Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Candidato: Sergio Luiz Ramos Junior

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Caracterização da chaperona Hsp100 de *Leishmania*
braziliensis: estudos estruturais e funcionais

São Carlos

2018

Sergio Luiz Ramos Junior

Caracterização da chaperona Hsp100 de *Leishmania*
braziliensis: estudos estruturais e funcionais

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Exemplar revisado

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

São Carlos

2018

À minha amada, companheira e esposa, Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais *Sergio e Lilian* e à minha *família*, por terem me incentivado a estudar, me dado todas as oportunidades que deram e contribuírem com minha formação durante toda a vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. *Júlio César Borges*, pela orientação, pela atenção, pela educação com que sempre me tratou, pela paciência com minha personalidade descontruída (até demais) e com todos os vários erros cometidos no caminho até aqui (rs), por acreditar em mim. Você sabe que tive e tenho várias dúvidas quanto a minha trajetória acadêmica passada e futura, mas uma certeza eu tenho: acertei na escolha do meu orientador. Muito obrigado *boss*!

À Dra. *Fernanda Batista* (Fer), por toda a orientação, conselhos, ajuda constante, e por ter me adotado no grupo de pesquisa, por ter me deixado este e outros projetos e ótimas micropipetas de herança, com certeza se não fosse por você nada disso teria acontecido. Agradecimento especial aos dados de AUC que compõe esse trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas por tornarem os dias mais leves e divertidos, pelos cafés e por não respeitarem a regra de que dentro de um laboratório não se é feliz, vocês fizeram meus dias muito felizes e espero que eu tenha retribuído da mesma forma, em especial às meninas que tornam esse laboratório mais cheio de carinho (e, as vezes, sarcasmo), *Noeli, Nicole, Karine e Marcel(l)as*.

E claro, em especial à *Vanessa Kiraly* (Van) pelos infinitos galhos quebrados, pela amizade, pelos momentos bons e ruins, e por topar todas as minhas ideias desde “sorvete depois do almoço” até as mais malucas como “além de pós, vamos fazer uma segunda graduação durante a noite, acho que a gente consegue” (spoiler, não, eu não consegui!).

Ao Dr. *Paulo Roberto* que realizou os experimentos de SAXS, mas não somente isso, que também me acolheu quando me deixaram órfão no laboratório, me aceitou como amigo, e já me alimentou em diversas ocasiões, você é uma pessoa muito especial PR, obrigado por tudo!

Ao Dr. *Vitor Hugo* pelos experimentos de TEM, e sempre ter sido solícito com minhas dúvidas.

À FAPESP, ao CNPq e em especial à CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho e a bolsa concedida (CAPES-PROEX processo 1632463).

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e o Laboratório Nacional de Nanotecnologia, localizados no Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) que forneceram estrutura e apoio para realização dos estudos de AUC, SAXS e Microscopia respectivamente.

Ao *Instituto de Química de São Carlos* (IQSC) por toda estrutura física, corpo docente e quadro de funcionários que, por vezes sem serem notados, trabalham e dão suporte para que tudo possa acontecer. Um agradecimento em especial à *Central de Análises Químicas Instrumentais* (CAQI) do IQSC onde foram realizados experimentos de Microscopia.

Ao meu irmão *Gabriel Luiz* que sempre se mantém presente apesar da distância e que tem o costume de me fazer desconstruir meus pré-conceitos desde o primeiro que era tão bom ser filho único.

À minha amada *Ana Paula*, pelo companheirismo e amor sem limites.

A todos que contribuíram comigo e com este trabalho, se não citei seu nome saiba que é por esquecimento e não falta de educação.

“Do, or do not, there is no try”

Yoda, 1980

Grão-Mestre da Ordem Jedi

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que afeta milhares de pessoas podendo até levar a óbito em sua forma visceral. Durante o seu ciclo de vida, o parasita passa por diversas mudanças ambientais como mudança de temperatura e pH, principalmente quando da transfecção do inseto vetor para o hospedeiro mamífero. Tais mudanças geram estresse celular que pode levar proteínas ao enovelamento incorreto assim como a processos agregativos, sendo necessários sistemas de controle de qualidade proteico para manter a homeostase celular, do qual fazem parte as chaperonas moleculares. Chaperonas como a Hsp100, ajudam a manter a homeostase celular e a adaptação desempenhando um papel importante para protozoários como a *Leishmania braziliensis*, causador da leishmaniose. A Hsp100 tem papel desagregase, atuando com outras chaperonas moleculares para a extração de polipeptídios de agregados proteicos possibilitando seu desenovelamento e posterior reenovelamento, evitando seu efeito tóxico sobre a célula. A Hsp100 parece ser essencial para esses microrganismos, no entanto não há muito dados disponíveis para Hsp100 em *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp.* Neste trabalho está descrito o protocolo para expressão e purificação da Hsp100 recombinante de *L. braziliensis* (rLbHsp100), assim como sua caracterização estrutural e funcional inicial *in vitro*. A proteína foi analisada por espectropolarimetria de dicroísmo circular, apresentando estrutura típica de proteínas ricas em hélices α , a fluorescência estática de triptofano demonstrou que a proteína possui estrutura terciária local com seus triptofanos parcialmente expostos ao solvente. Por cromatografia de exclusão molecular analítica, observou-se que a LbHsp100 se comporta como um oligômero cujo estado é influenciado tanto pela concentração proteica como pela presença de nucleotídeos adenosina. Análises por ultracentrifugação analítica evidenciaram que a rLbHsp100 em solução apresenta um equilíbrio de diversas espécies havendo deslocamento para um hexâmero de maneira concentração dependente. Análises de SAXS confirmaram a estrutura hexamérica e proporcionaram a obtenção de um modelo *ab initio* da proteína. Através de microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar a forma toróide e a dispersividade do sistema. Por fim, atestou-se que a proteína foi obtida funcional com fraca atividade ATPásica, apresentando também interações com nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) assim como com a suramina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease that affects thousands of people and may even lead to death in its visceral form. During its life cycle, the parasite undergoes several environmental changes such as temperature and pH changes, especially when transfecting from the vector insect into the mammalian host. Such changes generate a cellular stress that can lead to misfolding as well as to aggregative processes, therefore a protein quality control system is necessary to maintain cell homeostasis, which includes molecular chaperones. Chaperones such as Hsp100 can help maintain cellular homeostasis and adaptation playing an important role for protozoa such as *Leishmania braziliensis*, which causes leishmaniasis. The Hsp100 has a disaggregase action, acting with other proteins of the chaperone system to extract polypeptides from protein aggregates, allowing their unfolding and subsequent refolding, avoiding their toxic effect on the cell. Hsp100 appears to be essential for these microorganisms, however there is not much data available for Hsp100 in *Leishmania sp.* and *Plasmodium sp.* This work describes the protocol for expression and purification of the recombinant Hsp100 of *Leishmania braziliensis* (rLbHsp100), as well as its initial *in vitro* characterization. The protein was analyzed by circular dichroism spectropolarimetry, presenting a typical structure of α -helix rich protein as well as a concentration-dependent structure gain, static fluorescence of tryptophan demonstrated that the protein has local tertiary structure with its tryptophans partially exposed to the solvent. Analytical size exclusion chromatography showed that LbHsp100 behaves as an oligomer whose state is influenced by both the concentration and the presence of adenosine nucleotides. Analysis by analytical ultracentrifugation has shown that the rLbHsp100 in solution exhibits an equilibrium of several species shifting towards a hexamer in a concentration dependent manner. SAXS analyzes confirm the hexameric structure and had provide an *ab initio* model for the protein. Transmission electron microscopy shows the toroidal form and dispersivity of the system. Finally, the obtained protein had showed catalytic function, and also interacted with adenosine nucleotides (ATP and ADP) as well as suramine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 A Hsp100	10
1.2 Estados Oligoméricos e Atividade da Hsp100.....	11
1.3 A Leishmaniose	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Objetivos.....	15
2.1.1 Gerais.....	15
2.1.2 Específicos	15
2.2 Materiais e Métodos	15
2.2.1 Alinhamento	15
2.2.2 Expressão e Purificação da rLbHsp100.....	15
2.2.3 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular	16
2.2.4 Fluorescência Estática de Triptofano	17
2.2.5 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica	17
2.2.6 Ultracentrifugação Analítica	18
2.2.7 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo.....	18
2.2.8 Microscopia eletrônica de Transmissão	19
2.2.9 Atividade ATPásica	19
2.2.10 Supressão de Fluorescência	20
2.3 Resultados e Discussão	21
2.3.1 Alinhamento	21
2.3.2 Expressão e Purificação da LbHsp100	22
2.3.3 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular	23
2.3.4 Fluorescência Estática de Triptofano	25
2.3.5 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica	27
2.3.6 Ultracentrifugação Analítica	30
2.3.7 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	33
2.3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
2.3.9 Atividade ATPásica	39
2.3.10 Supressão de Fluorescência	41
3 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas biológicas capazes de desempenhar diversas funções, tais como catálise, transporte e sinalização. Tal capacidade deve-se principalmente a seu arranjo espacial adquirido durante o processo de síntese e enovelamento (Nelson *et al.*, 2006). Toda informação necessária para que a proteína nascente atinja sua conformação correta está na própria sequência (estrutura primária) da proteína (Anfinsen *et al.*, 1954), a mesma interação intermolecular que leva uma dada proteína a assumir sua conformação nativa pode também levar tais proteínas a interagirem de modo desordenado, resultando em um processo de agregação que pode ocorrer durante sua síntese ou até mesmo durante o exercício de sua função (Dobson, 2003). O processo de agregação é, em geral, prejudicial à célula de tal forma que para evitá-lo a célula possui diversas proteínas especializadas em realizar um controle de qualidade celular (Dobson, 2003; Ramos e Ferreira, 2005; Hartl e Hayer-Hartl, 2009), dentro deste grupo de proteínas as chaperonas moleculares atuam não só para que proteínas nascentes atinjam o enovelamento correto, como também prevenção da agregação e encaminhamento de proteínas incorretamente enoveladas para a degradação, dentre outras funções (Borges e Ramos, 2005).

Uma vez que o processo de agregação ocorra, dois caminhos podem ser tomados, a fim de se impedir danos, um degradativo e não degradativo. O primeiro, conta com auxílio de sistemas proteases que vão, em suma, degradar a proteína incorretamente enovelada de modo a reciclar os aminoácidos que compunham o polipeptídeo (Sauer *et al.*, 2004), no entanto este caminho apresenta maior custo energético, tanto pela gasto na hidrólise da cadeia polipeptídica como no custo de sua síntese inicial. O segundo caminho possível é a recuperação das proteínas desses agregados através sistemas desagregases (Glover e Lindquist, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999). O mais importante dos sistemas desagregases, é composto pelas chaperonas do complexo Hsp100 (*heat-shock protein* de 104 kDa [do inglês: proteína de choque térmico]) em eucariotos e ClpB (peptidase caseinolítica B) em procariotos (Glover e Lindquist, 1998; Barends *et al.*, 2010). Junto com as chaperonas Hsp70 (DnaK) e Hsp40 (*J-proteins*), as Hsp100 atuam sob gasto de ATP na desagregação através do desenovelamento das proteínas agregadas, permitindo a posteriori seu reenovelamento à conformação nativa (Glover e Lindquist, 1998; Doyle e Wickner, 2009).

As Hsp100 clássicas estão ausentes no reino Metazoa, onde a função desagregase é realizada pelas Hsp70 em conjunto com as Hsp40 e Hsp110 (Diamant *et al.*, 2000; Shorter, 2011), o que as torna alvos potenciais para descoberta de compostos contra doenças infecciosas humanas como a leishmaniose e a malária para as quais a Hsp100 é essencial para manter a

virulência do parasito. Chaperonas moleculares desempenham papel tanto na transformação do parasito quanto na manutenção da homeostase celular sendo que dentre todas as chaperonas, a Hsp100 apresenta o maior aumento na quantidade proteica durante a diferenciação para a forma amastigota. Adicionalmente a ausência da Hsp100 faz com que a forma amastigota apresente significativa diminuição de sua capacidade infectiva por vezes não apresentando as feridas características de tal infecção (Krobitsch *et al.*, 1998; Krobitsch e Clos, 1999; Clos *et al.*, 2001).

1.1 A Hsp100

As Clp/Hsp100 são chaperonas pertencentes a superfamília AAA+ (ATPases Associadas com diversas Atividades celulares) que catalisam diferentes atividades sob gasto de ATP (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura e Wilkinson, 2001). As Clp/Hsp100 podem ser divididas em dois grupos de acordo com suas atividades:

- ClpA: a subfamília da ClpA, composta de ClpA, ClpC, ClpX e HsIU
Tal família atua em conjunto com proteases, tais como ClpP e HsIV promovendo a proteólise dos agregados;
- ClpB: Possuem capacidade desagregase, extraíndo e ressolubilizando proteínas de agregados atuando junto com as Hsp70/40

Tais proteínas possuem em sua estrutura no mínimo um módulo também denominado AAA+, onde se encontra o sítio de ligação ao ATP denominado NBD (*nucleotide binding domain*), sendo ele a força motriz de sua atividade (Maurizi e Xia, 2004), podendo possuir mais de um NBD. Adicionalmente, de acordo com a quantidade de NBDs que possuem, tais proteínas podem ser separadas em duas classes, conforme Figura 1.

Figura 1: Classificação das Clp/Hsp100 conforme função e organização dos domínios

Fonte: Autoria Própria

As ClpB/Hsp100 são pertencentes a classe I, possuindo dois módulos NBD, sendo NBD-1 mais próximo ao domínio N-terminal e NBD-2 mais próximo ao domínio C-terminal da cadeia polipeptídica. Outra característica típica das ClpB/Hsp100 é a presença do domínio

M (*middle domain*) que se apresenta como uma inserção entre NBD 1 e 2, formando uma região estendida de α hélice que se destaca do monômero como um “braço” ou “alavanca” como se pode observar na Figura 2.

Os dois NBDs são altamente conservados entre as proteínas pertencentes a classe AAA+ e apresentam contribuição para a atividade catalítica das ClpB/Hsp100 apresentando algumas funções distintas. Enquanto o NBD2 é essencial para a oligomerização, a ligação ao nucleotídeo no NBD1 estabiliza formação hexamérica. A atividade ATPase de tais proteínas depende de um mecanismo do qual participam ambos NBDs que se comunicam de maneira complexa (Mogk *et al.*, 2003).

Figura 2: Representação cartoon da estrutura cristalográfica da ClpB de *Thermus thermophilus* (código PDB 1QVR). O domínio N-terminal é mostrado em cinza, domínios NBD 1 e 2 em roxo e verde, respectivamente, o domínio M em amarelo e azul.

Fonte: Adaptado de (Barends *et al.*, 2010)

1.2 Estados Oligoméricos e Atividade da Hsp100

Grande parte das Hsp100 cristalizadas se apresentaram em oligômeros hexaméricos estáveis, embora menores populações de heptâmeros também tenham sido observadas (Grimaud *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2000). Tais oligômeros apresentam estruturas hexagonais planares onde cada monômero possui orientação praticamente idêntica ao redor de um túnel central formado por dois anéis hexaméricos compostos pelos domínios NBDs alinhados, conforme Figura 3.

Figura 3: Representação cartoon do hexâmero da estrutura cristalográfica da Hsp100/ClpB de *Thermus thermophilus* (código PDB 1QVR). Onde monômeros opostos são mostrados em azul, verde e vermelho.

Fonte: Autoria Própria

Tal estado oligomérico é essencial para que a Hsp100 exerça sua função. A Hsp100/ClpB recebe o agregado proteico do sistema chaperona Hsp70/40, puxando esse agregado pelo poro central, onde diversos *loops* contendo resíduos conservados de tirosina são movidos com energia fornecida através da hidrólise de ATP nos domínios NBD, fazendo que tais resíduos “puxem” os agregados através do poro promovendo seu desenovelamento, conforme Figura 4 (Mogk *et al.*, 2015), durante sua atividade, o sistema chaperona Hsp70/40 pode permanecer ligado a Hsp100 formando um complexo e estimulando a atividade da Hsp100. A cadeia polipeptídica desenovelada pode então ser entregue a chaperonas parceiras de modo a permitir seu reenovelamento correto.

Figura 4: Funcionamento da atividade desagregase da Hsp100

Fonte: Adaptado de (Doyle e Wickner, 2009)

Diversos fatores podem influenciar o estado oligomérico da Hsp100, observa-se na literatura que o aumento na concentração da proteína faz com que o equilíbrio tenda a formação do hexâmetro, assim como a presença de ATP. Na contramão, concentrações altas de sal, assim como presença de ADP foram observados como fatores que influenciam seu equilíbrio em direção à formação de monômeros (Zolkiewski *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000).

A função desagregase exercida por tal proteína na forma hexamérica representa um ganho, não só na economia de energia, como também velocidade e resposta frente ao processo de agregação, processos que são agravados frente ao estresse térmico como o enfrentado por parasitas protozoários durante o processo de transfecção.

1.3 A Leishmaniose

Causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, a leishmaniose atinge principalmente a população mais carente, principalmente em países subdesenvolvidos, chegando a somar mais de 2 milhões de novos casos anualmente e tendo 350 milhões de pessoas em áreas de risco de contrair a doença (Alvar *et al.*, 2012; Organization, 2016). A doença possui três formas de manifestação: a cutânea, caracterizada por lesões na pele, em que as feridas se acumulam principalmente em regiões descobertas do corpo; a mucocutânea: nesta forma as lesões atingem cartilagens e mucosas do corpo, muitas vezes na face, desfigurando o indivíduo acometido de forma permanente; e a forma visceral que acomete órgãos internos, sendo uma doença sistêmica. A visceral, dentre todas as formas, pode ser letal, e causa anualmente de 20 a 50 mil mortes. A doença é registrada em 98 países segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo que 6 países somam 90% dos novos casos e entre eles se encontra o Brasil. O protozoário *Leishmania braziliensis* possui um ciclo de vida digenético, apresentando sua forma flagelada (promastigota) quando no inseto vetor conhecido como mosquito palha, conforme Figura 5.

Figura 5: Ciclo de vida da *Leishmania braziliensis*

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

Quando o hospedeiro mamífero é picado, as células do sistema imune fagocitam o protozoário, o que acarreta sua mudança para a forma infectiva amastigota. Esta mudança é induzida por alterações ambientais de temperatura e pH. Neste ambiente, o estresse celular pode levar tanto proteínas nascentes quanto proteínas enoveladas ao enovelamento incorreto e processos de agregação (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Borges e Ramos, 2005; Mogk *et al.*, 2008; Saibil, 2013; Scior *et al.*, 2016).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos

2.1.1 Gerais

Obtenção e caracterização estrutural e funcional da rLbHsp100.

2.1.2 Específicos

- Produção e purificação da rLbHsp100;
- Avaliar as estruturas secundária e terciária da rLbHsp100;
 - Avaliar o efeito da presença de nucleotídeos sobre as estruturas secundária e terciária da proteína;
- Caracterizar a rLbHsp100 hidrodinamicamente e avaliar seu estado oligomérico;
 - Avaliar a influência da presença de nucleotídeos sobre o estado oligomérico da rLbHsp100;
- Obter um modelo estrutural em baixa resolução da rLbHsp100;
- Avaliar a funcionalidade da proteína;
- Caracterizar a interação da rLbHsp100 e determinar a afinidade por nucleotídeos adenosina;
- Avaliar a interação da rLbHsp100 com um possível inibidor.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Alinhamento

A proteína LbHsp100 foi alinhada com sua ortóloga ClpB de *Thermus thermophilus* com o auxílio do software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), para avaliação das regiões conservadas e similaridade.

2.2.2 Expressão e Purificação da rLbHsp100

A proteína LbHsp100 recombinante (rLbHsp100, possui 887 aminoácidos, incluindo a His-tag, 98 kDa e pI teórico de 6,99) foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) a partir do vetor pET28a::LbHsp100 com otimização para *E. coli*, obtido comercialmente (Epoch Life Sciences, USA). As células foram cultivadas em meio LB (*Lysogenic Broth*) em volumes de expressão

de 1 L, à 37 °C e 200 rpm contendo canamicina 30 µg mL⁻¹ até densidade ótica entre 0,6 e 0,8 (u.a.). Adicionou-se então IPTG para concentração final igual a 0,2 mmol L⁻¹ mantendo-se a temperatura a 30 °C por 4 horas. Coletou-se as células por centrifugação a 3000 × g por 10 min a 4 °C.

As células foram então ressuspendidas em tampão A (Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, pH 8,5, contendo NaCl 500 mmol L⁻¹, imidazol 20 mmol L⁻¹), com adição de lisozima 0,01 mg mL⁻¹ e 5 unidades de DNase incubando-se por 40 min, lisou-se em seguida por sonicação em banho de gelo por um total de 2 min em pulsos de 6 s e intervalos de 1 min entre pulsos. O lisado foi então centrifugado por 40 min para eliminar traços insolúveis da célula a 3000 × g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membranas celulósicas de 0,45 µm e purificado por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ utilizando-se a coluna HisTrap FF (GE Life Sciences) equilibrada com tampão A e eluídas em tampão B (Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, pH 8,5, NaCl 500 mmol L⁻¹, imidazol 500 mmol L⁻¹). Para se obter maior grau de pureza, um passo inicial de 15% de tampão B foi eluído até o equilíbrio. Por fim, as proteínas foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 pg 26/60 (GE Healthcare LifeSciences) em tampão C (Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, pH 8,5, NaCl 500 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹ e β-mercaptoetanol 1 mmol L⁻¹). A pureza foi confirmada por SDS-PAGE 8%, e a concentração da rLbHsp100 foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se o método de Edelhoch (Edelhoch, 1967). Todos os testes aqui descritos foram realizados com a proteína em tampão C. O qual também foi utilizado como controle negativo.

2.2.3 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular da proteína purificada foi obtido em um espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.), a proteína foi analisada em concentrações 2, 4 e 10 µmol L⁻¹ em cubeta com caminho ótico l de 0,02 cm. O espectro foi então convertido para molaridade residual elíptica ($[\theta]_{MRW}$), conforme Equação 1, e deconvoluído através do *software* Dichroweb[®] o qual forneceu a predição das percentagens relativas de estrutura secundária.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10 \cdot [c] \cdot l \cdot n} \quad \text{Equação 1}$$

onde $\theta_{(\lambda)}$ é a elipsidade, $[c]$ é a concentração da proteína em mol L⁻¹, l é o caminho ótico e n o número de resíduos de aminoácido da proteína, sendo que a rLbHsp100 possui $n = 887$.

A desnaturação térmica da rLbHsp100 nas mesmas concentrações foi monitorada por dicroísmo circular em 222 nm em cubeta com caminho ótico l de 0,1 cm, no intervalo de temperatura de 20 a 90 °C a uma taxa de 1 °C min⁻¹ tanto em ausência quanto em presença de

2 mmol L⁻¹ de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP). A partir dos pontos obtidos realizou-se ajuste sigmoidal de Boltzmann de onde se obteve a temperatura média de desnaturação (T_m).

2.2.4 Fluorescência Estática de Triptofano

Análise de fluorescência estática de triptofano foi realizada em um fluorímetro Hitachi F-4500 com excitação em 280 nm e 295 nm, coletando-se a emissão de 300 a 420 nm com passos de 0,2 nm, utilizando-se a rLbHsp100 em concentrações de 2, 4 e 10 µmol L⁻¹ tanto em presença quanto em ausência de 7,2 mol L⁻¹ de cloridrato de guanidina. Os espectros de emissão foram então analisados pelo comprimento de onda de máxima emissão (λ_{max}) e o centro de massa espectral (<λ>) conforme Equação 2, no intervalo de 310 a 420 nm,

$$< \lambda > = \frac{\sum \lambda_i \cdot F_i}{\sum F_i} \quad \text{Equação 2}$$

onde λ_i é o comprimento de onda e F_i é a fluorescência neste dado comprimento de onda.

2.2.5 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica

Para se avaliar as estruturas terciárias e quaternárias da rLbHsp100 realizou-se cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC) injetando-se diferentes concentrações da proteína em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), acoplada a um ÄKTA Pure (Ge Healthcare Life Sciences). Uma mistura de padrão de proteínas contendo Apoferritina (480 kDa – Rs 67 Å), γ-globulina (160 kDa – Rs 48 Å), BSA (67 kDa – Rs 36 Å), Ovalbumina (45 kDa – Rs 29 Å) e Anidrase Carbônica (29 kDa – Rs 24 Å) (Sigma–Aldrich) foi eluída para que se pudesse calcular os parâmetros hidrodinâmicos, assim como avaliar comparativamente a presença de estrutura quaternária.

Para avaliação da influência de nucleotídeo adenosina sobre o estado oligomérico da rLbHsp100, a proteína foi incubada por 30 minutos com Mg²⁺ 5 mmol L⁻¹ e nucleotídeo adenosina 5 mmol L⁻¹, realizando-se em seguida aSEC com tampão C também dopado com Mg²⁺ 5 mmol L⁻¹ e uma concentração mínima de 0,5 mmol L⁻¹ de nucleotídeo adenosina.

As constantes de dissociação aparentes do processo de oligomerização (K_{Dapp}) foram obtidas a partir de um ajuste de curva sigmoidal conforme Equação 3:

$$T = T_i - (T_i - T_f) \frac{[Pt]}{K_{Dapp} + [Pt]} \quad \text{Equação 3}$$

onde, T_i e T_f são os tempos de retenção inicial e final (pré e pós transição), e [Pt] a concentração de monômero injetada (Silva *et al.*, 2013).

2.2.6 Ultracentrifugação Analítica

Foram realizados experimentos de ultracentrifugação analítica (AUC) em modo velocidade de sedimentação em uma ultracentrífuga XL-A (Beckman) equipada com o rotor AN-60 Ti no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPq, Campinas – SP). As corridas foram realizadas a 20 °C em velocidades de 15000 e 20000 rpm sendo analisada a sedimentação em 238 nm. Utilizou-se o *software* Sedfit 14.7 operando em confiança 55%, condição necessária para separação dos picos correspondentes a diferentes espécies. A razão friccional (f/f_0) foi utilizada como parâmetro de regularização e os valores de s obtidos foram transformados para a condição padrão (a 20 °C em água) $s_{20,w}$ utilizando-se os valores de V_{bar} da rLbHsp100, viscosidade e densidade do tampão (0,741 cm³ g⁻¹, 0,01057 Poise e 1,0196 g cm⁻³ respectivamente) obtidos pelo *software* Sednterp.

Os experimentos de AUC aqui exibidos foram realizados pela Dr^a Fernanda Aparecida Heleno Batista, ex-pós-doutoranda e colaboradora do grupo. A análise dos dados foi realizada pelo autor deste trabalho.

2.2.7 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

Os experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas na linha SAXS1, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPq, Campinas-SP). Utilizando-se feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e distância detector-amostra de, 1000 mm. As amostras foram medidas em capilar com 1 mm de caminho óptico. Os padrões de espalhamento da rLbHsp100 a 1,29 mg mL⁻¹ foram coletados em presença e ausência de nucleotídeos ATP e ADP (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Mg²⁺ 5 mmol L⁻¹).

Através da aproximação de Guinier determinou-se o raio de giro (R_g) e estimou-se a massa molecular (MM) da proteína podendo-se, com isso, avaliar a monodispersividade do sistema (Fournet e Guinier, 1955; Barbosa *et al.*, 2013).

Para conversão dos dados para o espaço real e criação da $p(r)$ utilizou-se o *software* GNOM (Svergun, 1992), sendo a $p(r)$ utilizada pelo DAMMIN (Svergun, 1999) para construção de modelos *ab initio* dos quais se obteve a média através do *software* DAMAVER (Volkov e Svergun, 2003), obtendo-se o modelo final.

Os experimentos de SAXS foram realizados pelo Dr. Paulo Roberto das Dores da Silva, pós-doutorando do grupo, que também analisou os dados produzidos.

2.2.8 Microscopia eletrônica de Transmissão

No intuito de obter um modelo estrutural para a rLbHsp100 assim como avaliar a dispersividade e estado oligomérico da proteína frente a presença de nucleotídeos foram realizadas coletas de imagens com o uso de microscopia eletrônica de transmissão em modo de contraste negativo (*negative stain*).

O preparo das amostras foi feito com a rLbHsp100 em uma concentração igual a 0,5 mg mL⁻¹ (equivalente a 5 µmol L⁻¹) tanto em ausência quanto em presença dos nucleotídeos 5 mmol L⁻¹ de ATP e ADP (assim como Mg²⁺ 5 mmol L⁻¹). As amostras com nucleotídeos foram previamente incubadas por 30 min. Uma quantidade de 3 µL de cada amostra foram aplicadas em grades de carbono e mantendo-se o contato por 30 s para interação, em seguida foram feitas duas lavagens com tampão Hepes 10 mmol L⁻¹ (pH 7,5). Para recobrir a grade aplicou-se então 3 µL de acetato de uranila 2% também por 30 s, retirou-se o excesso e permitiu-se a secagem ao ar.

As imagens foram coletadas utilizando-se um microscópio Jeol JEM-2100 (localizado na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química) operando a 80 kV com defoco de -3 µm e magnificação de 80.000x.

Tais análises foram realizadas pelo Dr. Vitor Hugo Balasco Serrão, colaborador do grupo.

Adicionalmente, foram realizados testes com a rLbHsp100 para obtenção de um modelo em alta resolução através de criomicroscopia eletrônica (Cryo-EM) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia também localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNNano – CNPEM). A rLbHsp100 foi avaliada em diferentes concentrações, em presença e ausência dos nucleotídeos por *negative stain*, para se determinar a melhor condição para coleta por Cryo-EM, que também foi avaliada.

2.2.9 Atividade ATPásica

A atividade ATPásica da rLbHsp100 foi avaliada através da medida de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela hidrólise de ATP utilizando-se o kit colorimétrico PiColorLock Gold™ (Innova Biosciences). De maneira breve, o kit se baseia na reação do Pi livre com o corante verde de malaquita permitindo a medida colorimétrica, tal kit não permite a obtenção da curva cinética, sendo possível apenas a determinação do fosfato total liberado. O kit conta também com um estabilizador, adicionado após a fixação da cor, para evitar que qualquer liberação adicional de Pi após a adição do corante possa gerar erros na medida.

Para a reação e leitura utilizou-se placa de 96 poços Greiner UV-Star® (Sigma) mantendo-se a proteína a uma concentração fixa de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Mg^{2+} 5 mmol L^{-1} , pipetou-se uma curva de concentração crescente de ATP e uma curva padrão para obtenção da medida de fosfato liberado. Incubou-se por 40 min a 37 °C sob agitação de 130 rpm, adicionando-se então o kit e realizando-se a leitura da absorbância à 590 nm em um leitor de placas multimodo Varioskan® LUX (Thermo Scientific). A quantidade de Pi liberada foi graficada como função da concentração de substrato (de 50 a 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATP) e obteve-se os parâmetros cinéticos da rLbHsp100 através do ajuste de uma curva de Hill (Equação 4) com o uso do software OriginPro® 2016.

$$v = V_{\text{máx}} \frac{[S]^n}{K_M^n + [S]^n} \quad \text{Equação 4}$$

onde v é a velocidade (taxa de fosfato liberado por minuto), $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato (ATP) e n é o coeficiente de Hill.

Para se garantir a equidade do resultado obtido, antes da realização do teste o estoque de ATP utilizado (Sigma-Aldrich) foi avaliado quanto a porcentagem de hidrólise, comparando-se uma curva concentração crescente com uma curva padrão fosfato. Utilizou-se apenas estoque de ATP cuja porcentagem de hidrólise não excedesse 0,5%.

Adicionalmente, como controle negativo, construiu-se curva concentração crescente de ATP nas mesmas condições e concentrações em ausência de enzima, esta curva foi pipetada em duplicata, convertida em concentração de fosfato e excluíram-se os pontos que não seguiram a tendência linear esperada. Dos restantes, calculou-se a média para cada concentração, que foi então subtraída da concentração de fosfato em cada ponto respectivo da curva cinética da enzima.

2.2.10 Supressão de Fluorescência

Avaliou-se a interação da rLbHsp100 com nucleotídeos adenosina ATP e ADP por supressão de fluorescência (*quenching*), utilizando-se a proteína em concentração fixa de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Mg^{2+} 5 mmol L^{-1} , pipetando-se uma curva crescente de ATP e ADP. Os ensaios foram realizados em placa Greiner MICROLON® (Sigma), e após incubação por 30 min a 25 °C e sob agitação (130 rpm), a fluorescência com excitação em 280 nm foi coletada na faixa de 305 a 420 nm. Para que se pudesse avaliar a natureza da interação (*quenching* estático ou dinâmico) o mesmo ensaio foi avaliado em temperaturas de 22 a 38 °C obtendo-se os gráficos de Stern-Volmer.

A fluorescência obtida foi corrigida de forma a minimizar o efeito de filtro interno segundo a Equação 5:

$$F_{\text{corrigida}} = F_{\text{observada}} \cdot e^{-2,303(\varepsilon_{\text{emissão}} l_{\text{emissão}} c + \varepsilon_{\text{excitação}} l_{\text{excitação}} c)} \quad \text{Equação 5}$$

onde $F_{\text{corrigida}}$ = fluorescência corrigida pelo efeito de filtro interno; $F_{\text{observada}}$ = fluorescência observada antes da correção; ε = coeficiente de extinção molar respectivamente nos comprimentos de onda de emissão e de excitação; l = passo ótico, de emissão e excitação respectivamente; c = concentração do composto em cada ponto observado.

A fluorescência corrigida foi então graficada contra a concentração de nucleotídeo de onde pode-se obter as constantes de dissociação aparentes (K_{Dapp}) através do *fitting* de uma curva de Hill com auxílio do *software* OriginPro®.

Aplicou-se então a Equação de Stern-Volmer (Equação 6) e graficou-se $\left(\frac{F_0}{F}\right)$ versus concentração do *quencher* (ligante) para se obter as curvas de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Equação 6}$$

onde, F_0 é a fluorescência na ausência do ligante, F é a fluorescência em dada concentração de ligante, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do ligante (*quencher*) analisado.

A suramina é um fármaco conhecido e já aprovado pela FDA (*US Food and Drug Administration*). Tal fármaco foi desenvolvido há mais de cem anos como um tratamento para a doença do sono e mais recentemente demonstrou ser um agente anticancerígeno eficaz (Babokhov *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2014). A suramina tem uma forte afinidade por uma variedade de proteínas e enzimas, sendo capaz de ligar-se ao sítio de ligação ao ATP (Stein, 1993; Morgan *et al.*, 2011).

Da mesma forma que os nucleotídeos, avaliou-se a interação da rLbHsp100 com a suramina, molécula que já se observou ser capaz de inibir proteínas da família das ClpB/Hsp100 (Torrente *et al.*, 2014).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Alinhamento

Foi realizado alinhamento da LbHsp100 com sua ortóloga ClpB, de *T. thermophilus*, exibido na Figura 6, resultando valores de 52% de identidade, destaca-se na figura os 3 triptofanos W8, W543 e W821 localizados nos domínios N-terminal, domínio M próximo ao

A rLbHsp100 recombinante foi expressa e purificada por dois passos cromatográficos, como descrito anteriormente (item 2.2.2). Avaliou-se a purificação por SDS-PAGE 8% (Figura 7) avaliando-se a imagem resultante com o auxílio do *software* ImageJ (National Institutes of Health), de onde se obteve grau de pureza de >95% na fração eluída da cromatografia de exclusão molecular preparativa. Na Figura 7 também pode-se observar a MM da rLbHsp100 de ~98 kDa. O rendimento para o processo de obtenção da rLbHsp100 recombinante foi considerado aceitável, cerca de 20 mg de proteína total, após a purificação, por litro de meio de cultura induzido.

Figura 7: SDS-PAGE 8% exibindo a expressão e purificação da rLbHsp100. Sendo Canaleta 1: padrão de MM, canaleta 2: células não induzidas, canaleta 3: fração solúvel das células induzidas, canaleta 4: fração eluída da cromatografia de afinidade, canaleta 5: fração eluída da cromatografia de exclusão molecular

Fonte: Autoria Própria

2.3.3 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

A espectropolarimetria de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar a presença de estrutura secundária. A Figura 8 A representa o espectro de CD que apresentou mínimos em 208 e 222 nm característicos de proteínas ricas em hélice α , indicativo de que a proteína foi obtida enovelada. A deconvolução dos espectros obtidos pelo Dichroweb[®] indicou que sua parte estruturada possui predominância de hélice α , conforme esperado. Os espectros também foram deconvoluídos com o software CDNN Deconvolution conforme a Tabela 1. As diferentes concentrações analisadas mostraram espectros ligeiramente mais intensos com o aumento da concentração da proteína. Tal mudança pode ser indício de uma maior organização associada ao processo de oligomerização. Em presença de nucleotídeos adenosina os espectros não apresentaram diferenças significativas.

A desnaturação térmica exibida na Figura 8 B, C e D por CD_{222nm} demonstrou que rLbHsp100 apresenta T_{ms} variáveis com a concentração de proteína e presença de nucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 1: Constituição da estrutura secundária da rLbHsp100 predito pelo Dichroweb® e CDNN Deconvolution

Estrutura	Quantidade (%)	
	DichroWeb	CDNN Deconvolution
Hélice α	36	41
Folha β	17	12
Volta β	*	18
<i>Random coil</i>	47	28
Total	100	99

* Não disponível no método utilizado

Fonte: Autoria Própria

Figura 8: Espectros de CD nas concentrações 2, 4 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, corrigidos para $[\theta]$, exibindo comportamento dependente de concentração. Paineis A, B, C e D exibem desnaturação térmica da proteína APO e em presença de 2 mmol L^{-1} de ATP e ADP respectivamente.

Fonte: Autoria própria

Tabela 2: Temperatura média de desnaturação obtida para a rLbHsp100 nas concentrações 2, 4 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nas condições APO e em presença de ATP ou ADP. Mostram que a proteína possui desenovelamento cooperativo e maior estabilidade em presença de nucleotídeos.

[rLbHsp100] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)		
	2,0	4,0	10,0
APO	51 ± 1	49 ± 1	47 ± 1
ATP	51 ± 1	51 ± 1	51 ± 1
ADP	53 ± 1	53 ± 1	53 ± 1

Fonte: Autoria Própria

Pode-se observar a partir dos painéis B, C e D da Figura 8 que a rLbHsp100 possui uma única transição em qualquer das condições avaliadas sendo variável a temperatura média onde tal transição ocorre. A proteína apresentou transições menos cooperativas em menores concentrações enquanto em maiores concentrações tais mudanças se apresentaram mais súbitas, havendo menor ΔT para que a pós transição seja alcançada, assim como em presença dos nucleotídeos, o que sugere que o desenovelamento é cooperativo e que assim como a concentração a presença de nucleotídeos altera o estado oligomérico da proteína de modo que os protômeros estejam mais próximos.

Tais T_m s são aparentes pois podem representar diferentes populações em diferentes graus de enovelamento, sendo o $\text{CD}_{222\text{nm}}$ observado a somatória do sinal de todas as espécies presentes concomitantemente.

A proteína APO apresentou T_m s menores com o aumento da concentração (51, 49 e 47 $^{\circ}\text{C}$), mostrando que em maiores concentrações há uma redução aparente da estabilidade térmica. Pode-se observar que o início da desnaturação para todas as concentrações analisadas se dá em torno de 45 $^{\circ}\text{C}$, havendo diferenças nos ΔT necessários para alcançar a pós transição, indicativo da cooperatividade do processo, como já indicado. A presença de nucleotídeos ATP e ADP, por sua vez, teve a capacidade de estabilizar a rLbHsp100 (T_m s de 51 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ e 53 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente), sendo que a maior estabilidade foi exibida em presença de ADP, diferentemente do observado na literatura como citado anteriormente.

2.3.4 Fluorescência Estática de Triptofano

A fluorescência estática de triptofano foi utilizada para demonstrar a presença de estrutura terciária local. A rLbHsp100 possui 3 triptofanos W8, W543 e W821 localizados nos domínios N-terminal, domínio M próximo ao segundo NBD, e C-terminal, também próximo ao segundo domínio NBD2, respectivamente. A Figura 9 exhibe os espectros obtidos para a

rLbHsp100 a 2, 4 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Diversos espectros foram obtidos para cada concentração e avaliados quanto ao $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$, cujos valores de média e desvios para cada condição estão exibidos na Tabela 3. Os espectros obtidos após excitação em 280 nm mostram contribuição das tirosinas indicando que este comprimento de onda de excitação pode não ser o mais indicado para algumas análises.

Figura 9: Espectros de fluorescência de obtidos para a rLbHsp100 com excitação em 280 e 295 nm nas concentrações 2, 4 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (painéis A, B e C respectivamente), linhas tracejatas mostram os espectros obtidos em presença de guanidina 7,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ D: $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle\lambda\rangle$.

Fonte: Autoria Própria

Tabela 3: Comprimentos de máxima emissão de fluorescência e centros de massa espectrais para a rLbHsp100 nas concentrações 2, 4 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com excitação em 280 e 295 nm

		[rLbHsp100] (μmol L ⁻¹)			
		λ _{Excitação} (nm)	2,0	4,0	10,0
λ _{máx}	280		347 ± 1	347 ± 1	345 ± 1
	295		345 ± 1	346 ± 1	348 ± 1
⟨λ⟩	280		354 ± 1	354 ± 1	354 ± 1
	295		357 ± 1	357 ± 1	356 ± 1

Fonte: Autoria Própria

A rLbHsp100 apresentou $\langle \lambda \rangle$ de 354 nm e $\lambda_{\text{máx}}$ de 347 nm (para excitação em 280 nm), indicativo de triptofanos parcialmente expostos ao solvente. Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle \lambda \rangle$ não foram significativamente alterados com a concentração da proteína.

Em condições desnaturantes (7,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de guanidina) a proteína apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ e $\langle \lambda \rangle$ deslocados para valores maiores (*redshift*), indicativos de que os triptofanos estão em ambiente mais expostos ao solvente e que, portanto, a proteína possui estrutura terciária local no ambiente de tais triptofanos.

2.3.5 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica

O estado oligomérico e estrutura terciária da rLbHsp100 foi analisado por cromatografia de exclusão molecular analítica. Proteínas da família da Hsp100 são conhecidas por formar oligômeros de maneira concentração dependente (Grimaud *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2000). As diferentes concentrações de rLbHsp100 injetadas na cromatografia apresentaram volumes de eluição reprodutíveis entre as replicatas experimentais, e o aumento da concentração das amostras apresentou menores de volumes de eluição. A presença de nucleotídeo foi capaz de influenciar a formação de estados oligoméricos de maior ordem. Adicionalmente a presença de nucleotídeos apresentou efeito estabilizador de tais estados, o que pode ser observado pela diminuição do ombro após o pico do cromatograma, conforme evidenciado no inserto da Figura 10.

Figura 10: Cromatografia de exclusão molecular analítica da rLbHsp100, evidenciando efeito concentração dependente. Inserto: cromatograma em presença de ATP exibindo a estabilização de estados oligoméricos de maior ordem, os volumes de eluição dos padrões de MM são evidenciados pelas setas tracejadas

Fonte: Autoria Própria

Os tempos de retenção obtidos tanto para proteína APO quanto em presença dos nucleotídeos adenosina foi graficado contra a concentração, obtendo-se curvas sigmóides (Figura 11).

Desde a elaboração do protocolo para purificação desta proteína, observou-se que há interação da mesma com a coluna de cromatografia de exclusão molecular (dados não exibidos), podendo em baixas concentrações de sal eluir em volumes maiores que o volume total de coluna. Este efeito de interação foi contornado pela elevação da concentração de NaCl (500 mmol L⁻¹) não impedindo a estimativa das constantes de dissociação globais aparentes, no entanto, mesmo uma pequena interação acarreta grande imprecisão no cálculo de parâmetros hidrodinâmicos via aSEC.

É importante ressaltar que durante a corrida cromatográfica as moléculas da proteína estão sendo separadas, de modo que a condição avaliada não está no equilíbrio entre as diferentes espécies existentes, as constantes de dissociação globais obtidas são por esse motivo

denominadas aparentes (K_{Dapp}) e foram obtidas através do ajuste de uma curva de Hill do processo global de oligomerização observado. Devido a tal separação, uma vez que parte das moléculas percorre caminhos mais extensos no interior da coluna, a retenção diferenciada faz com que haja uma diluição da amostra injetada durante a corrida, motivo pelo qual o volume eluído é superior ao injetado, este fator de 7 vezes (referente a coluna utilizada) foi aplicado para correção das K_{Dapp} obtidas (Richter *et al.*, 2001) expressas na Tabela 4.

Figura 11: Tempos de retenção versus concentração de rLbHsp100 obtidos por aSEC, evidenciando efeito concentração dependente e respectivos *fitting* de Hill para obtenção dos K_{Dapp}

Fonte: Autoria Própria

Tabela 4: Valores das constantes de dissociação aparentes (K_{Dapp}) obtidas por aSEC, indicam que a presença de nucleotídeo influencia o estado oligomérico da rLbHsp100

Condição	K_{Dapp} (nmol L ⁻¹)
APO	280 ± 20
ATP	80 ± 10
ADP	90 ± 30

Fonte: Autoria Própria

A K_{Dapp} para a proteína APO foi de $280 \pm 20 \text{ nmol L}^{-1}$, as constantes obtidas para proteína com ATP e ADP são menores o que indica que a presença de nucleotídeos é capaz de estabilizar a proteína em estados oligoméricos de maior ordem.

2.3.6 Ultracentrifugação Analítica

Após observação de que a rLbHsp100 se comporta como um equilíbrio de espécies em solução investigou-se este comportamento por AUC em ensaios de velocidade de sedimentação com intuito de se avaliar a quantidade de espécies e a proporção relativa de cada espécie. Como esperado a rLbHsp100 se apresentou como um sistema polidisperso em todas as concentrações e velocidades de sedimentação analisadas, tais curvas estão exibidas na Figura 12.

Observa-se a partir da Figura 12, que a rLbHsp100 se apresentou como um sistema polidisperso apresentando 3 espécies a 15000 rpm e 4 espécies a 20000 rpm, (E1, E2, E3 e E4) nomeadas por ordem crescente de $s_{20,w}$ apresentados.

Figura 12: Dados de velocidade de sedimentação para a rLbHsp100 (A, 15000 rpm e B 20000 rpm) evidenciando que a rLbHsp100 se comporta como um sistema polidisperso em solução composto majoritariamente de 3 e 4 espécies, respectivamente, em cada velocidade analisada

Fonte: Autoria Própria

Durante o tratamento dos dados pode-se obter f/f_0 cujo valor é indicativo da forma da partícula em solução. No entanto o *software* encontra um único valor (única solução) para cada condição avaliada, e sendo o sistema polidisperso este valor obtido é composto das contribuições do valor de cada espécie e suas quantidades relativas tendo, portanto, se apresentado variável em cada condição analisada.

De maneira semelhante a MM estimada pelo programa Sedfit também depende da f/f_0 calculada, e novamente, sendo o sistema polidisperso os valores obtidos apresentaram variações

do esperado (múltiplos de 98 kDa), mesmo com tais desvios uma análise dos valores obtidos para cada espécie, sugere uma associação monômero-monômero para formação de um dímero, e associação de dímeros formando tetrameros e hexâmeros, como exibido na Figura 13, painel A, sendo que no ensaio realizado a 15000 rpm não se observou espécie dimérica (E2 ~200 kDa). Uma análise mais atenta da Figura 12, painel A evidencia que a 15000 rpm a E3 possui base alargada não havendo boa resolução do pico, sendo provável que ambas espécies dímero e tetramero (E2 e E3) estejam incluídas em E3, causa provável do grande erro da massa calculada para E3 (Figura 13, painel A). O erro exibido refere-se ao desvio da média das diferentes concentrações analisadas.

Tabela 5: Dependência dos valores de $s_{20,w}$ obtidos, com a concentração, nas diferentes condições analisadas

[rLbHsp100] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$s_{20,w}$ (S)							
	15000 RPM				20000 RPM			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
400	7,9	*	14,2	20,5	7,9	11,7	16,0	20,8
600	8,9	*	14,8	21,6	8,7	14,0	17,1	21,4
1000	9,8	*	17,2	22,7	8,4	13,1	17,7	22,4
1200	9,6	*	16,2	22,4	7,9	12,6	17,9	22,7

* Não observado

Fonte: Autoria Própria

A partir da dependência dos $s_{20,w}$ com a concentração (Tabela 5) obteve-se o $s_{20,w}^0$ de cada espécie exibidos na Figura 13 painel B, da qual o erro exibido refere-se ao ajuste.

Figura 13: Dados de AUC indicando polidispersidade e oligomerização concentração-dependente. A, MM obtida para cada espécie da rLbHsp100 em solução, B, dependência do coeficiente de sedimentação com a concentração, C, coeficiente de sedimentação de cada espécie observada, em condições padrão ($s_{20,w}^0$).

Fonte: Autoria Própria

Por fim, para se avaliar a distribuição relativa das espécies em função da concentração, elaborou-se a Figura 14.

Figura 14: Distribuição relativa das espécies com relação a concentração A 15000 rpm e B 20000 rpm

Fonte: Autoria Própria

Observa-se como tendência geral ao aumento da concentração que as espécies E1, E2 e E3 (de menor ordem oligomérica) se apresentam em menor proporção, enquanto E4 passa a ter maior proporção, tendo um aumento de cerca de 30% chegando a 70% da distribuição total nas maiores concentrações analisadas.

2.3.7 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Para se obter um modelo estrutural em baixa resolução, a rLbHsp100 foi analisada por SAXS. As curvas coletadas para a proteína a $1,29 \text{ mg mL}^{-1}$ ($12,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) nas diversas condições utilizadas estão exibidas na Figura 15, painel A, em B estão as regiões de Guinier das respectivas curvas, cuja linearidade indica que em todas as condições avaliadas a proteína se encontra monodispersa.

Utilizando a lei de Guinier a partir das curvas de espalhamento é possível obter alguns dados estruturais da partícula como R_g e MM, esses resultados estão exibidos na Tabela 6, que evidencia que em todas as condições analisadas a rLbHsp100 se encontrava, majoritariamente, na forma hexamérica. Como observado por aSEC (item 2.3.5), em concentrações a partir de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a rLbHsp100 encontra-se majoritariamente monodispersa em seu maior estado oligomérico (hexâmero), por AUC (item 2.3.6) observou-se que nesta concentração a população de hexâmero é de cerca de 70%. Sabendo-se que este processo depende tanto da

concentração proteica quanto da presença dos nucleotídeos (condição que também foi avaliada), esperava-se que na concentração utilizada a proteína se apresentasse majoritariamente hexamérica (> 70% da população) a ponto de que as outras espécies não influenciaram as curvas de espalhamento obtidas.

Com o uso do *software* GNOM gerou-se as $p(r)$ para as curvas exibidas no painel C da Figura 15.

Tabela 6: Dados obtidos pelas curvas de espalhamento e tratamento de SAXS evidenciando que a rLbHsp100 é um hexâmero em solução a $1,29 \text{ mg mL}^{-1}$

Condição	R_g (Å)	MM (g mol⁻¹)	D_{máx} (Å)
APO	81 ± 2	601 ± 30	320 ± 20
ATP	80 ± 2	643 ± 32	320 ± 20
ADP	79 ± 2	631 ± 32	320 ± 20

Fonte: Autoria Própria

Figura 15: A: Curvas de SAXS experimentais para a rLbHsp100 (símbolos aberto) com ajustes de GNOM (linha) em diferentes condições (APO, ATP e ADP), B: Região de Guinier e C: Curvas $p(r)$ obtidas para a rLbHsp100 nas condições analisadas.

Fonte: Autoria Própria

As curvas $p(r)$ obtidas não apresentaram grande diferenças de modo que um único modelo *ab initio* foi obtido com uso dos softwares DAMMIN e DAMAVER que está exibido na Figura 16.

Figura 16: Modelo *ab initio* gerado a partir das curvas de SAXS para a rLbHsp100 evidenciado o formato de hexâmero

Fonte: Autoria Própria

O modelo obtido está de acordo com o esperado para um hexâmero com grande semelhança ao observado para a ClpB (PDB 1QVR, exibido na Figura 3). Quanto a presença do poro central, deve-se destacar que o modelo gerado por SAXS reflete o comportamento da proteína como molécula flexível em solução, e que havendo mobilidade dos protômeros com relação ao poro esse comportamento se refletiria em uma visão fechada no modelo obtido.

2.3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Com objetivo de avaliar o estado oligomérico da rLbHsp100 assim como futuramente obter um modelo estrutural, a rLbHsp100 foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão, modo “*negative stain*”, a Figura 17 exhibe as imagens obtidas nas diferentes condições analisadas.

Figura 17: Micrografias eletrônicas da rLbHsp100 a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidas em microscópio Jeol 2100. A e B exibem a proteína em ausência de nucleotídeos, C, D e E em presença de ATP 5 mmol L^{-1} , F e G em presença de ADP 5 mmol L^{-1} . Setas vermelhas indicando os hexâmeros

Fonte: Autoria Própria

A partir da Figura 17, observa-se que a proteína APO (painéis A e B) apresentou diversos estados oligoméricos com tamanhos variando de 10 a 80 nm. Em presença de ATP (painéis C, D) encontra-se mais homogênea e majoritariamente em formas toróides (“*donut*”) como esperado para tal classe de proteínas (Grimaud *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2000) o painel E exibe uma visão mais afastada onde pode-se observar uma grande população de hexâmeros. Cabe mencionar que, apesar das limitações dos dados de SAXS, as imagens registradas por TEM-NS estão alinhadas com o modelo *ab initio* obtido. Por fim, em presença de ADP (painéis E e F) observou-se a presença de formas menores e polidispersas não maiores do que 20 nm.

Apesar de atestar a presença da proteína e sua forma toróide, as grades mostraram recobrimento muito grande, não sendo possível a obtenção de um modelo estrutural.

Adicionalmente, foram realizados testes com a rLbHsp100 para se determinar a possibilidade de obtenção de um modelo em alta resolução por Cryo-EM no LNNano, neste sentido diversas concentrações da proteína, assim como presença e ausência de nucleotídeos foram analisadas para se obter as condições ideais para coleta. A Figura 18 exibe imagens coletadas tanto por TEM-NS quanto por Cryo-EM em algumas das condições analisadas.

Pode-se observar na Figura 18 nos painéis A e B que os *grids* apresentaram menor recobrimento, como esperado devido as menores concentrações utilizadas ($0,065 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente). Os painéis C e D exibem as imagens dos *grids* de Cryo-EM. A partir de tais *grids* determinou-se que a melhor condição dentre as analisadas para coleta e construção de um modelo por Cryo-EM foi a utilizada no painel C, com a proteína a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em presença de ATP 5 mmol L^{-1} .

Figura 18: Micrografias eletrônicas da rLbHsp100 btidas em microscópio Jeol JEM 1400. A e B coletados em modo *negative stain* e, C e D Cryo-EM. A: exibe a proteína a $0,065 \text{ mg mL}^{-1}$ em presença de 5 mmol L^{-1} de ADP, B: a rLbHsp100 APO a $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$, C e D: em presença de ATP e ADP (5 mmol L^{-1}) respectivamente. Setas vermelhas indicando os hexâmeros

Fonte: Autoria Própria

2.3.9 Atividade ATPásica

Sabe-se que as ClpB/Hsp100 possuem atividade ATPase, acoplando a energia da hidrólise do ATP como um motor para realizar sua atividade desagregase (Sauer *et al.*, 2004; Mogk *et al.*, 2015). Com intuito de atestar a funcionalidade da rLbHsp100 assim como obter parâmetros enzimáticos da proteína realizou-se ensaio de atividade ATPásica conforme anteriormente descrito. Baseado nas análises anteriores de aSEC e SAXS, para se garantir que a proteína estava majoritariamente monodispersa utilizou-se concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A Figura 19 exibe o ajuste da curva de Hill da rLbHsp100, mostrando que a proteína foi obtida funcional.

Figura 19: Atividade ATPásica da rLbHsp100 e *fitting* de Hill, a proteína exibiu valores de $V_{\text{máx}} = 3,2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, $K_M = 230 \mu\text{mol L}^{-1}$, $K_{\text{cat}} = 0,32 \text{min}^{-1}$ e $n_{\text{Hill}} = 1,0$

Fonte: Autoria Própria

Pode-se observar que a rLbHsp100 possui $V_{\text{máx}}$ de $3,2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, K_M de $230 \mu\text{mol L}^{-1}$, similar a encontrada para suas ortólogas na literatura (Lum *et al.*, 2004; Schaupp *et al.*, 2007) e k_{cat} igual a $0,32 \text{min}^{-1}$. Uma busca na literatura demonstra que as ClpB/Hsp100 apresentam valores de K_M similares, porém com k_{cat} s muito variáveis (Barnett *et al.*, 2000; Lum *et al.*, 2004), variando desde $0,0083 \text{min}^{-1}$ (Krajewska *et al.*, 2017) até 37min^{-1} (Schaupp *et al.*, 2007). No entanto, vale ressaltar que todos experimentos utilizaram as proteínas em concentrações abaixo de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sem uma avaliação prévia do estado oligomérico. Como avaliado por AUC e aSEC, em baixa concentração proteica tais proteínas estão polidispersas em diferentes estados oligoméricos, havendo diferentes atividades catalíticas é esperado que haja discrepância dos valores encontrados.

A curva de Hill utilizada, permite avaliação do coeficiente de Hill (n), que descreve a cooperatividade. O valor obtido (1,0) indica não haver cooperatividade na atividade ATPásica

da proteína. Tal resultado era esperado uma vez que a concentração utilizada para o experimento garantia a proteína majoritariamente em seu estado hexamérico, não apresentando diferentes afinidades pelo ATP ou diferentes atividades devido a multiplicidade de estados, fatores que poderiam afetar o coeficiente de Hill para valores diferentes de 1,0.

2.3.10 Supressão de Fluorescência

Como descrito anteriormente, a rLbHsp100 possui 3 triptofanos W8, W543 e W821 localizados nos domínios N-terminal, domínio M próximo ao NBD2, e no C-terminal. Na Figura 20 é possível observar a localização do W543 e sua proximidade com o NBD2.

Figura 20: Representação *cartoon* da estrutura cristalográfica da ClpB de *Thermus thermophilus* (código PDB: 1QVR) evidenciando o W543 (conservado) e a distância em relação ao análogo não hidrolisável do ATP, Adenilil-imidodifosfato (AMP-PNP) ligado no sítio do NBD2.

Fonte: Autoria Própria

Observa-se que o W543 encontra-se próximo ao NBD2 sendo possível que sua fluorescência seja afetada pela mudança no ambiente quando da ligação dos nucleotídeos ao NBD2, trabalhos similares com a Hsp104 de levedura evidenciaram que triptofanos em posições próximas ao NBD2 são os mais suprimidos quando em presença de nucleotídeos (Lum *et al.*, 2004).

Em análises iniciais de fluorescência com a rLbHsp100 observou-se que a presença de nucleotídeos ATP e ADP causou supressão da mesma em comportamento semelhante ao

exibido na Figura 21, indicando a formação de um “dark complex” (Lakowicz, 2006). Então realizou-se experimentos de supressão de fluorescência para avaliar a afinidade da interação da rLbHsp100 com nucleotídeos adenosina (Silva *et al.*, 2013).

A Figura 21 exibe o perfil de fluorescência obtido em concentrações diferentes dos nucleotídeos ATP e ADP.

Figura 21: Fluorescência observada em diferentes concentrações dos nucleotídeos ATP e ADP nos painéis A e B respectivamente.

Fonte: Autoria Própria

A partir dos espectros obtidos na Figura 21, traçou-se os máximos de fluorescência versus concentração para cada nucleotídeo, corrigidos pelo efeito de filtro interno (Figura 22).

Figura 22: *Quenching* dos nucleotídeos ATP e ADP, A: máximo de fluorescência corrigidas sobrepostas por 100 unidades arbitrárias e *fitting* de Hill em diferentes temperaturas, B curvas de Stern-Volmer

Fonte: Autoria Própria

A partir da Figura 22 pode-se observar que os nucleotídeos apresentaram interações com a rLbHsp100, com K_{Dapp} de 430 ± 30 e $230 \pm 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ATP e ADP, respectivamente, e constantes de Hill iguais a 1,3. Tais valores foram praticamente invariáveis com a temperatura. A constante de Hill obtida indica a possível cooperatividade na ligação aos nucleotídeos, e as K_{Dapp} demonstram que a rLbHsp100 possui maior afinidade ao ADP do que por ATP. As curvas de Stern-Volmer também não demonstraram mudança significativa em função da temperatura.

Da mesma maneira, avaliou-se a interação da rLbHsp100 com a suramina por fluorescência. A Figura 23 exhibe o perfil de fluorescência observado em diferentes concentrações de suramina.

Figura 23: A, Fluorescência observada em diferentes concentrações de suramina, B ajuste sigmoidal da fluorescência em função da concentração de suramina.

Fonte: Autoria Própria

A partir dos espectros obtidos na Figura 23, traçou-se os máximos de fluorescência versus concentração de suramina, corrigidos pelo efeito de filtro interno. A partir do *fitting* de uma curva sigmoide obteve-se a constante de dissociação aparente K_{Dapp} de $15 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e coeficientes de Hill igual a 1,5 indicando que a ligação a suramina também pode ocorrer de modo cooperativo. Porém, experimentos de calorimetria de titulação isotérmica precisam ser executados para confirmar esta observação.

3 CONCLUSÕES

A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* cepa BL21(DE3), e purificada com grau de pureza aceitável (>95%) por dois passos cromatográficos.

A rLbHsp100 possui estrutura secundária, sendo predominantemente hélice α e sua desnaturação térmica mostra transições únicas sendo que a concentração proteica tem o efeito de diminuir a rampa necessária para desnaturação da proteína, o que implica em diminuição das T_m s observadas, enquanto a presença de nucleotídeos tem o efeito de aumentar a estabilidade térmica da rLbHsp100. O sinal de CD sofreu alterações devido a concentração da proteína demonstrando uma maior organização.

Os triptofanos da proteína se encontram parcialmente expostos ao solvente o que é evidenciado pelo $\lambda_{\text{máx}}$, indicando de que a rLbHsp100 foi obtida enovelada.

A aSEC mostrou que a rLbHsp100 sofre oligomerização concentração-dependente. A presença de nucleotídeos adenosina desloca o equilíbrio para a oligomerização indicando que eles estabilizam a forma oligomérica de maior estado da rLbHsp100.

Em solução, a rLbHsp100 se apresenta em equilíbrio com diferentes estados oligoméricos. Tais estados se associam provavelmente na forma de dímeros de maneira concentração dependente até a formação de um estado oligomérico final hexamérico, sendo que a partir de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ o hexâmero está majoritariamente presente ($\geq 70\%$).

A partir das curvas de SAXS observou-se que a rLbHsp100 se apresenta majoritariamente como hexâmero nas condições testadas, sendo possível obter o modelo *ab initio*.

As imagens de TEM-NS da rLbHsp100 revelaram o estado oligomérico e formato toróide de seu hexâmero.

A proteína foi obtida funcional, apresentando fraca atividade ATPásica.

A rLbHsp100 apresentou interação com nucleotídeos adenosina e com a suramina.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548> >.
- ANFINSEN, C. B. et al. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. **J Biol Chem**, v. 207, n. 1, p. 201-10, Mar 1954. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13152095> >.
- BABOKHOV, P. et al. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. **Pathog Glob Health**, v. 107, n. 5, p. 242-52, Jul 2013. ISSN 2047-7732. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23916333> >.
- BARBOSA, L. R. S. et al. Small-angle X-ray scattering applied to proteins in solution. **Proteins in Solution and at Interfaces. John Wiley & Sons, Inc**, p. 49-72, 2013.
- BARENDT, T. R.; WERBECK, N. D.; REINSTEIN, J. Disaggregases in 4 dimensions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 20, n. 1, p. 46-53, Feb 2010. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083401> >.
- BARNETT, M. E.; ZOLKIEWSKA, A.; ZOLKIEWSKI, M. Structure and activity of ClpB from Escherichia coli. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. **J Biol Chem**, v. 275, n. 48, p. 37565-71, Dec 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982797> >.
- BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 3, p. 257-61, Apr 2005. ISSN 0929-8665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777275> >.
- BORGES, S.; DÖPPLER, H. R.; STORZ, P. A combination treatment with DNA methyltransferase inhibitors and suramin decreases invasiveness of breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 144, n. 1, p. 79-91, Feb 2014. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510012> >.
- CLOS, J. et al. Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of Leishmania donovani. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, n. 1-2, p. 47-50, Nov 2001. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770109> >.
- DIAMANT, S. et al. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21107-13, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801805> >.
- DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 884-90, Dec 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685248> >.

DOYLE, S. M.; WICKNER, S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 1, p. 40-8, Jan 2009. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008106> >.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-54, Jul 1967. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6049437> >.

FOURNET, G.; GUINIER, A. Small angle scattering of X-rays. **Translated by Walker, CB and Yudowitch, KL In: New York: John Wiley & Sons**, p. 7-78, 1955.

GLOVER, J. R.; LINDQUIST, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. **Cell**, v. 94, n. 1, p. 73-82, Jul 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674429> >.

GOLOUBINOFF, P. et al. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 24, p. 13732-7, Nov 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570141> >.

GRIMAUD, R. et al. Enzymatic and structural similarities between the Escherichia coli ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12476-81, May 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575205> >.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, Mar 8 2002. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174299500028 >.

_____. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 6, p. 574-81, Jun 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491934> >.

KIM, K. I. et al. Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in Escherichia coli. **J Mol Biol**, v. 303, n. 5, p. 655-66, Nov 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11061966> >.

KRAJEWSKA, J. et al. Characterization of the molecular chaperone ClpB from the pathogenic spirochaete Leptospira interrogans. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181118, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28700685> >.

KROBITSCH, S. et al. Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. **J Biol Chem**, v. 273, n. 11, p. 6488-94, Mar 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497383> >.

KROBITSCH, S.; CLOS, J. A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. **Cell Stress Chaperones**, v. 4, n. 3, p. 191-8, Sep 1999. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547068> >.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third. New York: Springer, 2006. 954.

LUM, R. et al. Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. **J Biol Chem**, v. 279, n. 28, p. 29139-46, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128736> >.

MAURIZI, M. R.; XIA, D. Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. **Structure**, v. 12, n. 2, p. 175-83, Feb 2004. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962378> >.

MOGK, A. et al. Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 1, p. 120-5, Feb 2008. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208398> >.

MOGK, A.; KUMMER, E.; BUKAU, B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. **Front Mol Biosci**, v. 2, p. 22, 2015. ISSN 2296-889X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26042222> >.

MOGK, A. et al. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17615-24, May 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624113> >.

MORGAN, H. P. et al. The trypanocidal drug suramin and other trypan blue mimetics are inhibitors of pyruvate kinases and bind to the adenosine site. **J Biol Chem**, v. 286, n. 36, p. 31232-40, Sep 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733839> >.

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

NEUWALD, A. F. et al. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res**, v. 9, n. 1, p. 27-43, Jan 1999. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927482> >.

OGURA, T.; WILKINSON, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. **Genes Cells**, v. 6, n. 7, p. 575-97, Jul 2001. ISSN 1356-9597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473577> >.

ORGANIZATION, W. H. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, n. 22, 2016.

ORTEGA, J. et al. Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. **Mol Cell**, v. 6, n. 6, p. 1515-21, Dec 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163224> >.

RAMOS, C. H.; FERREIRA, S. T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 3, p. 213-22, Apr 2005. ISSN 0929-8665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777268> >.

RICHTER, K. et al. Coordinated ATP Hydrolysis by the Hsp90 Dimer. 2001-09-07 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/36/33689.short> >.

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

SAUER, R. T. et al. Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. **Cell**, v. 119, n. 1, p. 9-18, Oct 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454077> >.

SCHAUPP, A. et al. Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. **J Mol Biol**, v. 370, n. 4, p. 674-86, Jul 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543332> >.

SCIOR, A.; JUENEMANN, K.; KIRSTEIN, J. Cellular strategies to cope with protein aggregation. **Essays Biochem**, v. 60, n. 2, p. 153-161, Oct 2016. ISSN 1744-1358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744331> >.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The interaction networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania parasites. In: (Ed.). **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**: Springer New York, 2014.

SHORTER, J. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26319, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022600> >.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 1, p. 351-61, Jan 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910377> >.

STEIN, C. A. Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. **Cancer Res**, v. 53, n. 10 Suppl, p. 2239-48, May 1993. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8485709> >.

SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992-08-01 1992. ISSN 0021-8898.

_____. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys J**, v. 76, n. 6, p. 2879-86, Jun 1999. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354416> >.

TORRENTE, M. P.; CASTELLANO, L. M.; SHORTER, J. Suramin inhibits Hsp104 ATPase and disaggregase activity. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110115, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299406> >.

VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.**, v. 36, p. 860-864, 2003.

ZOLKIEWSKI, M. et al. Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from Escherichia coli. **Protein Sci**, v. 8, n. 9, p. 1899-903, Sep 1999. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493591> >.