acompanhada na forma progastigota (cepa sensível e resistente ao antimônio) da *L. braziliensis* cultivadas a 26°C e a 37°C por 2h, 4h e 6h.

Contudo, quando o anticorpo anti-Lbp23B foi utilizado nos extratos crescidos a 26° C (Figura 20) pode-se notar que a proteína sofreu um processo de degradação em todas as condições experimentais, devido à presença de bandas de menor massa molecular. Já nos extratos crescidos a 37° C (Figura 20) podemos verificar no gel a identificação de bandas com massas moleculares acima do tamanho esperado, sugerindo que a Lbp23B pode sofrer algum tipo de modificação pós-traducional nessa temperatura de crescimento, diferentemente do que parece ocorrer com a Lbp23A.

Figura 20 - Ensaio de identificação *in vivo* da Lbp23B por Western Blotting.



A expressão da Lbp23B foi acompanhada na forma progastigota (cepa sensível e resistente ao antimônio) da *L. braziliensis* cultivadas a 26°C e a 37°C por 2h, 4h e 6h.

Esses resultados mostram a presença *in vivo* das duas p23 em promastigotas de *L. braziliensis* em todas as condições testadas, o que sugere a expressão constitutiva dessas proteínas. Diversos trabalhos têm identificado a expressão constitutiva tanto das p23 quanto outras co-chaperonas em cepas de *L. braziliensis* (MATRANGOLO et al., 2013; SERAPHIM et al., 2013).

A avaliação do potencial de fosforilação (BLOM et al., 1999) das Lbp23 (Tabela 5), a partir da sequência de aminoácidos, foi realizada, e indicou que essas duas proteínas possuem possíveis sítios para esse tipo de alteração pós-traducional. No entanto, o conhecimento do potencial de fosforilação não é suficiente para identificar os resíduos que serão de fato fosforilados, devida a alta complexidade das interações intracelulares (DINKEL et al., 2010).

A presença de bandas de massa molecular acima do tamanho esperado para a co-chaperona Lbp23B indica que pode haver algum tipo de mudança pós-traducional nessa proteína, como a fosforilação, por exemplo, o que parece não ocorrer na Lbp23A. A fosforilação, além de ser uma das mais abundantes modificações pós-traducionais, é um evento conservado entre as espécies, auxiliando na regulação das proteínas (DINKEL et al., 2010).

Tabela 5 - Potenciais Sítios de Fosforilação nas Lbp23 (programa NetPhos 2.0 Server).

Lbp23A			Lbp23B				
Posição do 1º Resíduo	Região na Estrutura Primária	Score (0,00-1,00)	Posição do 1º Resíduo	Região na Estrutura Primária	Score (0,00-1,00)		
Ser	39	TVSI S GYGV	0,55	66	YGAI S SEES	0,99	
	102	KLTK S WLSA	0,98		67	GAIS S EESQ	0,51
	105	KSWL S ADWN	0,73		70	SSEES S QHVV	0,85
	168	AGGD S DDEE	0,95		90	KLTR S LEDA	0,99
	176	EMAD S EGEE	0,98				
	189	ECEK S EEPA	0,97				
Thr	23	SEPH T LKGE	0,67	29	PLQD T TGVT	0,79	
	52	VEAM T ASDV	0,53	104	WPRL T KEKV	0,98	
	69	PEDS T FKVL	0,80	173	LPPG T IPEF	0,70	
Tyr	88	KDQG Y WNRL	0,78	19	QRPE Y VLVT	0,89	
	130	NFGG Y GDMG	0,94	110	EKV Y PNIT	0,97	
				147	MDGQ Y SEML	0,75	

Abaixo são destacados os resíduos com maior probabilidade de serem fosforilados (score acima de 0,50). * *Em negrito: resíduo de aminoácido com alta probabilidade de sofrer fosforilação.*

Mudanças pós-traducionais, como a fosforilação e a acetilação, desempenham importante papel tanto na regulação, quanto na adaptação desses organismos, e as chaperonas apresentam um papel central nesse processo (MORALES et al., 2010).

Tanto as Hsp90 quanto as suas co-chaperonas apresentam mudanças pós-traducionais durante o ciclo funcional dessa importante família de chaperona. Em *L. donovani* a viabilidade da forma amastigota depende da fosforilação na co-chaperona Hop (MORALES et al., 2010). Além disso, é conhecido que no protozoário *P. falciparum* a p23 apresenta diferentes ciclos de fosforilação, dependendo do estágio de vida desse parasita (WISER, 2003).

5.0 CONCLUSÕES

- A Lbp23A e a Lbp23B recombinantes foram expressas e purificadas com alto grau de pureza, sendo produzidas no estado enovelado, possuindo estrutura secundária e terciária.
- Em pesquisa a banco de dados foi possível identificar a existência de duas p23 em outros protozoários, o que parece ser uma característica desses grupos de organismos.
- A árvore de alinhamento construída a partir da sequência de aminoácidos resultou em dois grandes grupos de tripanossomatídeos.
- Entre as duas Lbp23 tanto a identidade quanto a similaridade são baixas, sendo maior entre cada uma delas com a hp23.
- As Lbp23 apresentam conteúdo de estrutura secundária similar à hp23, com predominância de folha-beta.
- Nos experimentos de CD verificou-se nas Lbp23 um pico positivo de sinal em 230nm, característico de p23 (indício de estrutura terciária).
- As Lbp23 são monômeros alongados em solução.
- Apesar de possuírem níveis estruturais parecidos, apresentam estabilidade química e térmica bastante dispares. Nesses ensaios, a Lbp23A apresentou maior estabilidade química e térmica, quando comparada com a Lbp23B.
- Apesar das diferenças apresentadas entre as duas Lbp23, ambas possuem atividade chaperona - evitaram a agregação proteica de substratos-modelos. Entretanto, elas não são equivalentes, apresentando diferenças em seus níveis de inibição da agregação.
- Ambas as Lbp23 apresentaram diferenças nos níveis de inibição da atividade ATPásica da LbHsp90.
- As duas Lbp23 foram identificadas em extratos celulares da forma promastigota de *L. braziliensis*, em diferentes temperaturas (26°C e 37°C) e em diferentes cepas (uma sensível ao antimônio e outra resistente ao antimônio), o que sugere que essas proteínas são produzidas constantemente pelo parasita.

- Os testes de identificação *in vivo* sugerem que a Lbp23B pode apresentar alguma modificação pós-traducional.
- Os resultados indicam que as duas proteínas-alvo estudadas no parasita *L. braziliensis* (Lbp23A e Lbp23B) são inequivocamente p23, uma vez que ambas possuem sinais estruturais e função de p23.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4. Ed. New York: Garland Science, 2002.

ALLAN, R.K. et al. Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.7161-71, 2006.

ALI, M.M. et al. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. **Nature**, n.440, p.1013–17, 2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, n.17, p.3389-402, 1997.

ANFINSEN, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, n.181, p.223-230, 1973.

ASSCHE, T. V. et al. *Leishmania*–macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, n.2, p.337-351, 2011.

BANERJI, U.; JUDSON, I.; WORKMAN, P. The clinical applications of heat shock protein inhibitors in cancer: present and future. **Curr Cancer Drug Targets**, n.3, p.385–390, 2003.

BANUMATHY, G. et al. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.20, p.18336-45, 2003.

BARDWELL, J.C.A.; JAKOB, U. Conditional disorder in chaperone action. **Trends in Biochemical Sciences**, v.37, n.12, p.517-25, 2012.

BATES, P.A.; ASHFORD, R.W. Old world leishmaniasis. In: COX, F.E.G. et al. (Ed.). **Topley & Wilson's microbiology & microbial infections**. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2006. p.283–312.

BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, v.4, p.601–609, 2004.

BEATTIE, L.; KAYE, P.M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? **Cell. Microbiol.**, v.13, n.11, p.1659-67, 2011.

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

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 15. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2002.

BLANK, M. et al. Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin. **Cancer Res.**, v.63, p.8241–47, 2003

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v.294, n.5, p.1351-62, 1999.

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

BUCHNER, J. Hsp90 & Co.: a holding for folding. **Trends Biochem. Sci.**, v.24, p.136-141, 1999.

CHAI, Y. et al. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. **J. NeuroSci.**, v.19, p.10338-347, 1999.

CHUA, C.S. et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* co-chaperone p23: its intrinsic chaperone activity and interaction with Hsp90. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, n.10, p.675-86, 2010.

COHEN-FREUE, G. et al. Global gene expression in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.10, p.1077–86, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis public health aspects and control. **Clin Dermatol.**, n.14, p.417–23, 1996.

DINKEL, H. et al. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites—update 2011. **Nucleic Acids Research.** p.1–7, 2010.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors.**, v.5, p.276, 2012.

EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophysical Journal**, v.66, p.482-501, 1994.

ELLIS, R. J.; HARTL F. U. Principles of protein folding in the cellular environment. **Current Opinion in Structural Biology**, v.9, p102-110, 1999.

FINK, A.L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, v.79, p.425-449, 1999.

FORAFONOV, F. et al. p23/Sba1p Protects against Hsp90 inhibitors independently of its intrinsic chaperone activity. **Mol. Cell. Biol.**, p.3446–3456, 2008.

GARCIA-RANEA, J.A. et al. p23 and Hsp20/a-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. **FEBS Lett.**, v.529, p162–167, 2002.

GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic cell**, v.1, n.6, p.936-943, 2002

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v.475, 2011.

HARTL, F.U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol, from nascent chain to folded protein. **Science**, v.295, p.1852-58, 2002.

HARST, A.; LIN, H.; OBERMANN, W.M. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. **Biochem. J.**, v.387, p.789–796, 2005.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat shock. **Annual Review of Biochemistry**, v.16, p.349-384, 1993.

HÖHFELD, J.; CYR, D.; PATTERSON, C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. **EMBO Reports**, v.2, p.885-890, 2001.

ITOH, H. et al. A novel chaperoneactivity- reducing mechanism of the 90 kDa molecular chaperone Hsp90. **Biochem. J.**, v.343, p.697-703, 1999.

JAENICKE, R. Folding and association of proteins. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v.49, p.117- 237, 1987.

JIANG, J. et al. CHIP Is a U-box-dependent E3 Ubiquitin Ligase. Identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.42938–944, 2001.

KARAGOZ, G.E. et al. N-terminal domain of human Hsp90 triggers binding to the cochaperone p23. **PNAS.**, v.108, n.2, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol.**, v.17, p.279–289, 1999.

KRUKENBERG, K.A.; STREET, T.O.; LAVERY, L.A. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. **Quarterly Reviews of Biophysics**, 2011.

LAINSON, R., SHAW, J.J. New world leishmaniasis. In: COX, F.E.G. et al. (Ed.). **Topley & Wilson's microbiology & microbial infections**. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2006. p.313–349.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006.

LANE, R.P. Sandflies (Phlebotominae). In: LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. (Ed.). **Medical insects and arachnids**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 78–119.

LASKEY, R.A. et al. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. **Nature**, v.275, p.416-42, 1978.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.152, p.35–46, 2007.

LIARTE, D.; MURTA, S. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. **Parasitol. Res.**, v.107, p.205-212, 2010.

LOTZ, G.P., et al. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.17228–235, 2003.

MALONEY, A.; WORKMAN, P. Hsp90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v.2, p.3-24, 2002.

MARTINEZ-YAMOUT, M.A. et al. Localization of sites of interaction between p23 and Hsp90 in solution. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.20, p.14457–464, 2006.

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, p.37181–186, 2000.

MARUYA, M. et al. Monomer arrangement in Hsp90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies. **J. Mol. Biol.**, v.285, p.903-907, 1999.

MARX, A.; ADIR, N. Structural characteristics that stabilize or destabilize different assembly levels of phycocyanin by urea. **Photosynth Res.**, 2014.

MATRANGOLO, F. S. V. et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and –susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* chagasi lines. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.190, p.63-75, 2013.

MAYER, P.M. Phosphotyrosine confers client specificity to Hsp90. **Molecular Cell**, v.37, 2010.

MCLAUGHLIN, S.H. et al. The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. **J Mol Biol.**, v.356, p.746–758, 2006.

MEYER, P. et al. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO J.** v.23, p.1402-10, 2004.

MORALES, M.A. et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. **P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.107, p.8381-86, 2010.

MUELLER, A. K. et al. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. **Nature**, v.433, p.164–7, 2005.

NECKERS, L.; WORKMAN, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? **Clin Cancer Res.**, v.18, p.64-76, 2012.

NEMOTO, T. et al. Mechanism of dimerformation of the 90 kDa heat shock protein. **Eur. J. Biochem.**, v.233, p.1-8, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry.** W. H. Freeman and Company. New York. 5 ed. 2008.

OMMEN, G.; CHROBAK, M.; CLOS, J. The co-chaperone SGT of *Leishmania donovani* is essential for the parasite's viability. **CellStressChaperones.** v.15, p.443-55, 2010.

PANARETOU, B. et al. Activation of the ATPase activity of the function of Hsp90 by the stress regulated cochaperone Aha1. **Mol. Cell**, v.10, p.1307-1318, 2002.

PATWARDHAN, C. A. et al. Gedunin inactivates the co-chaperone p23 protein causing cancer cell death by apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v.288, p.7313-25, 2013.

PAVITHRA, S.R. et al. Recurrent fever promotes plasmodium falciparum development in human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.46692-699, 2004.

PEARL, L.H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu. Rev. Biochem.**, v.75, p.271-94, 2006.

PETERS, N.; SACKS, D.L Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T-cells. **Immunol. Rev.**, v.213, p.159–179, 2006.

PIMENTA, P.F.P. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania promastigotes* to the sandfly midgut. **Science**, v.256, p.1812–15, 1992.

PRODROMOU, C. et al. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. **EMBO J.**, v.18, p.754-762, 1999.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: the european molecular biology open software suit. **Trends In Genetics**, v.16, p.276-77, 2000.

ROHL, A.; ROHRBERG, J.; BUCHNER, J. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. **Trends in Biochemical Sciences**, v.38, n.5, p. 253-262, 2013.

RUDDON, R.W.; BEDOWS, E. Assisted protein folding. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.3125-128, 1997.

SCHEUFLER, C. et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v.101, p.199-210, 2000.

SCHNEIDER, C. et al. Pharmacologic shifting of a balance between protein folding and degradation mediated by Hsp90. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.93, p.14536-541, 1996.

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, 2013.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The interaction networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and *Leishmania parasites* In: **Molecular chaperone interaction networks in protein folding and degradation**. No prelo.

SHAPIRA, M.; MCEWEN, J. G.; JAFFE C L. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. **EMBO J.**, v.7, n.9, p.2895-901, 1988.

SHIAU, A. K. et al. Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. **Cell**, v.127, p.329–340, 2006.

SILVA, Kelly Pereira da. **Estudos estruturais e funcionais da Hsp90 de Leishmania braziliensis e suas co-chaperonas p23**. 2012. 93. Tese de Doutorado em Química Orgânica e Biológica. Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2012.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. V. Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. **Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, v.1834, p.351-361, 2013.

SOTI, C. et al. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v.146, n.6, p.769-780, 2005.

SOTI, C.; RACZ, A.; CSERMELY, P. A Nucleotide-dependent Molecular Switch Controls ATP Binding at the Cterminal Domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a Cterminal binding pocket. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.7066–7075, 2002.

STEBBINS, C.E. et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, v.89, p.239-250, 1997.

SULLIVAN, W. et al. Nucleotides and two functional states of hsp90. **J Biol Chem.**, v.272, p.8007–12, 1997.

SULLIVAN, W.P.; OWEN, B.A.; TOFT, D.O. The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. **J Biol Chem.**, v.277, p.45942– 948, 2002.

TREPEL, J. et al. Targeting the dynamic Hsp90 complex in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.10, 2010.

VANBUSKIRK, K. M. et al. Pre-erythrocytic, live-attenuated Plasmodium falciparum vaccine candidates by design. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.106, p.13004–009, 2009.

VAN DER PLOEG, L. H.; GIANNINI, S.H.; CANTOR, C.R. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. **Science**, v.228, n.4706, p.1443-46, 1985.

VAUGHAN, A. M.; WANG, R.; KAPPE, S. H. Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. **HumVaccin.** v.6, p.107-13, 2010.

WAN, S. W. et al. Current progress in dengue vaccines. **J Biomed. Sci.**, v.20, 2013.

WANDINGER, S.K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **J. Biol. Chem.**, v.283, p.18473-477, 2008.

WEAVER, A.J. et al. Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.23045-052, 2000.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER J. Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. **Rev. Physiol.Biochem. Pharmacol.**, v.51, p.1-44, 2004.

WEIKL, T.; ABELMANN, K.; BUCHNER, J. An unstructured c-terminal region of the hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. **J. Mol. Biol.**, v.293, p.685-691, 1999.

WHITESELL, L. et al. Inhibition of heat shock protein Hsp90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.91, p.8324-28, 1994.

WISER, M. A Plasmodium homologue of cochaperone p23 and its differential expression during the replicative cycle of the malaria parasite. **Parasitol. Res.** v.90, n.2, p.166-170, 2003.

WHITFORD, D. **Proteins**: structure and function. New York: Wiley, 2005.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol. Biol. Cell.**, v.12, p.3307-16, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases**: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Switzerland, 2010.

YOUNG, J.C.; HARTL, F.U. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. **EMBO J.**, v.19, p.5930-40, 2000.

YOUNG, J.C.; MOAREFI, I.; HARTL, F.U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **J. Cell. Biol.**, v.154, p.267-273, 2001.

YUN, B.G. et al. Novobiocin induces a distinct conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperone-client interactions. **Biochemistry**. v.43, p.8217-29, 2004.

ZHAO, B. et al. Characterization and Expression of p23 gene in the Amphioxus *Branchiostoma belcheri*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B, v.145, p.10-15, 2006.