

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química de São Carlos

Candidata: Msc. Noeli Soares Melo Da Silva

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Caracterização estrutural, funcional e  
estabilidade térmica das proteínas humanas  
HspA5 e HspA8: uma abordagem comparativa

São Carlos

2021

Noeli Soares Melo da Silva

Caracterização estrutural, funcional e  
térmica das proteínas humanas HspA5 e  
HspA8: uma abordagem comparativa

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos  
da Universidade de São Paulo para a obtenção do título  
de doutora 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

2021

“À minha mãe, Elienai Soares, quero dedicar cada título da minha vida, pois com sua simplicidade, humildade e honestidade aprendi a essência do viver. Ela sempre me incentivou a não desistir dizendo: “Estude, nunca vão tirar isso de você”. É uma mulher inspiradora que além de atuar como professora em sua profissão, dá aula como mestra na vida, sendo meu maior exemplo. Eu te amo mamãe!”

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, antes de tudo, agradeço por guiar meus passos e permitir a celebração dessa conquista.

À minha querida mãe, *Dona Nai*, agradeço pelo amor, apoio e amparo. Mãe eu te amo e a senhora é o motivo de eu ter conseguido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Júlio C. Borges*, por todo o suporte e incentivos, além dos conselhos e puxões de orelha, agradeço também por confiar a mim este trabalho e abrir as portas do laboratório para mim desde o mestrado. Obrigada Júlio pelos seis anos de orientação, certamente esse foi um tempo precioso e de muito aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*Capes*) pela concessão da minha bolsa de doutorado.

Ao Instituto de Química de São Carlos (*IQSC*), bem como à Universidade de São Paulo (*USP*), por toda a estrutura e suporte acadêmico dado para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado.

Agradeço ao Prof. Dr. *Carlos A. Montanari* por ceder o uso do calorímetro de varredura diferencial (DSC) para a realização de alguns experimentos apresentados neste trabalho.

À toda família do Grupo de Bioquímica e Biofísica de proteínas (*GBBP*) pela amizade e companheirismo e pelo apoio experimental e psicológico que me ofereceram.

Agradeço ao Dr. *Paulo R. Dores-Silva* por me doar os plasmídeos para a obtenção das proteínas aqui estudadas.

Agradeço a minha querida Irmã, *Naiara Soares*, por toda a amizade, cuidado, conselhos e suporte emocional durante esses quatro anos, eu te amo neguinha.

Agradeço aos meus queridos avós, *Damião e Hilda*, por todo amor, orações e conselhos destinados a mim nos momentos mais difíceis desse caminhar, vocês são os meus tesouros.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dra. *Fernanda Canduri* por aceitar me supervisionar durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), durante o qual pude aprender muito sobre a prática docente em Bioquímica.

Agradeço a todos os *professores e mestres* que me ensinaram e me incentivaram desde os tempos da escola a buscar a realização dos meus sonhos. Me lembro com muito carinho de cada um, e dou destaque para um nome: Prof. Dr. *Clóvis W. O. Souza*, o qual me mostrou o quão maravilhoso é ser cientista.

Finalizo agora uma etapa muito importante em minha vida, a fim de iniciar uma nova jornada, e a *todos* os que de alguma forma contribuíram para que esta etapa pudesse ser realizada, meus sinceros agradecimentos.

*“Agora, glória seja dada a Deus, que pelo seu grandioso poder operando em nós é capaz de fazer muito mais do que jamais ousaríamos pedir ou mesmo imaginar, infinitamente além de nossas mais altas orações, anseios, pensamentos ou esperanças”.*  
*(Bíblia Sagrada- Efésios 3.20)*

## RESUMO

As proteínas de choque térmico (Hsps) são componentes importantes do controle de qualidade proteico celular (PQC), atuando na síntese, enovelamento, transporte de proteínas e marcação de proteínas para degradação. O componente central no PQC é a família Hsp70, que consiste em chaperonas moleculares altamente conservadas, ubíquas e ATP-dependentes. Estas chaperonas podem assumir diferentes conformações que são reguladas por sua associação dinâmica com os nucleotídeos adenosina (ATP e ADP), bem como por sua interação com co-chaperonas e proteínas-clientes. Nos seres humanos existem várias proteínas Hsp70, sendo a maioria delas encontrada no citoplasma, enquanto outras são específicas de organelas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar estruturalmente e funcionalmente as proteínas Hsp70 humanas citossólica (HspA8) e do retículo endoplasmático (HspA5), por meio de metodologias similares. Para tal, as proteínas hHsp70 recombinantes foram expressas, purificadas e então caracterizadas quanto à estrutura, estabilidade e função por meio de testes biofísicos. Os resultados mostram que as proteínas HspA5 e HspA8 foram produzidas em suas formas enoveladas, com conteúdo de estrutura secundária majoritário em hélices- $\alpha$  e como monômeros levemente alongados em solução. Tais Hsp70 apresentaram estabilidades química e térmica similares, contudo foram observadas duas transições térmicas para a HspA5 e três para a HspA8, indicando diferenças estruturais que resultam em estabilidades térmicas distintas. A presença de nucleotídeos adenosina causou alterações nos conteúdos de estrutura secundária e terciária em ambas as proteínas, os quais também causaram a estabilização térmica das hHsp70. A presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  favoreceu a ligação das hHsp70 aos nucleotídeos ATP e ADP de formas distintas, e diferentemente da HspA5, a proteína HspA8 interagiu com o  $\text{Ca}^{2+}$  mesmo na ausência dos nucleotídeos. Um processo termodinamicamente regido por entalpia e entropia foi observado para a interação dos nucleotídeos adenosina com as proteínas HspA5 e HspA8. As hHsp70 apresentaram atividade ATPásica similar e relativamente baixa, contudo a afinidade da HspA5 pelo ATP foi maior do que a da HspA8. Adicionalmente, as proteínas HspA5 e HspA8 foram eficazes na prevenção da agregação de proteínas-clientes modelo, apresentando diferentes especificidades. Em suma os dados obtidos demonstram que, embora compartilhem 66% de identidade, as proteínas humanas HspA5 e HspA8 apresentam peculiaridades estruturais e funcionais, enriquecendo, portanto, o conhecimento acerca de tais macromoléculas.

Palavras-chave: Hsp70, Chaperonas moleculares, *Homo sapiens*, HSPA5, HSPA8.

## ABSTRACT

Heat shock proteins (Hsps) are important components of cell protein quality control (PQC), acting on protein synthesis, folding, traffic and degradation. The central component in the PQC is the Hsp70 family, which consists of highly conserved, ubiquitous and ATP-dependent molecular chaperones. These chaperones can assume different conformations that are regulated by their dynamic association with the adenosine nucleotides (ATP and ADP), as well as by their interaction with co-chaperones and client proteins. In humans there are several Hsp70 proteins, most of which are found in the cytoplasm, while others are specific for organelles. The objective of this work was to structurally and functionally characterize the cytosolic (HspA8) and endoplasmic reticulum (HspA5) human Hsp70 proteins, using similar methodologies. For this, the recombinant hHsp70 proteins were expressed, purified and then characterized for structure, stability and function by means of biophysical tests. The results show that the HspA5 and HspA8 proteins were produced in their folded form, with secondary structure content rich in  $\alpha$ -helices and as slightly elongated monomers in solution. Such Hsp70 showed similar chemical and thermal stability, however two thermal transitions ( $T_m$ ) were observed for HspA5 and three for HspA8, indicating structural differences that result in distinct thermal stability. Changes in secondary and tertiary structure were observed in the proteins under study in the presence of nucleotides, which also caused the thermal stabilization of hHsp70. The presence of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions favored the binding of hHsp70 to ATP and ADP nucleotides in different ways, and unlike HspA5, the HspA8 protein interacted with  $Ca^{2+}$  even in the absence of nucleotides. A process thermodynamically governed by enthalpy and entropy was observed for the interaction of the adenosine nucleotides with the HspA5 and HspA8 proteins. hHsp70 showed similar and relatively low ATP activity, however the affinity of HspA5 for ATP was higher than that of HspA8. Additionally, the HspA5 and HspA8 proteins were effective in preventing the aggregation of model client proteins, with different specificities. In summary, the data obtained demonstrate that, although they share 66% of identity, the human proteins HspA5 and HspA8 present structural and functional peculiarities, thus enriching the knowledge about such macromolecules.

Key-words: Hsp70, Molecular chaperones, *Homo sapiens*, HSPA5, HSPA8.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de estruturas proteicas das famílias de chaperonas moleculares Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60/Hsp10, <i>J-domain protein</i> e sHsp, disponíveis no <i>Protein Data Bank</i> .....	2
Figura 2. Diferentes funções das Hsp70 na manutenção da proteostase e na resposta ao estresse celular..	4
Figura 3. Arranjo estrutural das proteínas Hsp70 no estado ligado ao ADP e ATP.....	5
Figura 4. Ciclo Funcional das Hsp70 que acopla a ligação e hidrólise de ATP aos processos de ligação e liberação da proteína-cliente..	7
Figura 5. Hsp70 como pivô da proteostase celular..	8
Figura 6. Representação em <i>Cartoon</i> da Família de proteínas Hsp70 humanas, quanto à composição estrutural. ....	11
Figura 7. Estrutura molecular da HspA5 humana. ....	12
Figura 8. Representações moleculares do DLN da proteína HspA5 em seu estado Apo e Holo.....	13
Figura 9. Mecanismo do ciclo chaperona dependente de cálcio proposto para as proteínas BiP de metazoários. ....	13
Figura 10. Estruturas moleculares do DLN da proteína HspA8 e bHsc70. ....	20
Figura 11. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos e esquematização dos domínios das proteínas humanas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9..	33
Figura 12. Monitoramento da Expressão e purificação das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8. ....	36
Figura 13. Espectro de Dicroísmo circular das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 no UV distante e próximo. ....	37
Figura 14. Análise da estrutura primária da HspA5 e HspA8 com ênfase nos cromóforos para CD no UV próximo..	39
Figura 15. Espectros de Fluorescência intrínseca do triptofano das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença e ausência de ureia.....	40
Figura 16. Localização dos resíduos de triptofano presentes no domínio DLN das proteínas HspA5 e HspA8.....	41
Figura 17. Espectros de CD das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina..	43
Figura 18. Espectros de Fluorescência intrínseca do triptofano das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença dos nucleotídeos adenosina. ....	43
Figura 19. Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas HspA5 e HspA8. ....	45
Figura 20. Desenovelamento químico das proteínas HspA5 e HspA8 monitorados por CD <sub>222 nm</sub> e Fluorescência (excitação em 295 nm). ....	46
Figura 21. Desnaturação térmica das proteínas humanas HspA5 e HspA8 monitorada por CD (222 nm) e DSC.....	48
Figura 22. Curvas de desnaturação térmica das proteínas HspA5 e HspA8, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina, monitoradas por CD (222nm).....	49

Figura 23. Desnaturação térmica da proteína HspA5, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina e cofatores, monitorada por DSC.....	51
Figura 24. Desnaturação térmica da proteína HspA8, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina e cofatores, monitorada por DSC.....	52
Figura 25. Variação das transições térmicas das proteínas HspA5 e HspA8 monitoradas por CD (222 nm) e DSC na presença de ligantes..	54
Figura 26. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com MgADP.	55
Figura 27. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com MgATP.	57
Figura 28. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com CaADP..	58
Figura 29. Curvas de atividade enzimática das proteínas humanas HspA5 e HspA8..	61
Figura 30. Atividade chaperona das proteínas HspA5 e HspA8 sobre proteínas-modelo.	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes famílias de chaperonas moleculares e suas funções. ....	3
Tabela 2. Classificação da Família das Hsp70 humanas quanto ao nome, gene, localização subcelular, número de resíduos de aminoácidos e padrão de indução. ....	10
Tabela 3. Descrição da composição e finalidade de uso das soluções-tampão empregues nos procedimentos experimentais. ....	24
Tabela 4. Descrição das proteínas HspA5 e HspA8 quanto aos parâmetros físico-químicos: números de resíduos de aa totais e de aminoácidos específicos (W- triptofano, Y- tirosina, F- fenilalanina e C-cisteína), massa molecular (MM), ponto isoelétrico (pI) e coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ). ....	26
Tabela 5. Valores de identidade e similaridade entre as proteínas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9 e entre seus domínios DLN e DLP. ....	35
Tabela 6. Parâmetros de Fluorescência intrínseca do Triptofano obtidos para as proteínas humanas HspA5 e HspA8 na ausência e presença de ureia. ....	41
Tabela 7. Parâmetros de Fluorescência intrínseca do Triptofano obtidos para as proteínas HspA5 e HspA8 na ausência e presença dos nucleotídeos adenosina e $Mg^{2+}$ . ....	44
Tabela 8. Dados hidrodinâmicos das proteínas HspA5 e HspA8 obtidos por CEMA. ...	46
Tabela 9. Dados do desenovelamento químico das proteínas HspA5 e HspA8 acompanhado por $CD_{222\text{ nm}}$ e Fluorescência Intrínseca do triptofano (excitação em 295 nm). ....	47
Tabela 10. Dados do desenovelamento térmico das proteínas HspA5 e HspA8 monitorados por $CD_{222\text{ nm}}$ e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). ....	53
Tabela 11. Parâmetros experimentais obtidos por ITC para as proteínas HspA5 e HspA8 na presença dos nucleotídeos adenosina ATP e ADP. Os dados apresentados foram obtidos pela média de pelo menos 3 experimentos independentes a 20 °C. ....	60
Tabela 12. Parâmetros cinéticos da atividade ATPásica das proteínas HspA5 e HspA8 e comparação com outras proteínas Hsp70. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta G_{app}$ : energia livre de Gibbs aparente;  
 $\Delta H_{app}$ : entalpia aparente;  
 $\Delta S_{app}$ : entropia aparente;  
 $\Delta T_m$ : variação da Temperatura de transição do ponto médio;  
 $\epsilon$ : coeficiente de extinção molar;  
 $\lambda$ : comprimento de onda;  
 $\lambda_{max}$ : comprimento de onda máximo;  
 $\langle \lambda \rangle$ : centro de massa espectral;  
[ $\Theta$ ]: elipticidade molar residual;  
A: absorbância;  
AA: aminoácido;  
ADP: adenosina difosfato;  
ALS: do inglês *Amyotrophic lateral sclerosis*;  
Asp: aspartato;  
ATF6: do inglês *activating transcription fator 6*;  
ATP: adenosina trifosfato;  
Bag1: do inglês *Bcl-2-associated athanogene 1*;  
BiP: do inglês *Binding Immunoglobulin Protein*;  
BSA: do inglês *Bovine Serum Albumin*;  
C: concentração molar;  
CD: do inglês *Circular Dichroism*;  
CEMp: cromatografia de exclusão molecular preparativa;  
CEMa: cromatografia de exclusão molecular analítica;  
CHIP: do inglês *carboxy terminus of Hsc70 Interacting protein*;  
C<sub>m</sub>: concentração de transição do ponto médio;  
CS: citrato sintase;  
Cys: cisteína;  
C<sub>p</sub>: capacidade térmica;  
Da: dalton;  
DA: doença de Alzheimer;  
DH: doença de Huntington;

DLN: domínio de ligação a nucleotídeos;  
DLP: domínio de ligação a peptídeos;  
DN: doenças neurodegenerativas;  
DNA: do inglês *Deoxyribonucleic acid*;  
D.O.: densidade óptica;  
DP: doença de Parkinson;  
DSC: do inglês *differential scanning calorimetry*;  
EDTA: do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*;  
ECA-2: enzima conversora de angiotensina 2;  
*E. coli*: *Escherichia coli*;  
 $f/f_0$ : razão friccional;  
Far-UV: UV-distante;  
Fes1: do inglês *factor exchange for SSA1 protein*;  
Fi: intensidade de Fluorescência;  
FTN: fator de troca de nucleotídeo;  
GABA: ácido gama-aminobutírico;  
GBBP: Grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas  
Gdn-HCl: hidrocloreto de guanidina;  
Glu: glutamato;  
Grp78: do inglês *Glucose-regulated protein 78 kDa*;  
GrpE: do inglês *groP-like gene E*;  
Hip: do inglês *Hsp Interacting protein*;  
His-tag: cauda de polihistidina;  
HOP: do inglês *Hsp70-Hsp90 organizing protein*;  
Hsc70: do inglês *heat shock cognate 71-kDa protein*;  
HSP: do inglês *heat shock protein*;  
HSPA: do inglês *heat shock protein family A*;  
Hsp10: do inglês *heat shock protein 10-kDa*;  
Hsp60: do inglês *heat shock protein 60-kDa*;  
Hsp40: do inglês *heat shock protein 40-kDa*;  
Hsp70: do inglês *heat shock protein 70-kDa*;  
Hsp90: do inglês *heat shock protein 90-kDa*;  
Hsp100: do inglês *heat shock protein 100-kDa*;  
Hsp110: do inglês *heat shock protein 110-kDa*;

HspBP1: do inglês *Hsp70 Binding protein 1*;

Ile: isoleucine;

IPTG: do inglês isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside;

IRE1 $\alpha$ : do inglês *inositol-requiring protein 1 $\alpha$* ;

ITC: do inglês *Isothermal Titration calorimetry*;

kav: coeficiente de partição;

K<sub>A</sub>: constante de associação;

K<sub>D</sub>: constante de dissociação;

kDa: quilodalton;

K<sub>m</sub>: constante de Michaelis-Menten;

l: caminho óptico;

Lamp-2A: do inglês *lysosome-associated membrane protein-2A*;

*L. braziliensis*: *Leishmania braziliensis*;

LB: do inglês lysogeny broth;

Lys: lisina;

MDH: malato desidrogenase;

MERS-CoV: Síndrome respiratória do Oriente Médio;

miRNA: microRNA;

MM: massa molecular;

MM<sub>app</sub>: massa molecular aparente;

M: molar;

n: número de resíduos de aminoácidos;

NCBI: do inglês *National Center for Biotechnology Information*;

Near-UV: UV-próximo;

NK: do inglês *natural killer*;

PDB: do inglês *protein data bank*;

PDJ: proteína de domínio J;

*P.falciparum*: *Plasmodium falciparum*;

PERK: do inglês *protein kinase RNA-like ER*;

Pi: ortofosfato inorgânico;

pI: ponto isoelétrico;

Phe: fenilalanina;

PPA: proteína precursora de  $\beta$ -amiloide;

PQC: do inglês *protein quality control*;

RBD: do inglês *receptor binding domain*;

RE: retículo endoplasmático;

rpm: rotação por minuto;

$R_s$ : raio de Stokes;

$R_{Sph}$ : raio de uma esfera;

Ser: serina;

SARS-CoV-2: Síndrome respiratória aguda grave 2;

SDS: do inglês *dodecyl sulfate sodium*;

SDS-PAGE: do inglês *dodecyl sulfate sodium PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*;

sHsp: do inglês *small heat shock protein*;

SOD1: do inglês *cooper-zinc Superoxide dismutase 1*;

SUP: sistema ubiquitina-proteassoma;

Thr: treonina;

$T_m$ : temperatura media de desenovelamento;

Tom70: do inglês *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 70 kDa*;

TPR: do inglês *tetratricopeptide Repeat*;

Tris-HCl: tris-hidrocloreto;

Trp: triptofano

TRP-2: do inglês *tyrosinase-related protein-2*;

Tyr: tirosina;

U: unidade;

UPR: do inglês *unfolded protein response*;

USP: Universidade do estado de São Paulo;

UV: ultravioleta;

$V_0$ : volume da fase móvel;

$v_{bar}$ : volume parcial específico;

$V_e$ : volume de eluição;

$V_{max}$ : velocidade máxima;

$V_t$ : volume total;

$\Theta$ : elipticidade em graus;

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Chaperonas moleculares.....	1
1.2	Hsp70 .....	3
1.2.1	Composição estrutural e ciclo funcional das Hsp70.....	5
1.3	Hsp70 humanas.....	9
1.4	HspA5 .....	11
1.4.1	HspA5 e UPR.....	15
1.4.2	HspA5 como alvo terapêutico .....	16
1.5	HspA8 .....	19
1.5.1	HspA8 como alvo terapêutico .....	21
1.6	Problematização.....	23
2	DESENVOLVIMENTO .....	23
2.1	Objetivos .....	23
2.1.1	Gerais.....	23
2.1.2	Específicos.....	24
2.2	Material e métodos .....	24
2.2.1	Identificação das proteínas e análises de Bioinformática.....	24
2.2.2	Soluções-tampão .....	24
2.2.3	Expressão e purificação das proteínas HspA5 e HspA8 .....	25
2.2.4	Propriedades físico-químicas das proteínas.....	26
2.2.5	Quantificação das proteínas.....	27
2.2.6	Espectropolarimetria de dicroísmo circular.....	27
2.2.7	Espectroscopia de Fluorescência .....	28
2.2.8	Cromatografia de exclusão molecular analítica.....	29
2.2.9	Desenovelamento químico .....	29
2.2.10	Desenovelamento térmico .....	30
2.2.11	Calorimetria de titulação isotérmica .....	31
2.2.12	Atividade ATPásica.....	32
2.2.13	Atividade Chaperona .....	33

2.3	Resultados e Discussão .....	33
2.3.1	Análise da estrutura primária da HspA5 e HspA8 .....	33
2.3.2	Expressão e purificação da HspA5 e HspA8 .....	36
2.3.3	Caracterização da estrutura secundária e terciária.....	37
2.3.4	Investigação das modificações conformacionais causadas pelos nucleotídeos adenosina .....	42
2.3.5	Caracterização hidrodinâmica .....	44
2.3.6	Análise da estabilidade química e térmica da HspA5 e HspA8 .....	46
2.3.7	Investigação da estabilidade térmica das proteínas HspA5 e HspA8 frente aos nucleotídeos adenosina e cofatores metálicos .....	48
2.3.8	Análise termodinâmica das interações entre a HspA5 e HspA8 com os nucleotídeos ATP e ADP .....	55
2.3.9	Determinação da atividade ATPásica da HspA5 e HspA8 .....	61
2.3.10	Determinação da atividade chaperona da HspA5 e HspA8 .....	62
3	CONCLUSÕES .....	64
3.1	Conclusões específicas .....	65
4.	LISTA DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO DOUTORADO ..	66
4.1	Artigos científicos em preparação referentes ao doutorado.....	66
5.	REFERÊNCIAS.....	67

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Chaperonas moleculares

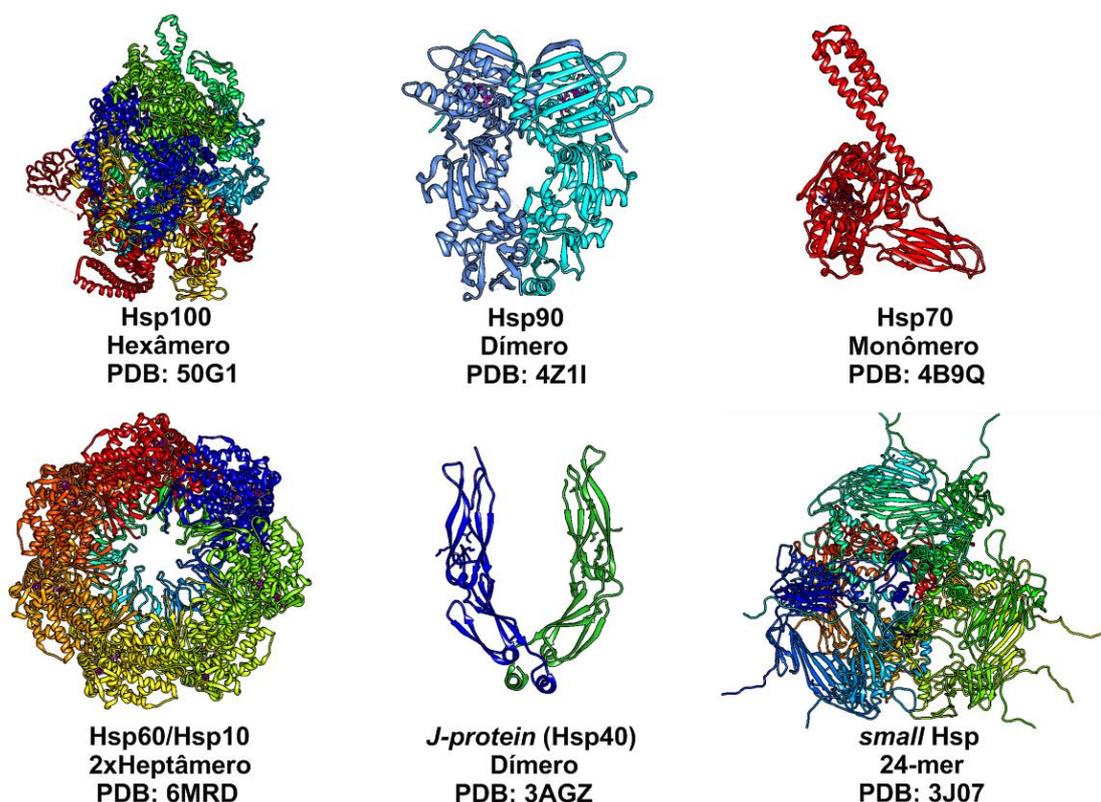
As proteínas são macromoléculas ubíquas, dinâmicas e que apresentam funções biológicas essenciais para todos os organismos vivos (BHATTARAI; EMERSON, 2020). Dentre as diversas funções fisiológicas as quais as proteínas executam se encontra a sinalização intra e extracelular, transporte, catálise enzimática, entre outras (ALHALMI; ALZOBALDI; ABDULRAHMAN, 2020). Para se tornarem funcionais, as proteínas devem alcançar sua estrutura nativa tridimensional por meio de um fenômeno conhecido como “enovelamento proteico” (BORGES; RAMOS, 2005), embora algumas, denominadas como proteínas intrinsecamente desenoveladas, sejam funcionais sem necessariamente apresentar uma estrutura 3D (LERMYTE, 2020).

No ambiente celular, existem diferentes fatores que podem comprometer o enovelamento correto ou até mesmo levar à formação de agregados proteicos, pode-se citar como exemplo a osmolaridade, temperatura, pH, etc (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). Estes agregados estão relacionados à fisiopatologia de doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Príon, entre outras (BAUER et al., 2010; HOU et al., 2020; PARK et al., 2017; VAN LEEUWEN; KAMPINGA, 2018). Por outro lado, um sistema conhecido como *Controle de Qualidade Proteico* (PQC, do inglês *Protein Quality Control*) foi selecionado pela evolução a fim de balancear os processos celulares de síntese, enovelamento e degradação de proteínas e manter a funcionalidade do proteoma (KAMPINGA; MAYER; MOGK, 2019; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011; VAN LEEUWEN; KAMPINGA, 2018).

No PQC, proteínas desenoveladas ou parcialmente enoveladas podem ser marcadas e enviadas para degradação celular ou reparadas com o auxílio das chaperonas moleculares (CIECHANOVER; KWON, 2017; KAMPINGA; MAYER; MOGK, 2019; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). As chaperonas moleculares e/ou proteínas de choque térmico (Hsp, do inglês *Heat shock proteins*) são macromoléculas altamente conservadas e expressas de forma constitutiva pelos sistemas de expressão celular sob condições de não-estresse e cuja expressão é aumentada em condições estressantes (KABAKOV et al., 2002; KUBOTA et al., 2010; RADONS, 2016; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). Tal sistema é constituído por seis principais famílias de proteínas, classificadas de acordo com suas massas moleculares- Hsp90, Hsp70, *J proteins*

(Hsp40), Hsp60/10, Hsp100 e sHsp (do inglês *small heat shock proteins*) – e que podem apresentar diferentes composições estruturais e estados oligoméricos (KAMPINGA et al., 2009). A Figura 1 e a Tabela 1 apresentam as principais famílias de chaperonas moleculares e descrevem algumas de suas características.

**Figura 1. Exemplos de estruturas proteicas das famílias de chaperonas moleculares Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60/Hsp10, J-domain protein e sHsp, disponíveis no Protein Data Bank.**



Fonte: Autoria própria.

As chaperonas são fundamentais para a proteostase celular, pois verificam o enovelamento proteico, estabilizam proteínas recém-sintetizadas, promovem o transporte de proteínas por membranas, impedem a agregação e marcam proteínas mal-enoveladas para a degradação, entre outros (BARRAL et al., 2004; BRODSKY; CHIOSIS, 2006; CHAKAFANA; ZININGA; SHONHAI, 2019; MOGK; BUKAU; KAMPINGA, 2018; ROSENZWEIG et al., 2015). A atuação destas macromoléculas ocorre via reconhecimento e ligação seletiva às superfícies hidrofóbicas de proteínas chamadas proteínas-clientes que se encontram desenoveladas, parcialmente enoveladas ou agregadas (ENGLISH et al., 2017; KOHLER; ANDRÉASSON, 2020; OROZ et al., 2017). Na maioria dos casos o complexo chaperona-cliente formado é direcionado pela ligação e hidrólise do nucleotídeo ATP, com exceção de chaperonas ATP-

independentes (MOKRY; ABRAHÃO; RAMOS, 2015; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014).

**Tabela 1. Diferentes famílias de chaperonas moleculares e suas funções.**

<b>Família</b>	<b>MM (kDa)</b>	<b>Fatores estruturais</b>	<b>Observações</b>
Hsp100 <sup>a,b</sup>	~100	Módulo AAA+ envolvido na ligação e hidrólise do ATP.	Solubilização e reativação de agregados proteicos, degradação de proteínas mal enoveladas.
Hsp90 <sup>c</sup>	~90	Homodímeros com domínio N-terminal de ligação ao ATP, domínio C-terminal envolvido na dimerização e ligação às co-chaperonas.	Regulação da proteostase celular durante as condições fisiológicas normais e sob estresse.
Hsp70 <sup>c</sup>	~70	Domínio N-terminal de ligação a nucleotídeo e domínio C-terminal de ligação ao peptídeo-substrato.	Enovelamento, translocação e degradação de proteínas, regulação de respostas ao estresse, prevenção de agregação proteica.
Hsp60/Hsp10 <sup>c</sup>	~60/~10	Estrutura de anel heptamérico duplo.	Enovelamento proteico e translocação em associação com outras chaperonas como Hsp70.
<i>J-domain proteins</i> (Hsp40) <sup>a</sup>	~10-90	Domínio-J N-terminal e domínio C-terminal capaz de interagir com proteínas-clientes.	Co-chaperonas da Hsp70 envolvida na formação do complexo e regulação da atividade ATPásica.
<i>Small Hsps</i> (sHsp) <sup>a</sup>	10-30	Domínio $\alpha$ -cristalino.	Prevenção da agregação de proteínas desenoveladas, manutenção da fluidez membranar, transdução de sinal celular.

<sup>a</sup>Holdase; <sup>b</sup>Desagregase; <sup>c</sup>Foldase.

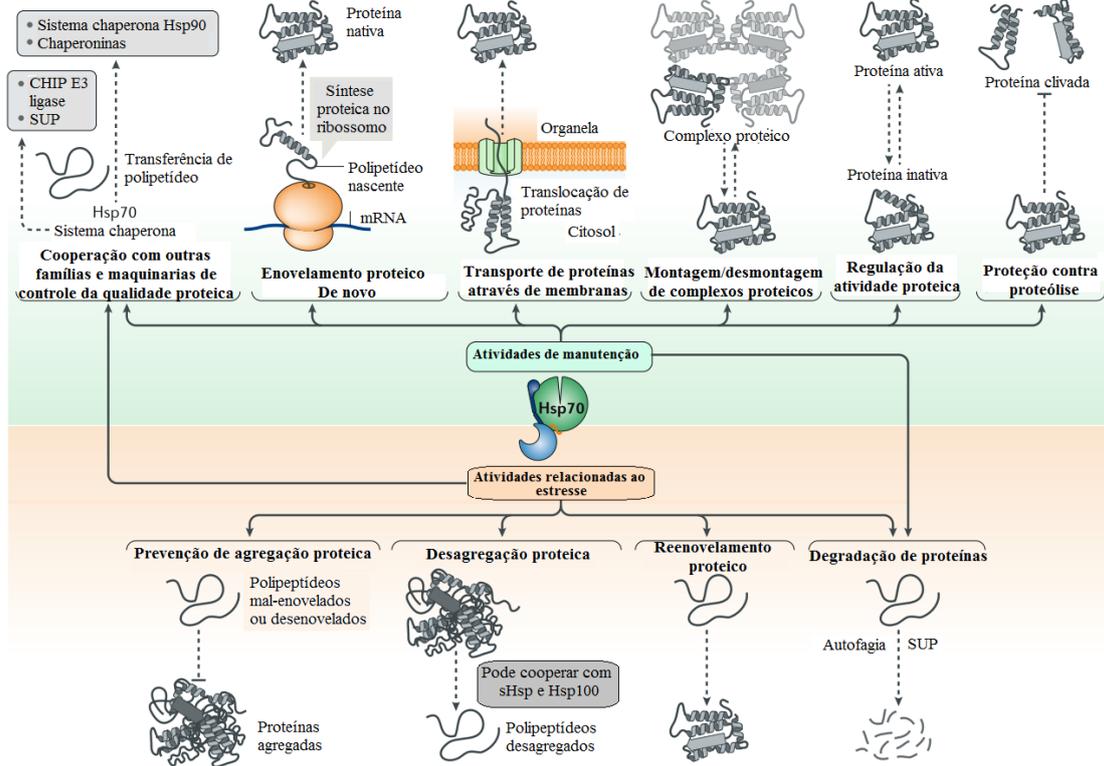
Fonte: Adaptado de (VALSALA et al., 2020) e (TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

## 1.2 Hsp70

Das chaperonas moleculares, a família de proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) desempenha um papel central no PQC (CIECHANOVER; KWON, 2017). As proteínas dessa família são macromoléculas ubíquas e ATP-dependentes (DORES-SILVA et al., 2015; POBRE; POET; HENDERSHOT, 2019; RADONS, 2016). Interessantemente, embora sejam consideradas como monômeros, há relatos na literatura que reportam a oligomerização das Hsp70 como um mecanismo de regulação funcional complexo e ainda pouco compreendido (KIRALY et al., 2020; MARCION et al., 2015; PREISSLER et al., 2020; STEEL et al., 2012; TAKAKUWA et al., 2019; TRCKA et al., 2019). Além disso, ainda que essas proteínas apresentem, estruturalmente, alto grau de conservação, elas diferem entre si pelo nível de expressão e localização subcelular (PAVITHRA; KUMAR; TATU, 2007; RADONS, 2016;

SHARMA, D., 2009) e apresentam características funcionais particulares (HAGEMAN; KAMPINGA, 2009; KAMPINGA et al., 2009; RADONS, 2016; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011). Assim como mostrado pela Figura 2, as Hsp70 atuam como reguladores metabólicos em todos os processos de homeostase proteica, tais como o enovelamento de cadeias nascentes de proteínas, importação de proteínas entre organelas, recuperação de proteínas agregadas, montagem de complexos proteicos, entre outros (KOHLENER; ANDRÉASSON, 2020; MAYER; GIERASCH, 2019; NACHMAN et al., 2020; RADONS, 2016). Supreendentemente, um estudo realizado por Calloni e colaboradores (CALLONI et al., 2012) mostrou que a proteína Hsp70 bacteriana (DnaK) interage com pelo menos 700 proteínas-clientes, dentre as quais ao menos 180 delas são propensas à agregação.

**Figura 2. Diferentes funções das Hsp70 na manutenção da proteostase e na resposta ao estresse celular.** As Hsp70 apresentam funções de manutenção da homeostase celular, dentre as quais estão o enovelamento proteico, transporte intermembranas, montagem e desmontagem de complexos proteicos, regulação da atividade de proteínas e transferência destas para a maquinaria da chaperona Hsp90 e chaperoninas. Ademais, as Hsp70 também participam na resposta ao estresse, prevenindo a agregação e solubilizando agregados proteicos, promovendo o reenovelamento de proteínas mal enoveladas, encaminhando proteínas para a degradação por autofagia ou pelo sistema ubiquitina-proteassoma (SUP).



Fonte: Adaptado de (ROSENZWEIG et al., 2019).

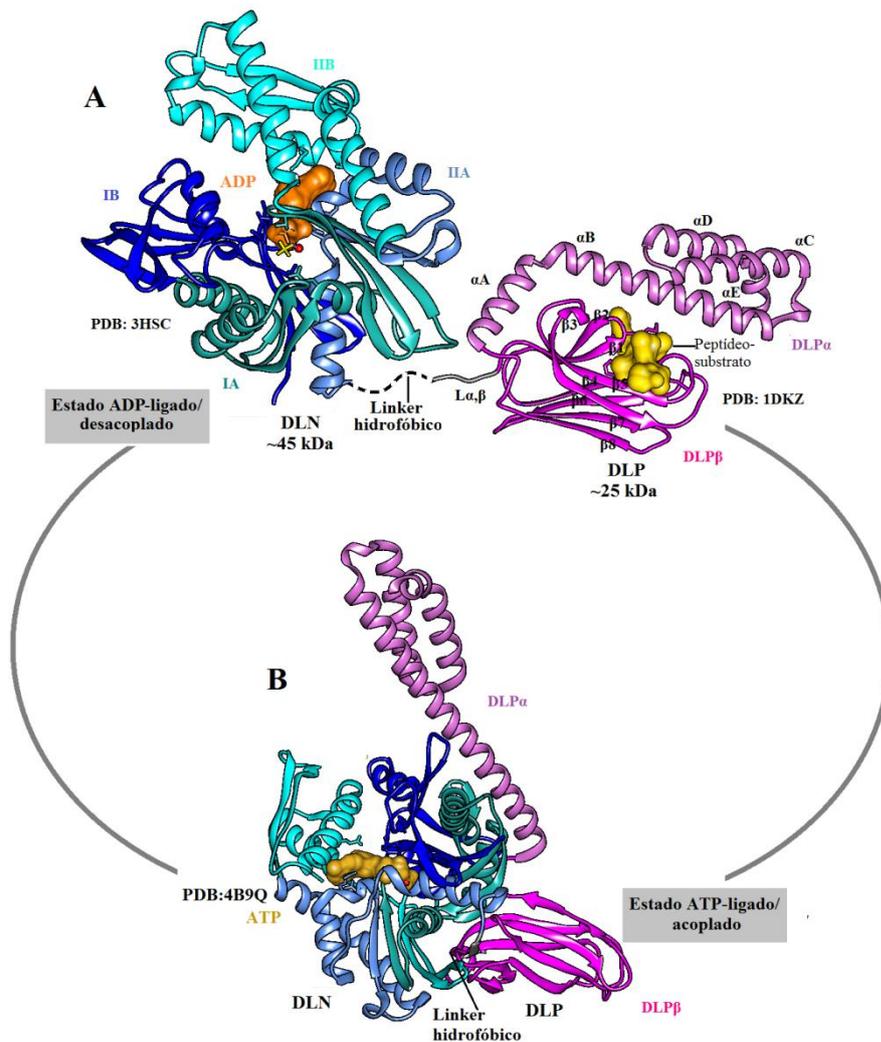
Diferentes estudos reportam que as proteínas Hsp70 são imprescindíveis para a viabilidade das células eucarióticas por apresentar funções citoprotetoras e atenuar a formação de agregados proteicos (BRODSKY; CHIOSIS, 2006; DEMYANENKO et

al., 2020; FULDA et al., 2010; MACARIO; CONWAY DE MACARIO, 2005; WESTERHEIDE; MORIMOTO, 2005). Além disso, tem sido visto que as Hsp70 podem auxiliar na adaptação e sobrevivência de diferentes tipos celulares por interagir com diferentes fatores de transcrição (incluindo a p53), atuando portanto na regulação celular (HAGEMAN et al., 2011; VOSTAKOLAEI et al., 2020; WALERYCH et al., 2009; ZYLICZ; KING; WAWRZYNOW, 2001). O envolvimento das Hsp70 em doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, Huntington e Alzheimer, também tem sido recorrentemente estudado, sendo que essa família de chaperonas vem sendo proposta como um potencial alvo terapêutico para tais patologias (CIECHANOVER; KWON, 2017; ELLIOTT; TSVETKOV; GINZBURG, 2007; ENOGIERU et al., 2019; LACKIE et al., 2018; NACHMAN et al., 2020; SÕTI et al., 2005; VAN LEEUWEN; KAMPINGA, 2018; WESTERHEIDE; MORIMOTO, 2005).

### 1.2.1 Composição estrutural e ciclo funcional das Hsp70

A maioria das proteínas Hsp70 é composta por um domínio N-terminal de ligação a nucleotídeos adenosina (DLN), um *linker* hidrofóbico e um domínio C-terminal de ligação às proteínas-clientes (DLP). O DLN, domínio de maior identidade entre os membros dessa família proteica, apresenta aproximadamente 45 kDa e pode ser dividido em quatro subdomínios, IA, IB, IIA e IIB, dispostos nos lóbulos I e II, como demonstrado na Figura 3A. Juntos, estes subdomínios constituem uma fenda profunda na qual se encontra o sítio catalítico em que o nucleotídeo ATP/ADP se liga e regula os movimentos dos lóbulos (ROSENZWEIG et al., 2019). Dentre os resíduos catalíticos conservados ao longo das espécies, pode-se citar Asp10 e Glu175 (subdomínio IA), Lys71 (subdomínio IB) e Asp199 e Thr204 (subdomínio IIA) (ARAKAWA et al., 2011). O *linker* é composto por uma sequência de aminoácidos altamente conservada (DLXLLDV, onde o X pode ser valina ou leucina) que conecta os dois domínios e apresenta um aspecto mais flexível quando o DLN está ligado ao ADP e mais estruturado quando o DLN está ligado ao ATP (ENGLISH et al., 2017; RADONS, 2016).

**Figura 3. Arranjo estrutural das proteínas Hsp70 no estado ligado ao ADP e ATP.** A) Representação estrutural dos subdomínios do DLN em lóbulos, IA, IIA, IB e IIB, presentes na estrutura da Hsc70 bovina no estado ADP-ligado (PDB: 3HSC) e dos subdomínios DLP $\alpha$  e DLP $\beta$ , em hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$  antiparalelas opostas conectadas por voltas L<sub>1,2</sub> a L<sub>7,8</sub>, respectivamente, presentes na estrutura da proteína DnaK no estado peptídeo-ligado (PDB: 1DKZ). B) Representação estrutural da DnaK no estado ATP-ligado (PDB ID: 4B9Q).



Fonte: Adaptado de (ENGLISH et al., 2017).

O DLP, domínio de menor identidade entre as proteínas Hsp70, apresenta aproximadamente 25 kDa e pode ser dividido em dois subdomínios: o DLP $\beta$  e o DLP $\alpha$  (Figura 3A). O DLP $\beta$  é formado por um sanduíche de folhas- $\beta$  antiparalelas opostas, conectadas por voltas L<sub>1,2</sub> a L<sub>7,8</sub>, que contém o sítio de ligação às proteínas-clientes e, o DLP $\alpha$  apresenta cinco hélices- $\alpha$ , que se fecham sobre as proteínas desenoveladas quando elas estão ligadas ao DLP $\beta$  (ENGLISH et al., 2017; KITZYK et al., 2015; RADONS, 2016). Estudos cristalográficos demonstram que um segmento peptídico mínimo de 7 aminoácidos é necessário para interagir com o sítio de ligação no DLP $\beta$  numa configuração distendida (ZHU et al., 1996). Adicionalmente, na extremidade do DLP $\alpha$  há um segmento C-terminal intrinsecamente desordenado, de aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, que tem sido reportado por aumentar a sobrevivência celular e a atividade chaperona das Hsp70 (SMOCK; BLACKBURN; GIERASCH, 2011). Além disso, proteínas Hsp70 citossólicas e nucleares apresentam ao fim deste

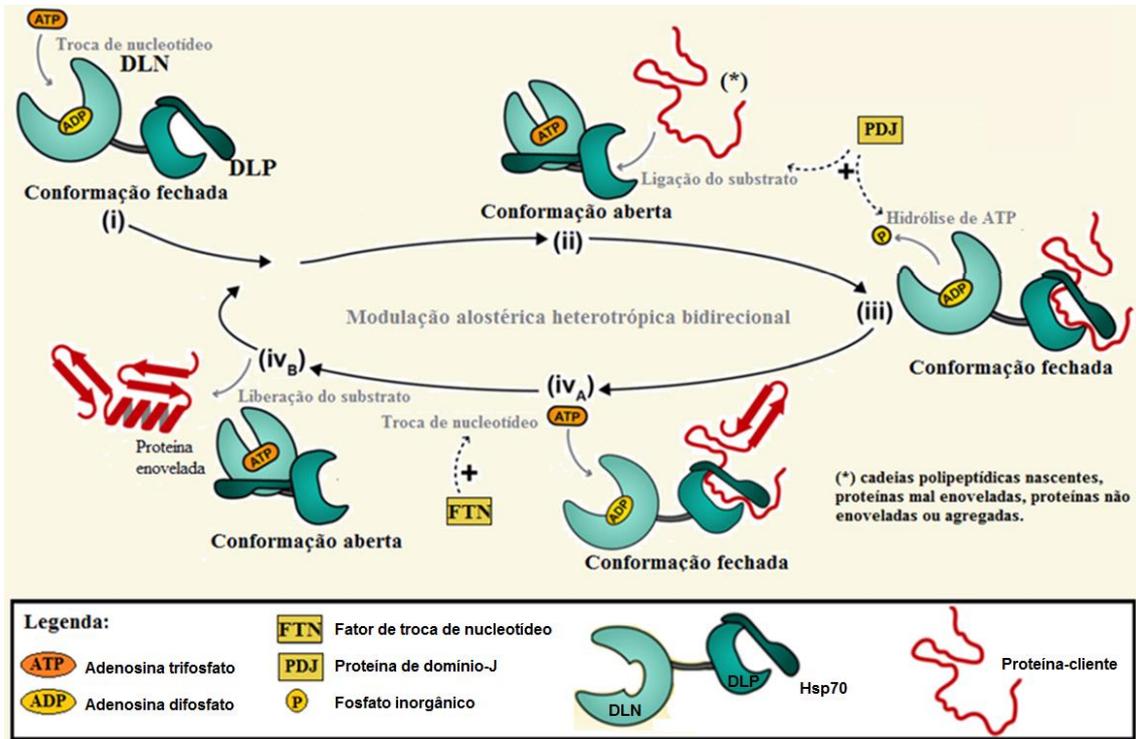
segmento um motivo EEVD envolvido na ligação destas à co-chaperonas que apresentam o motivo TPR (do inglês *Tetratricopeptide repeat*) (BATISTA et al., 2016).

As co-chaperonas são proteínas que podem auxiliar na regulação do ciclo funcional das Hsp70 de diversas formas, tais como na catálise da hidrólise de ATP (*J-domain proteins*), troca de nucleotídeos (Hsp110 – *Heat Shock protein 110 kDa*, HspBP1 – *Hsp70 Binding Protein 1*, GrpE – *grpE-like gene E* e Bag1 – *Bcl-2-associated athanogene 1*), estabilização do estado ADP-ligado (HIP – *Hsp Interacting protein*), conexão da Hsp70 ao sistema ubiquitina ligase (CHIP – *carboxy terminus of Hsc70 Interacting protein*) ou ao foldossoma (HOP – *Hsp70/Hsp90 Organizing Protein*), importação de pré-proteínas mitocondriais (Tom70 – *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 70 kDa*), entre outras (BATISTA et al., 2016; CAPLAN, 2003; DORES-SILVA et al., 2013).

Além de serem reguladas por co-chaperonas, as Hsp70 também são reguladas por um mecanismo conhecido como alosteria heterotrópica bidirecional (SILVA; BORGES, 2011). Neste mecanismo, a ligação dos nucleotídeos adenosina (ATP ou ADP) ao DLN das Hsp70 direciona seu ciclo e modula a afinidade com a qual o DLP liga a proteína-cliente (ROSENZWEIG et al., 2019). Resumidamente, o DLP tem maior afinidade pelas proteínas-clientes quando o nucleotídeo ADP está ligado ao DLN, apresentando, portanto, uma baixa taxa de liberação dessas. Por outro lado, o estado de menor afinidade do DLP pelas proteínas-clientes ocorre quando o ATP está ligado ao DLN e a taxa de liberação de clientes é alta (MAYER; BUKAU, 2005; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). A ligação de uma proteína-cliente no DLP atua como fator estimulante da atividade ATPásica do DLN favorecendo a hidrólise de ATP em ADP + Pi e, assim, convertendo o estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade pela proteína-cliente. Cabe destacar que o *linker* é fundamental para que esse mecanismo alostérico heterotrópico bidirecional ocorra e mutações nesta região comprometem a dinâmica molecular entre os domínios (ENGLISH et al., 2017). A Figura 4 apresenta o ciclo funcional alostérico das proteínas Hsp70.

**Figura 4. Ciclo Funcional das Hsp70 que acopla a ligação e hidrólise de ATP aos processos de ligação e liberação da proteína-cliente.** Inicialmente, a Hsp70 se encontra em uma conformação fechada em seu estado ADP-ligado (i), ocorre então a troca do nucleotídeo por ATP no DLN (domínio de ligação ao nucleotídeo) através do FTN (fator de troca de nucleotídeos), o que altera a conformação da chaperona para um estado de acoplamento estrutural interdomínios (ii). Em seguida a Hsp70 se liga ao substrato via

DLP (domínio de ligação ao peptídeo-substrato) e ocorre a hidrólise do ATP em ADP e Pi no DLN pela PDJ (proteína de domínio J), o que favorece o desacoplamento interdomínios e, conseqüentemente, a conformação da Hsp70 passa de aberta para fechada (iii). Neste momento ocorre maior afinidade entre o substrato-cliente e o DLP (iv<sub>A</sub>), e após a Hsp70 assistir ao enovelamento proteico do peptídeo o FTN troca o ADP por ATP, e a mesma retorna a uma conformação aberta que apresenta menor afinidade pelo peptídeo, resultando na liberação deste substrato (iv<sub>B</sub>).

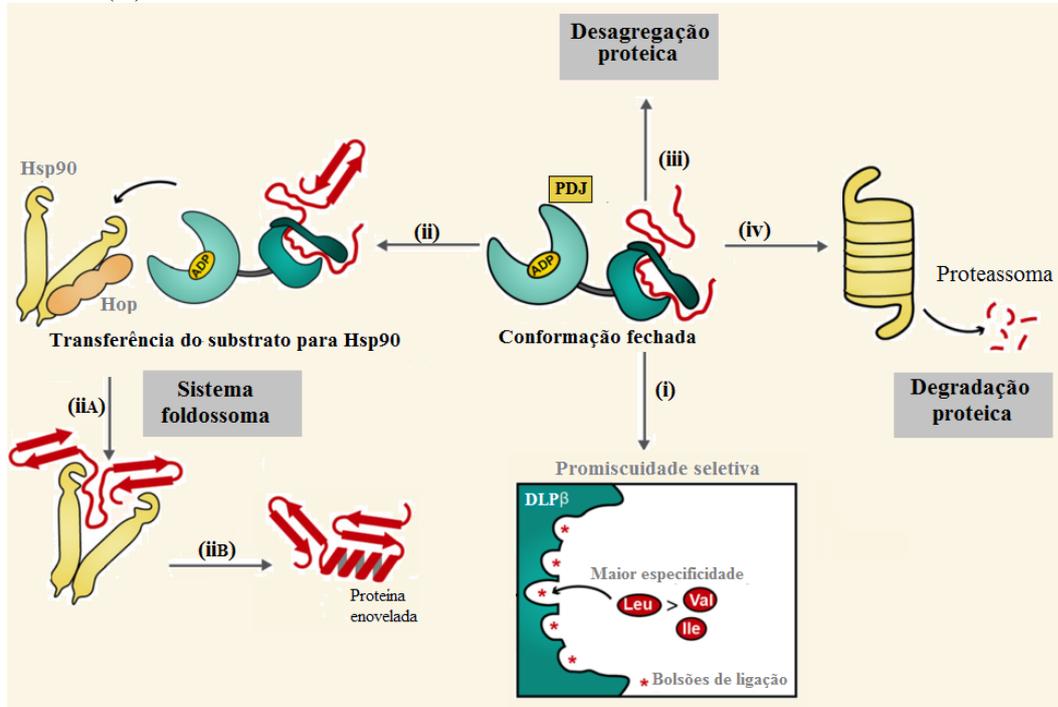


Fonte: Adaptado de (KOHLER; ANDRÉASSON, 2020).

Embora atue de forma independente, as Hsp70 também participam como pivô no PQC (Figura 5). Durante o estado ADP-ligado, o complexo Hsp70-cliente-*J-domain protein* formado pode se ligar à HOP e ser encaminhado à maquinaria da chaperona Hsp90 (sistema foldossoma) ou, ainda, a cliente ser marcada para a degradação via ubiquitinação por meio de co-chaperonas tais como CHIP, Bag1, Fes1e Sse1/2 que a direcionam para o sistema ubiquitina-proteassoma (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018; KOHLER; ANDRÉASSON, 2020; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). Ademais, a Hsp70 também é capaz de desagregar emaranhados proteicos, quando ativada por *J-domain proteins* e co-chaperonas Hsp110 (metazoários), ou mediar a desagregação proteica por meio do recrutamento da chaperona Hsp100 à superfície dos agregados proteicos (bactérias, fungos e plantas) (KOHLER; ANDRÉASSON, 2020; ROSENZWEIG et al., 2019).

**Figura 5. Hsp70 como pivô da proteostase celular.** A Hsp70 apresenta uma fenda de ligação do DLPβ composta por 5 bolsões de ligação cujos resíduos que melhor se encaixam em tais cavidades são leucina,

valina e isoleucina, o que resulta em uma promiscuidade seletiva para peptídeos-clientes (i). Tal promiscuidade, além de permitir que a Hsp70 interaja com uma vasta gama de substratos, possibilita que a mesma atue individualmente na assistência ao enovelamento proteico ou direcione tais substratos para o sistema foldossoma, transferindo-os para a Hsp90 com o auxílio das PDJ e HOP (ii). Ademais, a Hsp70 é capaz de recrutar a Hsp100 para promover a desagregação proteica e em conjunto com PDJs e Hsp110 específicas é capaz de ressolubilizar agregados proteicos (iii), além de encaminhar clientes para a degradação via sistema ubiquitina-proteassoma, por meio de co-chaperonas tais como CHIP, Bag1, Fes1 e Sse1/2 (iv).



Fonte: Adaptado de (KOHLER; ANDRÉASSON, 2020).

### 1.3 Hsp70 humanas

Em humanos, a família das Hsp70 é constituída por 13 produtos gênicos (Tabela 2 e Figura 6): 7 deles residem principalmente no citoplasma e nucleoplasma (HspA1A, HspA1B, HspA1L, HspA2, HspA6, HspA8 e HspA14), enquanto os demais estão localizados em compartimentos intracelulares, como mitocôndrias (HspA5 e HspA9) e retículo endoplasmático (RE) (HspA5 e HspA13), ou são endereçadas extracelularmente (HspA7, HspA12A e HspA12B) (HAGEMAN; KAMPINGA, 2009; KAMPINGA et al., 2009; RADONS, 2016; SUN et al., 2006). É importante mencionar que os membros proteicos a serem endereçados para compartimentos específicos apresentam na porção N-terminal uma sequência de endereçamento ou localização subcelular (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; RADONS, 2016). A Figura 6 e Tabela 2 também indicam as principais localizações subcelulares adicionais dos respectivos produtos gênicos das Hsp70 humanas, cujas alterações em termos de localização podem ocorrer em decorrência a condições de estresse ou estado degenerativo.

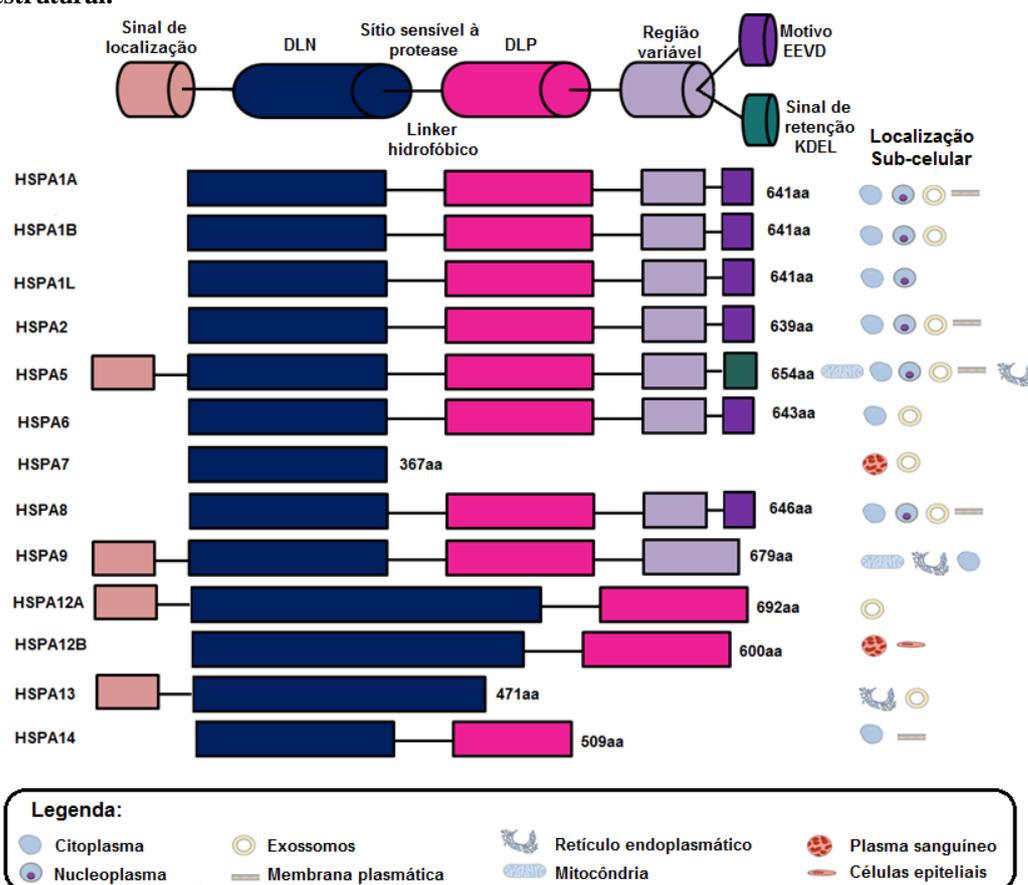
**Tabela 2. Classificação da Família das Hsp70 humanas quanto ao nome, gene, localização subcelular, número de resíduos de aminoácidos e padrão de indução.**

Proteína	Nomes alternativos	Gene/ ID	Localização subcelular	Nº AA	UniprotKB
HspA1A <sup>a</sup>	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	HSPA1A/ 3303	Citoplasma, nucleoplasma, membrana, exossomos extracelulares	641	P0DMV8
HspA1B <sup>a</sup>	Hsp70-2, Hsp70-1B	HSPA1B/ 3304	Citoplasma, nucleoplasma, exossomos extracelulares	641	P0DMV8
HspA1L <sup>b</sup>	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	HSPA1L/ 3305	Citoplasma, nucleoplasma	641	P34931
HspA2 <sup>b</sup>	<i>Heat shock 70kD protein 2</i> , Hsp70.2	HSPA2/ 3306	Citoplasma, nucleoplasma membrana, exossomos extracelulares	639	P54652
HspA5 <sup>b</sup>	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	HSPA5/ 3309	RE, Citoplasma, membrana, nucleoplasma, mitocôndria, Exossomos extracelulares	654	P11021
HspA6 <sup>a</sup>	Hsp70-6, Hsp70B'	HSPA6/ 3310	Citoplasma, exossomos extracelulares	643	P17066
HspA7 <sup>a</sup>	Hsp70-7, Hsp70B	HSPA7/ 3311	Micropartículas do sangue, exossomos extracelulares	367	P48741
HspA8 <sup>b</sup>	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	HSPA8/ 3312	Citoplasma, nucleoplasma membrana, exossomos extracelulares	646	P11142
HspA9 <sup>b</sup>	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalina	HSPA9/ 3313	Mitocôndria, RE, citoplasma	679	P38646
HspA12A <sup>b</sup>	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	HSPA12A/ 259217	Intracelular, exossomos extracelulares	675	O43301
HspA12B <sup>b</sup>	Hsp70-12B	HSPA12B/ 116835	Células Endoteliais, intracelular, plasma sanguíneo	685	B7ZLP2
HspA13 <sup>b</sup>	Hsp70-13	HSPA13/ 6782	RE, exossomos extracelulares, microsossomos	471	P48723
HspA14 <sup>a</sup>	Hsp70-14, Hsp70L1	HSPA14/ 51182	Citoplasma, membrana	509	Q0VDF9

<sup>a</sup> induzida por estresse; <sup>b</sup> não induzida por estresse.

Fonte: Adaptado de (RADONS, 2016) e (VOSTAKOLAEI et al., 2020).

Figura 6. Representação em *Cartoon* da Família de proteínas Hsp70 humanas, quanto à composição estrutural.



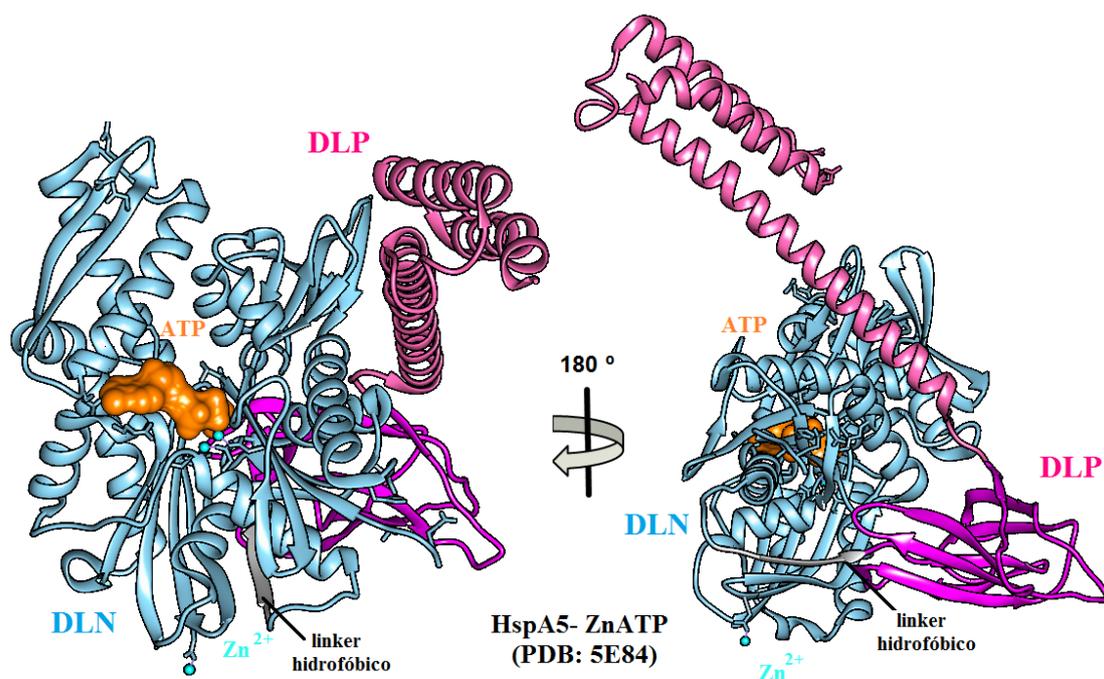
Fonte: Adaptado de (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007).

## 1.4 HspA5

A HspA5, também conhecida como BiP (do inglês *Binding immunoglobulin protein*) ou Grp78 (do inglês *78-kDa glucose regulated protein*), é uma proteína pertencente à família das Hsp70 humanas, sendo o membro mais abundante da família Hsp70 (CASAS, 2017; SHAH et al., 2017). A HspA5 é encontrada principalmente no RE (Tabela 2), mas também pode estar presente nas mitocôndrias, no citoplasma, no nucleoplasma, na superfície celular e em exossomos (IBRAHIM; ABDELMALEK; ELFIKY, 2019; SUN et al., 2006; TSAI; LEE, 2018; VOSTAKOLAEI et al., 2020). Assim como a maior parte das Hsp70 homólogas, a HspA5 é constituída pelos dois domínios estruturais canônicos, DLN e DLP (Figura 7). Ela também apresenta um peptídeo sinal de endereçamento ao RE no DLN e uma sequência de retenção KDEL presente no final do DLP (JIN; KOMITA; AOE, 2017). Assim, ao ser requerida no citoplasma ou em outro compartimento celular, a HspA5 pode ser secretada a partir do

RE e, posteriormente, retornar ao RE por meio de um complexo vesicular (JIN; KOMITA; AOE, 2017).

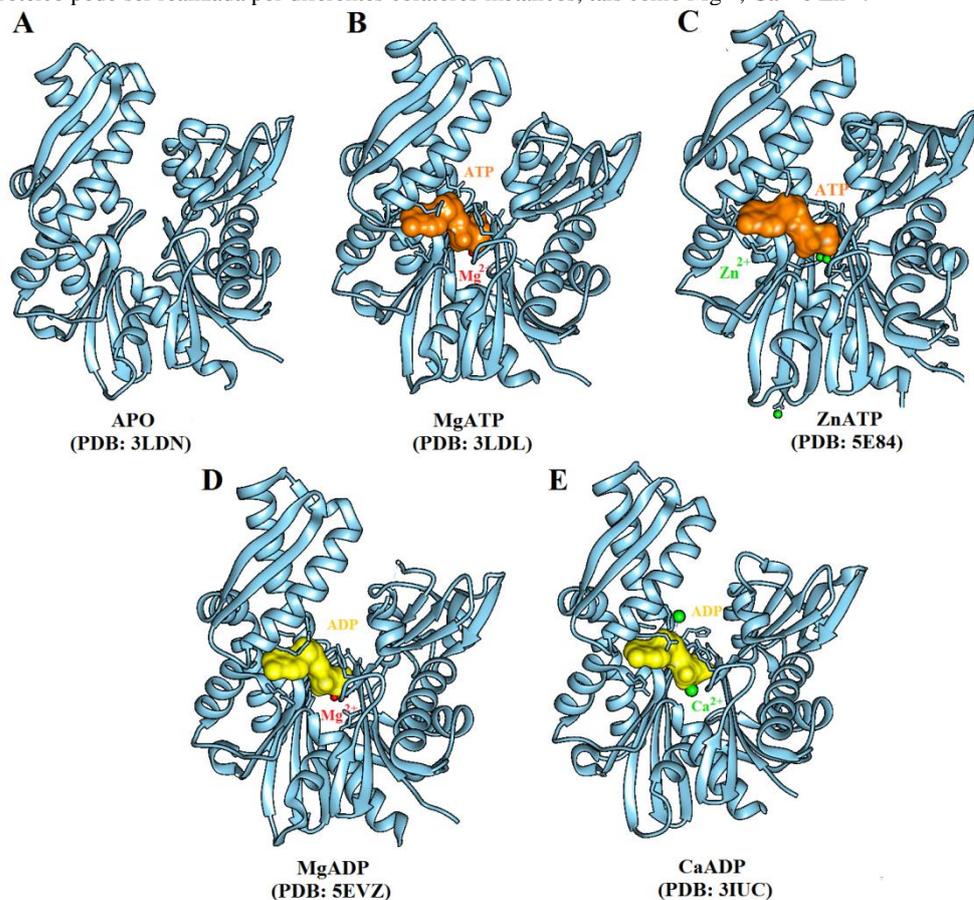
**Figura 7. Estrutura molecular da HspA5 humana.** Representação da organização molecular da proteína HspA5 no estado ATP-ligado (PDB: 5E84). A HspA5 apresenta a forma canônica das Hsp70, em que os dois domínios estruturais, DLN e DLP, são unidos por um *linker* hidrofóbico.



Fonte: Autoria própria.

Interessantemente, as estruturas moleculares depositadas no *Protein Data Bank* (códigos: 5EVZ, 3LDL, 3IUC e 5E84) demonstram que a HspA5 pode utilizar diferentes íons como cofatores na coordenação dos nucleotídeos adenosina, tais como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (Figura 7 e 8). Ademais, estudos com proteínas BiP de mamíferos mostraram que o íon  $Ca^{2+}$  além de atuar como cofator metálico é capaz de modular o ciclo funcional alostérico de proteínas Hsp70 do RE (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020; WISNIEWSKA et al., 2010). Foi verificado que a presença de  $Ca^{2+}$  aumenta a afinidade destas proteínas pelo ADP, ocasionando maior tempo de interação com a proteína-cliente (Figura 9) e, conseqüentemente, desaceleração do ciclo chaperona da BiP (PREISLER et al., 2020). É importante destacar que o  $Ca^{2+}$  não apenas afeta a dinâmica funcional da BiP de metazoários como também causa maior estabilidade térmica do DLN destas macromoléculas na presença de ADP (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020).

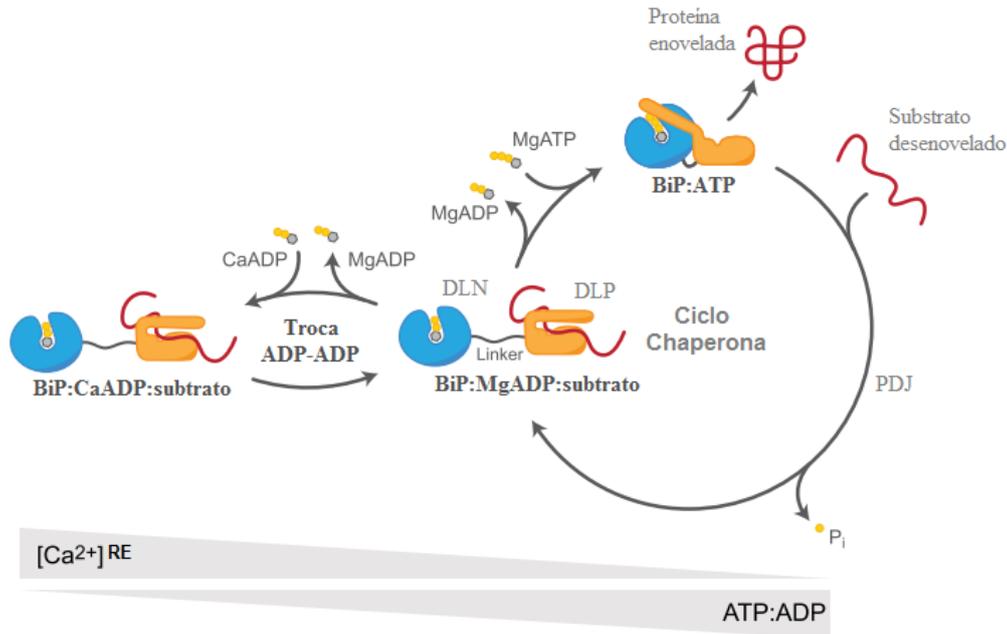
**Figura 8. Representações moleculares do DLN da proteína HspA5 em seu estado Apo e Holo.** Estruturas 3D do DLN da HspA5 na ausência (A) e presença dos nucleotídeos ATP (B e C) e ADP (D e E) se encontram depositadas no PDB (códigos: 3LDN, 3LDL, 5E84, 5EVZ e 3iIUC). A coordenação dos nucleotídeos adenosina por esse domínio proteico pode ser realizada por diferentes cofatores metálicos, tais como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ .



Fonte: Autoria própria.

A Figura 9 exemplifica o modelo proposto por Preissler e colaboradores (PREISLER et al., 2020) para o ciclo chaperona da BiP em que altas  $[Ca^{2+}]$  levam a um tempo maior de retenção da proteína-cliente por esta chaperona devido à estabilização do estado ADP-ligado. Por outro lado, baixas  $[Ca^{2+}]$  acarretam na aceleração da troca de ADP por ATP, favorecendo a liberação da proteína-cliente pela BiP. Curiosamente, foi visto que na presença de altos níveis desse íon a co-chaperona Grp170 estimulou pelo menos 4 vezes mais a liberação de ADP na BiP de hamster chinês, o que sugere a importância dos FTNs em acelerar a troca de ADP por ATP por essa chaperona em um ambiente repleto de  $Ca^{2+}$  (PREISLER et al., 2020).

**Figura 9. Mecanismo do ciclo chaperona dependente de cálcio proposto para as proteínas BiP de metazoários.** Assim como para outras Hsp70, o ciclo funcional da BiP é mediado pela modulação alostérica interdomínio, em que a troca de ATP por ADP no DLN aumenta afinidade do DLP pelo substrato. Além disso, enquanto a presença de altos níveis de  $Ca^{2+}$  no RE favorece a retenção do substrato pelo DLP devido a maior afinidade do DLN pelo ADP, baixos níveis do íon levam a uma troca mais rápida de ADP por ATP e, como consequência, acelera o ciclo funcional dessa chaperona.



Fonte: Adaptado de (PREISLER et al., 2020).

Além de participar diretamente da homeostase do Ca<sup>2+</sup> (DE OLIVEIRA et al., 2021; KANIA; PAJAK; ORZECOWSKI, 2015; WANG et al., 2017), a HspA5 atua no enovelamento de proteínas nascentes no lúmen do RE (IBRAHIM; ABDELMALEK; ELFIKY, 2019; RADONS, 2016); apresenta função celular anti-apoptótica (LUO; LEE, 2013; REDDY et al., 2003); é um receptor de membrana celular que regula diferentes vias de sinalização (LUO; LEE, 2013; SATO et al., 2010; TSAI; LEE, 2018); participa ativamente da resposta ao estresse celular (BOOTH et al., 2015; DEDIEGO et al., 2011); regula a resposta a proteínas não enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) (SUN et al., 2006; TSAI; LEE, 2018; WANG et al., 2009); entre outras funções (BAILLY; WARING, 2019; CHIARANTE et al., 2018; GE, 2019).

Com base em seus papéis celulares essenciais, a HspA5 tem sido amplamente estudada em diferentes doenças, tais como cânceres (BAILLY; WARING, 2019; RAUSCHERT et al., 2008; TSENG; ZHANG; LEE, 2019; VOSTAKOLAEI et al., 2020; ZHANG; ZHANG, 2010), doenças cardiovasculares (WANG et al., 2017), neurodegenerativas (KAWAGUCHI et al., 2020; LACKIE et al., 2018; PARK; YOO; KIM, 2014), metabólicas (WANG et al., 2017), imunológicas (PARK; YOO; KIM, 2014; RAUSCHERT et al., 2008) e virais (BOOTH et al., 2015; ELFIKY et al., 2020a; GONZALEZ-GRONOW et al., 2009; IBRAHIM M. IBRAHIM, DOAA H. ABDELMALEK, MOHAMMED E. ELSHAHAT, 2020; PATRICK REID et al., 2014).

### 1.4.1 HspA5 e UPR

O RE é uma organela essencial para as etapas iniciais de maturação proteica as quais são determinantes para a aquisição do correto enovelamento proteico pelas células eucarióticas. Ao menos 7 mil das 20 mil proteínas codificadas pelo genoma humano são direcionadas para o processo de maturação via RE, o que demonstra a essencialidade desta organela e dos processos proteicos aos quais a mesma está relacionada (HEGDE, 2020). Contudo, condições tais como a privação de glicose, mutações em genes estruturais, estresse oxidativo, desbalanço de  $Ca^{2+}$  e hipóxia podem desencadear o estresse do RE, acarretando acúmulo de proteínas não enoveladas (HERSEY; ZHANG, 2008). Tal acúmulo é capaz de ativar um complexo sistema de sensores de estresse conhecido como resposta à proteínas desenoveladas (UPR), no qual participam ativamente 3 proteínas principais: PERK (do inglês *protein kinase RNA-like ER*), ATF6 (do inglês *activating transcription factor 6*) e IRE1 $\alpha$  (do inglês *inositol-requiring protein 1 $\alpha$* ) (HETZ, 2012).

A UPR é capaz de gerar uma transdução de sinal direta entre o lúmen do RE com o citoplasma e núcleo celular (CASAS, 2017). Em condições de não estresse, as proteínas PERK, ATF6 e IRE1 $\alpha$  se encontram inativas devido à interação com a HspA5. No entanto, mediante condições estressantes, há o aumento de proteínas não enoveladas no lúmen do RE e, conseqüentemente, dissociação da HspA5 das proteínas relacionadas à UPR devido a sua maior afinidade por proteínas não enoveladas (HETZ, 2012; IBRAHIM; ABDELMALEK; ELFIKY, 2019; SUN et al., 2006). Ao se dissociarem da HspA5, as proteínas PERK, ATF6 e IRE1 $\alpha$  se tornam ativas e aptas em desencadear respostas ao estresse. Dentre as ações decorrentes da ativação destes sensores de estresse se encontra a regulação negativa da tradução e a ativação de transcrição de proteínas envolvidas no enovelamento e na degradação proteica, com o intuito de retornar à condição de homeostase do RE (HERSEY; ZHANG, 2008; HOOZEMANS et al., 2005; PARK et al., 2017). Falhas neste sistema podem comprometer a viabilidade da organela e levar a célula à apoptose (HETZ, 2012).

Nesse contexto, a HspA5 apresenta papel essencial na sinalização da UPR e no desencadeamento da mesma, sendo determinante em disparar as respostas celulares ao estresse (PARK et al., 2017; REDDY et al., 2003). Ademais, a HspA5 tem sido amplamente estudada como um potencial regulador da UPR, pois o estresse do RE pode comprometer processos celulares essenciais, tais como metabolismo de lipídeos,

diferenciação celular, imunidade inata e inflamação (HERSEY; ZHANG, 2008; HOOZEMANS et al., 2005; PARK et al., 2017).

## **1.4.2 HspA5 como alvo terapêutico**

### 1.4.2.1 Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (DN) são intrinsecamente associadas ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e/ou agregadas, ocasionado pela idade ou por disfunções/estresses celulares, dentre as quais pode-se citar como exemplo as doenças de Parkinson (DP) e de Alzheimer (DA) (CASAS, 2017). Diferentes estudos reportam que o nível de expressão e a localização da HspA5 são alterados em modelos de DP e DA (CASAS, 2017; HOLTZ; MALLEY, 2003; ZHANG et al., 2010). Esses distúrbios são caracterizados pela ativação da UPR, como resultado do estresse do RE e da expressão aumentada dessa chaperona (HOOZEMANS et al., 2012). Conseqüentemente, as vias de morte celular são ativadas envolvendo a sinalização recíproca entre o RE e mitocôndrias, os quais são fisicamente e funcionalmente conectados, levando a célula à apoptose (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004). Portanto, o estresse do RE é considerado um mediador comum da apoptose em DN. Interessantemente, há relatos na literatura que demonstram que a redução da expressão e ativação da HspA5 é dependente da idade e que em modelos de DN o RE sofre uma modificação estrutural (ERICKSON; DUNNING; HOLTZMAN, 2006; NUSS et al., 2008).

Estudos reportaram que o *knockdown* da HspA5 agrava a toxicidade da  $\alpha$ -sinucleína (ENOGIERU et al., 2019), a primeira proteína identificada como causadora da mutação que acarreta a DP. O silenciamento gênico dessa chaperona induzido por miRNA aumenta a morte celular induzida por uma neurotoxina-rotenona (SALGANIK et al., 2015). Ademais, em modelos de DP foi visto que a regulação positiva da HspA5 suprime a agregação de  $\alpha$ -sinucleína e a toxicidade de seus agregados proteicos por meio das vias de sinalização de estresse do RE (JIANG et al., 2016, 2014). Além disso, estudos demonstraram que diferentes compostos flavonoides que possuem ação celular neuroprotetora também regulam positivamente a ação da HspA5 em modelos experimentais de DP, sugerindo que essa chaperona está intrinsecamente relacionada ao desenvolvimento e regulação dessa patologia (ENOGIERU et al., 2019).

Trabalhos da literatura demonstram que a HspA5 pode se associar a proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (PPA), uma das proteínas que causam o início da DA, e

facilitar seu enovelamento correto, modulando sua maturação e processamento intracelular (KUDO et al., 2006; YANG; TURNER; GAUT, 1998). Ademais, estudos mostraram que quando comparado a casos-controle, os níveis de expressão da HspA5 são duas vezes maiores no córtex temporal e hipocampo de casos de DA que ainda estavam saudáveis e que não apresentavam tais emaranhados, sugerindo que a superexpressão da chaperona tem papel de retardar a neurodegeneração (HOOZEMANS et al., 2005).

Juntos, esses estudos demonstram que a regulação da HspA5 pode ser valiosa na identificação de novas opções de tratamento na DA e DP e que a perda funcional dessa chaperona pode ser um fator de predisposição para DN associadas à idade, tais como Parkinson e Alzheimer.

#### 1.4.2.2 Câncer

O termo câncer abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que tem como característica principal o crescimento desordenado, incontrolado e agressivo de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância e gerar a formação de tumores (INCA, 2020). As células cancerosas, bem como o microambiente tumoral, são marcadas por hipóxia, alteração do metabolismo de glicose e alteração do fluxo sanguíneo, o que pode ocasionar o estresse do RE e resultar na superexpressão da HspA5 (CASAS, 2017). Têm sido visto que em câncer de próstata, mama e melanoma, essa expressão anormal está correlacionada à resistência do tumor, maior risco de recorrência do câncer e uma redução na sobrevida do paciente (PFAFFENBACH; LEE, 2011).

Interessantemente, alguns estudos reportam que diferente das células normais, que raramente apresentam a HspA5 ancorada em sua superfície, as células tronco-cancerígenas, células cancerosas em proliferação e células endoteliais associadas a tumor apresentam a superexpressão dessa chaperona e sua translocação para a membrana plasmática (CONNER et al., 2020; FARSHBAF et al., 2020). Ademais, a presença da HspA5 na superfície celular permite que a mesma exerça funções de sinalização (CHEN et al., 2018; GE, 2019; GONZALEZ-GRONOW et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

Um estudo realizado por Tseng e colaboradores (TSENG; ZHANG; LEE, 2019), mostrou que uma região contendo três prolinas consecutivas (P<sub>640</sub>-P<sub>642</sub>) na porção C-terminal da HspA5 é essencial para a presença da chaperona na membrana plasmática.

Além disso, foi visto que mediante o *knockdown* da HspA5 e expressão do mutante deficiente em PPP-COOH ocorre a diminuição da viabilidade de células de câncer de mama resistentes à tamoxifeno, o que pode fornecer uma nova abordagem terapêutica para o tratamento desse tipo de câncer (TSENG; ZHANG; LEE, 2019).

Ademais, o papel da HspA5 em células metásticas, bem como suas funções na pluripotência e oncogênese, também tem sido estudado (FARSHBAF et al., 2020; RAUSCHERT et al., 2008). Embora existam muitas lacunas a serem preenchidas acerca de como essa chaperona atua no desenvolvimento e estabelecimento do câncer, os estudos realizados até o momento demonstram que a HspA5 é um alvo promissor para a terapia desta patologia e um potencial biomarcador para a mesma (CONNER et al., 2020; PASSARELLA et al., 2010).

#### 1.4.2.3 Covid-19

No final de 2019 teve início em Wuhan (China) a pandemia da Covid-19, comumente referida como coronavírus ou Síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov2) (HAYS, 2020). Em dois meses, essa doença se espalhou pelos seis continentes atingindo mais de 140 países, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia global (HAYS, 2020). O agente etiológico responsável pela Covid-19 é um vírus pertencente à família *Coronaviridae* que causa infecções respiratórias no homem e nos animais (HAYS, 2020; IBRAHIM et al., 2020). Atualmente, a Covid-19 tem sido considerada como uma doença sistêmica (INCIARDI et al., 2020), que pode causar desde febre, tosse, fadiga e pneumonia até a insuficiência respiratória progressiva, o que pode resultar na morte do indivíduo (ADHIKARI et al., 2020).

Desde que foi identificada, a Covid-19 já gerou milhares de óbitos e deixou sequelas nos sobreviventes (XIONG et al., 2021), além de um enorme prejuízo econômico, educacional e psicológico. Neste sentido, o vírus SARS-Cov2 tem sido amplamente estudado a fim de se obter fármacos que auxiliem no tratamento da doença e encontrar biomoléculas virais que sejam capazes de induzir resposta imunológica expressiva para o desenvolvimento da vacina (GRAHAM, 2020; HAYNES et al., 2020). Dentre essas biomoléculas se encontra a glicoproteína S, também conhecida como Spike, a qual é um fator de reconhecimento essencial para a fixação e entrada viral na célula hospedeira pois interage com receptores celulares, dos quais a HspA5 é candidata (HALL; MANTEEN, 2020; IBRAHIM et al., 2020) e a proteína ECA2

(enzima conversora de angiotensina-2) é o principal receptor identificado até o momento (PANG et al., 2020).

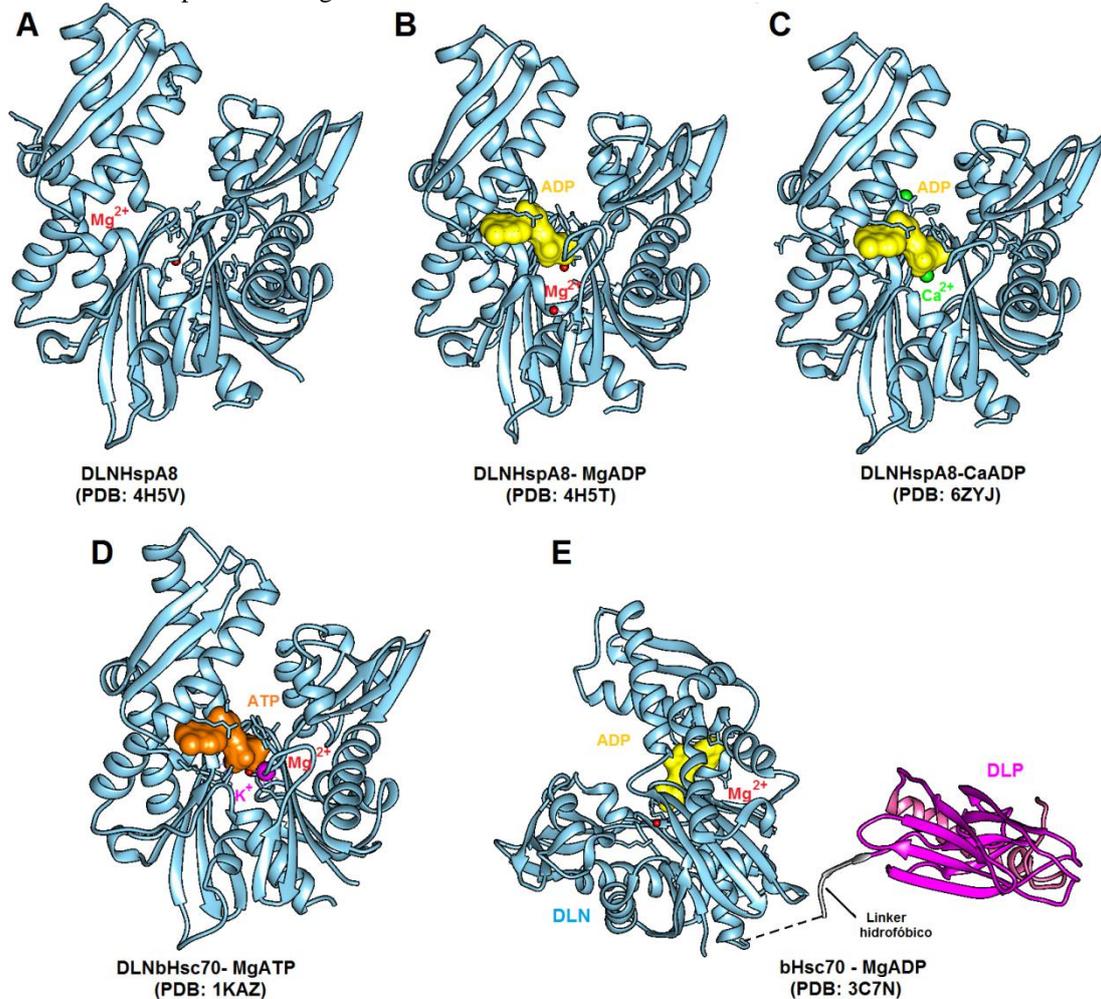
Um estudo de *docking* realizado por Ibrahim e colaboradores (IBRAHIM et al., 2020), mostrou que a HspA5 pode ser uma das receptoras virais por interagir com o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do novo coronavírus. Ensaios realizados em células epiteliais pulmonares confirmaram que o DLP da HspA5 é crítico para a interação com essa proteína viral, assim como sugerido nos estudos de *docking*. Adicionalmente, a redução dos níveis da HspA5 na superfície destas células comprometeu também os níveis de expressão e localização da ECA2, principal receptor para o novo coronavírus (CARLOS et al., 2021). Também foi reportado que a HspA5 é abundantemente expressa em células epiteliais das vias aéreas e na mucosa respiratória (AGUIAR et al., 2020) e que pacientes que contraíram a Covid-19 apresentam maior nível de expressão dessa proteína do que indivíduos saudáveis ou com pneumonia (KÖSELER et al., 2020). Foi verificado que a HspA5 interage com a proteína Spike do coronavírus MERS-CoV, pertencente à mesma família da Covid-19, potencializando a entrada do MERS-CoV e também ajudando na replicação viral (CHU et al., 2018; IBRAHIM; ABDELMALEK; ELFIKY, 2019). Esses achados têm servido de base para inúmeros estudos que buscam compreender como a HspA5 participa no processo de recepção viral e, então, propor intervenções terapêuticas a fim de se reduzir a propagação e patologia da doença e a replicação viral (AGUIAR et al., 2020; ELFIKY et al., 2020a, 2020b; IBRAHIM et al., 2020; PANG et al., 2020; RAYNER et al., 2020; SABIRLI et al., 2021).

### **1.5 HspA8**

A HspA8, também conhecida como Hsc70 (proteína cognata de choque térmico de 70 kDa), é uma das Hsp70 humanas citoplasmáticas (AROSIO et al., 2020; STEEL et al., 2012). Ao contrário de outras Hsp70s citossólicas, como HspA1A, HspA1AB e HspA6, a HspA8 não é induzida por estresse térmico sendo constitutivamente expressa (RADONS, 2016), e apresenta funções de manutenção celular, atuando principalmente no enovelamento e tráfego de proteínas intermembranas (CHO et al., 2011; MAYER; BUKAU, 2005). Assim como a maior parte das Hsp70, a proteína HspA8 é composta por dois domínios estruturais: DLN e DLP, conectados por um *linker* hidrofóbico. Embora não haja a estrutura completa da HspA8 depositada no PDB, as estruturas do DLN em sua forma Apo e ligado ao ADP já foram obtidas (códigos: 4H5V, 4H5T e

6ZYJ), além disso a estrutura parcial da ortóloga bovina, que compartilha 99% de identidade com a HspA8, e seu DLN na presença de ATP também se encontram disponíveis no PDB (códigos: 3C7N e 1KAZ) (Figura 10).

**Figura 10. Estruturas moleculares do DLN da proteína HspA8 e bHsc70.** Estruturas 3D do DLN da HspA8 na ausência (A) e presença do nucleotídeo ADP (B e C) se encontram depositadas no PDB (códigos: 4H5V, 4H5T e 6ZYJ). A estrutura do DLN da ortóloga bovina (D), bHsc70, a qual compartilha 99% de identidade com a HspA8, e a estrutura parcial da mesma (E, 1-551aa) também se encontram disponíveis no PDB (códigos: 1KAZ e 3C7N). A coordenação dos nucleotídeos adenosina pelo DLN pode ser realizada pelos íons  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ .



Fonte: Autoria própria.

Embora a HspA8 seja capaz de utilizar, além do  $Mg^{2+}$ , o íon  $Ca^{2+}$  como cofator metálico na coordenação dos nucleotídeos adenosina, o efeito inibitório do deste íon para a liberação do ADP é cerca de 6 vezes menos pronunciado para HspA8 quando comparada a HspA5 (PREISLER et al., 2020). Ademais, o efeito do  $Ca^{2+}$  na estabilização térmica do complexo ADP-chaperona também é menos acentuado na Hsp70 citossólica, quando a comparamos com a isoforma do RE (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020).

Além das funções supracitadas, a HspA8 também está envolvida nas vias de sinalização celular (SRINIVASAN et al., 2020), sistema de autofagia (AROSIO et al., 2020; DOU et al., 2020; STRICHER et al., 2013), processamento e apresentação de antígenos via complexo de histocompatibilidade (MHC) (RADONS, 2016), endocitose mediada por clatrina (BANKS et al., 2020; YU et al., 2014), interação com proteínas virais e montagem de vírions (FLORIN et al., 2004; KHACHATOORIAN et al., 2014), entre outros (CHO et al., 2011; DOU et al., 2020; STRICHER et al., 2013). Ademais, foi visto que as funções dessa chaperona são essenciais, uma vez que seu *knockdown* leva a célula à apoptose (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007; ROHDE et al., 2005). Neste sentido, devido à sua importância, a HspA8 tem sido amplamente estudada como um alvo terapêutico para diversas doenças, como fibrose cística (BAAKLINI et al., 2020; CHO et al., 2011), doença de Parkinson (BANKS et al., 2020; CIECHANOVER; KWON, 2017), esclerose lateral amiotrófica (AROSIO et al., 2020; KAMPINGA; BERGINK, 2016), doença de Alzheimer (CIECHANOVER; KWON, 2017; DOU et al., 2020), câncer (DHAMAD et al., 2016; ROHDE et al., 2005; WILLIAMS et al., 2008), etc (CIECHANOVER; KWON, 2017; YU et al., 2014).

### **1.5.1 HspA8 como alvo terapêutico**

#### 1.4.1.1 Doenças neurodegenerativas

Embora seja constitutivamente expressa, a HspA8 é abundantemente encontrada no sistema nervoso de mamíferos quando comparado a tecidos não neurais, além de apresentar altos níveis de expressão em corpos celulares neuronais (CHEN; BROWN, 2007). Tem sido visto que essa chaperona apresenta papel essencial na proteção intrínseca de células neuroepiteliais e precursoras neurais contra o estresse (RUBIO et al., 2002). Ademais, enquanto a indução da expressão da HspA8 atua como fator anti-apoptótico, sua depleção regula positivamente o aumento da expressão de sua parceira citossólica HspA1A (MCLAUGHLIN et al., 2003), o que demonstra o papel neuroprotetor dessa chaperona. Interessantemente, estudos reportam a regulação positiva da expressão da HspA8 após isquemia cerebral, o que também sugere uma função na neuroregeneração ativa e reparo (ANAGLI et al., 2008; CHEN et al., 2007; MURANYI et al., 2005).

O potencial papel da HspA8 em doenças neurodegenerativas causadas pelo acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína, tais como DP, também tem sido estudado (NACHMAN et al., 2020; XUN et al., 2008). Foi verificado que essa chaperona pode mediar a degradação

lisossomal de  $\alpha$ -sinucleínas em conjunto com a proteína LAMP-2A (do inglês *Lysosome-associated membrane protein-2A*) (MAK et al., 2010). Ademais, a HspA8 também atua em conjunto com a CHIP na degradação de mutantes da SOD1 (do inglês *cooper-zinc Superoxide dismutase 1*), um dos produtos gênicos causadores da esclerose lateral amiotrófica (ALS, do inglês *Amyotrophic lateral sclerosis*) (URUSHITANI et al., 2004). Além disso, o tratamento em modelos de camundongos com acrimoclomol, co-indutor de Hsps, retarda significativamente a progressão dessa doença (CASONI et al., 2005; URUSHITANI et al., 2004).

Estudos reportam que a HspA8 pode interagir e mediar o enovelamento ou degradação da Tau, proteína associada ao microtúbulo que quando hiperfosforilada pode desencadear as alterações patológicas iniciais de distúrbios como a DA (ELLIOTT; TSVETKOV; GINZBURG, 2007; NACHMAN et al., 2020). Além disso, essa chaperona pode desempenhar papel protetor na DA por facilitar a polimerização de microtúbulos mediados pela Tau e a produção de anticorpos MC1 para a Tau enovelada (JINWAL et al., 2010; KOSIK; SHIMURA, 2005; ZHANG et al., 2008). A degradação de proteínas huntingtina mutantes, causadoras da doença de Huntington (DH), também pode ser mediada pela HspA8 (BAUER et al., 2010). Interessantemente, além da função neuroprotetora, a HspA8 também é capaz de modular a neurotransmissão de distúrbios epiléticos via GABA (do inglês *gamma-aminobutyric acid*) (EKIMOVA et al., 2010).

#### 1.4.1.2 Câncer

Assim como observado para a HspA5, a HspA8 também é mais expressa em células cancerosas do que em células normais (KUBOTA et al., 2010; MAEDA et al., 2000). Ademais, linhagens celulares de glioma de rato apresentaram maior concentração de HspA8 no estágio de proliferação do que em diferenciação (HELMBRECHT; RENSING, 1999), o que sugere que essa chaperona pode atuar principalmente na fase proliferativa. Interessantemente, foi visto que a redução na expressão da HspA8 é capaz de promover a reversão de uma célula de glioma de alto grau para um fenótipo astrocítico normal (VILA-CARRILES et al., 2007), o que sugere que a regulação negativa dessa chaperona pode ser utilizada como uma terapia promissora para esse tipo de câncer. Surpreendentemente, estudos reportaram que a sobrevivência de células tumorais e não tumorais é dependente de HspA8 (ROHDE et al., 2005) e que essa proteína é identificada no meio condicionado de neuroblastoma, o que demonstra seu potencial papel como biomarcador tumoral (SANDOVAL et al., 2006).

A HspA8 participa na regulação das funções de vários genes relacionados ao desenvolvimento de um tumor, ademais ela também pode se ligar e estabilizar proteínas supressoras tumorais não fosforiladas de retinoblastoma (INOUE et al., 1995). Interessantemente, o papel imunomodulador dessa chaperona também tem sido descrito e a presença da mesma na superfície de exossomos liberados por tumores pode estimular a atividade migratória e citolítica de células NK (do inglês *Natural Killer*) (GASTPAR et al., 2005). Adicionalmente, a HspA8 também é capaz de induzir respostas de linfócitos T citotóxicos se ligando e transportando peptídeos antigênicos (AZUMA et al., 2003).

Cabe destacar ainda que estudos visando o uso da HspA8 em imunoterapias já têm sido realizados. Foi visto que a fusão dessa chaperona a epítomos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> pode ser utilizada como uma vacina capaz de prevenir o crescimento de tumores e metástase (MIZUKAMI et al., 2008) e, que a fusão do DLN da HspA8 com a TRP-2 (do inglês *tyrosinase-related protein-2*) atua como uma vacina tumoral contra o melanoma B16 (ZHANG et al., 2006).

## **1.6 Problematização**

Todos os aspectos abordados até aqui ressaltam a importância das Hsp70 para as células eucarióticas, especialmente para as células humanas, sugerindo-as como potenciais candidatas a alvos terapêuticos no tratamento e prevenção de diferentes patologias. Além disso, embora o genoma de *Homo sapiens* apresente diferentes genes codificadores para proteínas Hsp70 que compartilham similaridades estruturais e funcionais, diferentes estudos evidenciam peculiaridades funcionais entre estas homólogas (KOHLENER; ANDRÉASSON, 2020; RADONS, 2016; RYU et al., 2020; SERLIDAKI et al., 2020). Neste sentido, este trabalho visou caracterizar comparativamente a estrutura, estabilidade e função das proteínas HspA5 e HspA8 de forma a compreender os determinantes moleculares das mesmas em solução.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Objetivos**

#### **2.1.1 Gerais**

Este trabalho de tese de doutorado objetivou caracterizar comparativamente duas chaperonas moleculares Hsp70 recombinantes presentes no genoma de *H. sapiens* (HspA5 e HspA8), quanto aos parâmetros estruturais, de estabilidade e funcionais.

### 2.1.2 Específicos

- Identificação e análise da sequência de aminoácidos da HspA5 e HspA8;
- Expressão e purificação das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8;
- Determinação dos conteúdos de estrutura secundária e terciária local da HspA5 e HspA8;
- Determinação das propriedades hidrodinâmicas e presença de estados oligoméricos da HspA5 e HspA8;
- Avaliação da estabilidade química e térmica da HspA5 e HspA8;
- Determinação de aspectos termodinâmicos e constantes de dissociação da interação das proteínas HspA5 e HspA8 com nucleotídeos adenosina na presença e ausência de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ;
- Análise da atividade chaperona intrínseca da HspA5 e HspA8;
- Análise da atividade ATPásica da HspA5 e HspA8.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Identificação das proteínas e análises de Bioinformática

As sequências de aminoácidos correspondentes às HspA5 (ID: NP\_005338.1) e HspA8 (ID: NP\_006588.1) foram identificadas, a partir do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e alinhadas com as sequências das homólogas HspA1A (ID: NP\_005337.2) e HspA9 (ID: NP\_004125.3) através do Software Clustal ômega (disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As porcentagens de identidade e similaridade sequencial foram calculadas utilizando o programa Emboss Needle (disponível em: [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). As regiões das proteínas humanas HspA5 e HspA8 relacionadas a interação com os nucleotídeos adenosina e com os íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $K^+$  foram identificados e analisadas por meio das seguintes estruturas disponíveis no PDB: 5E84, 3IUC, 5EVZ, 3LDL, 4H5T, 6ZYJ, 3C7N e 1KAZ.

### 2.2.2 Soluções-tampão

A composição e a finalidade de uso das soluções-tampão utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3. Descrição da composição e finalidade de uso das soluções-tampão empregues nos procedimentos experimentais.**

Solução-tampão	Composição	Finalidade de uso
A	Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), 100 mM KCl	Lise bacteriana
B	Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol	Lavagem da coluna na cromatografia de afinidade-Ni <sup>2+</sup>
C	Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol	Eluição das proteínas na cromatografia de afinidade-Ni <sup>2+</sup>
D	Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Fosfato de Sódio	Eluição das proteínas na cromatografia de exclusão molecular preparativa
E	Fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), Hidrocloridrato de guanidina 6 M	Quantificação via método de Edelhoch
F	Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM KCl	Ensaio de atividade ATPásica

Fonte: Autoria própria.

### 2.2.3 Expressão e purificação das proteínas HspA5 e HspA8

Os vetores plasmidiais contendo os fragmentos de DNA codantes para as proteínas humanas HspA5 (pET28a::HspA5) e HspA8 (pET28a::HspA8) foram obtidos comercialmente pela *Epoch Life Science Inc.* (Missouri City, Texas, USA). Para a HspA5, a construção proteica produzida pelo pET28a::HspA5 não apresenta a sequência correspondente ao peptídeo sinal da mesma. A inserção destes vetores foi realizada em cepas bacterianas competentes *Escherichia coli* BL21(DE3) a partir da técnica de transformação. Tal procedimento ocorreu via choque térmico: inicialmente as células foram incubadas com os vetores por 30 min no gelo e, então, submetidas à temperatura de 42 °C por 90 seg. Posteriormente, a suspensão celular foi recolocada no gelo por 3 min. Após esse processo de choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio de cultura *Lisogenic broth* (LB) à suspensão bacteriana e a mesma foi incubada à 37 °C por 45 min sob agitação de 200 rpm. Por fim, uma placa de meio LB sólido suplementado com ágar (5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 15 g L<sup>-1</sup> ágar - pH 7,0) e canamicina (3x 10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup>) foi preparada, a suspensão foi espalhada e incubada por 16 h à 37 °C em estufa.

Após a obtenção das cepas contendo os plasmídeos de interesse, uma colônia bacteriana foi escolhida e pré-inoculada em 25 mL de meio LB, na presença de canamicina, à 37 °C por 16 h, sob agitação de 200 rpm. O pré-inóculo foi então diluído 20 vezes em 500 mL de meio LB, contendo o antibiótico, e o cultivo celular ocorreu a 37 °C e 200 rpm até atingir uma DO<sub>600nm</sub> ~ 0,6. Na sequência, as células foram induzidas com a adição de 0,4 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) por 4 h a 30 °C e 200 rpm. A molécula de IPTG foi utilizada como indutor pois a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) apresenta o gene DE3, responsável pela codificação da enzima T7 RNA polimerase, cuja expressão é controlada pelo promotor lacUV5, o qual é sensível a

esta molécula (ZHANG et al., 2015). Após a indução, as células foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 min a 4 °C e o pellet armazenado a 20°C.

Os pellets bacterianos foram ressolubilizados em 30 mL de tampão A e rompidos de forma química, sendo incubados com 5 unidades (U) de DNase (Sigma) e 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima (Sigma), e física, por sonicação em banho de gelo (amplitude de 35%, pulsos de 6 s intervalados por 1 min). O lisado celular foi centrifugado, por 40 min a 4 °C e 18000 rpm, e o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 µm (Millipore). A fração solúvel foi então aplicada em uma coluna *HiTrap Chelating HP 5 mL* (GE Healthcare Lifesciences) de cromatografia de afinidade ao níquel equilibrada com tampão B e as proteínas recombinantes foram eluídas em tampão C. Essa técnica cromatográfica foi aplicada pois a cauda de poli-histidina inserida pelo vetor na porção N-terminal destas proteínas se liga de forma reversível ao metal níquel, o que permite a afinidade entre tais proteínas e a coluna, e sua posterior purificação (BORNHORST, J.A., FALKE, 2010). Após as proteínas serem eluídas na cromatografia de afinidade, elas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular preparativa (CEMp) empregando à coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Lifesciences) equilibrada em tampão D e acoplada ao sistema AKTA Prime Plus (GE Healthcare Lifesciences). O grau de pureza e a eficiência do processo de purificação foram monitorados por meio de géis de poliacrilamida de 12% (SDS-PAGE). Os géis decorrentes da eletroforese foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* e descorados em solução descorante (composta por ácido acético, etanol e água).

#### 2.2.4 Propriedades físico-químicas das proteínas

As propriedades físico-químicas das proteínas HspA5 e HspA8 foram obtidas, por meio da sequência de aminoácidos das mesmas, utilizando o programa Sednterp (disponível em: <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>) (Tabela 4).

**Tabela 4. Descrição das proteínas HspA5 e HspA8 quanto aos parâmetros físico-químicos: números de resíduos de aa totais e de aminoácidos específicos (W- triptofano, Y- tirosina, F- fenilalanina e C- cisteína), massa molecular (MM), ponto isoelétrico (pI) e coeficiente de extinção molar (ε).**

Proteína*	Gene Bank ID <sup>a</sup>	Resíduos de aa <sup>b</sup>	W/Y/F/C <sup>b</sup>	MM (kDa) <sup>b</sup>	pI teórico <sup>b</sup>	ε <sub>280nm</sub> (M <sup>-1</sup> . cm <sup>-1</sup> ) Edelhoc <sup>b</sup>
HspA5 <sup>c</sup>	NP_005338.1	631	2/13/23/2	69,8	5,04	28020
HspA8	NP_006588.1	646	2/15/24/4	70,9	5,37	30580

\* Propriedades previstas pela sequência de aa sem a His-tag inserida pelo vetor de expressão pET28a.

<sup>a</sup> Dados obtidos pelo NCBI.

<sup>b</sup> Valores calculados a partir das sequências de aa pelo programa Sednterp.

<sup>c</sup> Valores obtidos para a sequência sem o peptídeo sinal.

Fonte: Autoria própria.

### 2.2.5 Quantificação das proteínas

A concentração das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 foi aferida pelo método de Edelhoch, que se baseia na estimativa do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) das proteínas em seu estado desenovelado (EDELHOCH, 1967). Neste sentido, uma alíquota de cada uma dessas proteínas foi diluída 5x em tampão E e a absorbância foi medida em 280 nm por meio de espectroscopia (EDELHOCH, 1967). Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 250 nm e 350 nm, e a quantificação proteica realizada utilizando a Lei de Beer-Lambert (SWINEHART, 1962), como descrito pela Equação 1:

$$A = \epsilon * l * C \quad \text{Equação 1}$$

onde  $A$  representa a absorbância em 280 nm (unidades arbitrárias),  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar da molécula ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ),  $l$  o caminho óptico percorrido pela radiação através da solução (cm) e  $C$  a concentração molar da espécie que está sendo analisada ( $mol.L^{-1}$ ). Em todas as medidas a leitura do branco foi descontada, os limites de absorbância foram respeitados (0,2 – 0,8) e o fator de diluição, quando necessário, foi acrescentado.

### 2.2.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

Os ensaios de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um equipamento Jasco J-815 (Jasco, INC) acoplado a um sistema regulador de temperatura tipo termoelétrico. Os espectros de CD foram coletados tanto no UV-distante (260 nm – 190 nm) quanto no UV-próximo (350 nm – 250 nm), a fim de aferir o conteúdo de estrutura secundária e terciária das proteínas, respectivamente (KELLY; PRICE, 2005; WHITMORE; WALLACE, 2008). Ademais, nos ensaios de CD no UV-distante as proteínas também foram analisadas na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina, ATP e ADP. Para os experimentos de CD no UV-distante foi utilizada uma cubeta de quartzo de 0,2 mm e uma concentração proteica de 3  $\mu M$ , enquanto os ensaios de CD no UV-próximo foram realizados utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm e uma concentração proteica de 15  $\mu M$ . Todos os espectros de CD foram convertidos em elipticidade molar residual ( $[\theta]$ ), como apresentado na Equação 2, e a deconvolução espectral do CD no UV-distante foi realizada usando o programa *Dichroweb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

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

Na Equação 2,  $\theta$  é o sinal obtido de CD, MM é a massa molecular das proteína (Da),  $C$  é a concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ),  $l$  é o caminho óptico da cubeta (cm) e  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Os nucleotídeos adenosina (Sigma) foram preparados e quantificados espectroscopicamente mediante leitura em 259 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )  $15400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , assim como demonstrado na Equação 1. Nos ensaios de UV-distante as proteínas foram incubadas, por 1 h a temperatura ambiente, com 200  $\mu\text{M}$  de ADP ou ATP na presença de 2 mM do cofator  $\text{MgCl}_2$ . Ademais, espectros de CD das proteínas na presença do agente desnaturante hidrócloridrato de guanidina (5 M) monitorados no UV-próximo também foram obtidos. Todos os experimentos de CD foram realizados em tampão D e os dados espectrais para cada condição foram obtidos por meio de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

### 2.2.7 Espectroscopia de Fluorescência

A estrutura terciária local das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 foi monitorada por emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (TAKALLOO et al., 2020), utilizando um espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi). As amostras proteicas (3  $\mu\text{M}$ ), na presença ou ausência de 8 M de ureia, foram acondicionadas em uma cubeta de quartzo  $1 \times 0,2$  cm e excitadas em comprimento de onda de 295 nm. Ensaios na presença dos nucleotídeos adenosina também foram realizados por fluorescência, usando as mesmas condições descritas na seção anterior. Os espectros foram coletados entre 310 e 420 nm e os dados obtidos foram analisados em relação ao comprimento máximo de emissão ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e por meio do cálculo do centro de massa espectral ( $\langle \lambda \rangle$ ), como descrito na Equação 3.

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

Na Equação 3,  $\lambda_i$  é o comprimento de onda medido e  $F_i$  a intensidade de fluorescência de  $\lambda_i$ . Todos os experimentos de fluorescência foram realizados em tampão D e em triplicatas biológicas.

### 2.2.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica

A cromatografia de exclusão molecular analítica (CEMa) foi utilizada para estimar parâmetros hidrodinâmicos e a possível estrutura quaternária das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 (HONG; KOZA; BOUVIER, 2012). Os experimentos foram realizados em tampão D, utilizando uma coluna Superdex 200 GL 10/300 (GE *healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema *AKTA prime plus* (GE *healthcare Lifesciences*) e utilizando concentrações proteicas entre 10 e 15  $\mu\text{M}$ . Foi utilizado um padrão de proteínas globulares composto pelas proteínas Apoferritina (480 kDa e  $R_s$  67,1 Å),  $\gamma$ - globulina (160 kDa e  $R_s$  48 Å), BSA (67 kDa e  $R_s$  36,2 Å), Anidrase carbônica (30 kDa e  $R_s$  23,9 Å) e citocromo c (12,3 kDa e  $R_s$  14,2 Å). A partir dos volumes de eluição das Hsp70 humanas e das proteínas padrão foi possível calcular o coeficiente de partição ( $k_{av}$ ), como mostrado pela Equação a seguir:

$$k_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)} \text{ Equação 4}$$

onde  $V_e$  é o volume de eluição de cada molécula proteica,  $V_0$  é o volume da fase móvel e  $V_t$  é o volume total da coluna. Por meio destes ensaios foi possível obter também parâmetros hidrodinâmicos tais como a massa molecular aparente ( $MM_{app}$ ) e a razão friccional  $f/f_0$  das proteínas HspA5 e HspA8 (Equação 5).

$$f/f_0 = \frac{\text{Raio de Stokes experimental}}{\text{Raio de Stokes teórico}} \text{ Equação 5}$$

### 2.2.9 Desenovelamento químico

O desenovelamento químico foi realizado utilizando o agente caotrópico ureia, a fim de se estudar a estabilidade química comparativa das proteínas HspA5 e HspA8. A concentração da solução estoque contendo o agente desnaturante foi aferida por refratometria. As fórmulas são dadas pelas Equações 6 e 7.

$$\Delta N = \Delta Nu - \Delta Nt \text{ Equação 6}$$

$$[\text{ureia}] = 117,66 (\Delta N) + 29,753 (\Delta N^2) + 185,56 (\Delta N^3) \text{ Equação 7}$$

Na Equação 6:  $\Delta Nu$  é o índice de refração do agente desnaturante,  $\Delta Nt$  é o índice de refração do tampão utilizado e o  $\Delta N$  é a diferença entre tais índices. E, na Equação 5 temos a descrição polinomial utilizada para se calcular a concentração de ureia (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1989).

Os experimentos foram realizados e monitorados por  $CD_{222nm}$  e emissão de fluorescência $_{295nm}$ , a fim de se analisar as transições conformacionais sofridas em nível de estrutura secundária e terciária local, respectivamente (BENNION; DAGGETT, 2003; TAKALLOO et al., 2020; WHITMORE; WALLACE, 2008). A concentração das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 utilizadas foi de 3  $\mu M$  e os ensaios foram feitos com incubação prévia das mesmas com diferentes concentrações de ureia (0 – 8 M) por 1 h em tampão D. Adicionalmente, os ensaios de desenovelamento por fluorescência foram realizados em microplaca Microlon de 96 poços (Greiner) e os espectros coletados em um equipamento Varioskan<sup>TM</sup> LUX 3020-197 (*Thermo Fisher Scientific*), entre um intervalo de 313 e 420 nm.

Para a análise dos dados de desenovelamento químico por meio da técnica de fluorescência $_{295nm}$  foi considerado o  $\langle \lambda \rangle$  das proteínas incubadas com diferentes concentrações de ureia e os cálculos foram realizados como apresentados na Equação 3. Adicionalmente, o tratamento de dados do desenovelamento químico acompanhado por  $CD_{222nm}$  foi realizado pela conversão dos mesmos em  $[\theta]$ , tal como apresentado na equação 2. A concentração de transição do ponto médio ( $C_m$ ) para ambas as proteínas foi obtida utilizando um ajuste Double-Boltzmann disponíveis no software Origin (Microcal).

## **2.2.10 Desenovelamento térmico**

### **2.2.10.1 Desenovelamento térmico monitorado por CD**

A técnica de CD foi escolhida para acompanhar o desenovelamento térmico das proteínas Hsp70 recombinantes, bem como estudar as transições conformacionais geradas pela temperatura em suas estruturas secundárias (KELLY; PRICE, 2005). Os ensaios de desnaturação por  $CD_{222nm}$  foram realizados utilizando 5  $\mu M$  das proteínas HspA5 e HspA8 em tampão D, sob um intervalo térmico de coleta de 20 °C a 90 °C e elevação de temperatura de 1 °C  $min^{-1}$ . Ademais, experimentos na presença de 200  $\mu M$  de nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) e do cofator  $MgCl_2$  (2 mM) também foram realizados mediante incubação prévia, como relatado na seção 2.2.6. Os dados foram convertidos em  $[\theta]$  e tratados utilizando ajuste sigmoidal não linear Double-Boltzmann disponível no software Origin (Microcal).

### 2.2.10.2 Calorimetria de varredura diferencial

A técnica de calorimetria de varredura diferencial (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) foi escolhida para acompanhar o processo de desnaturação global das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 (BHANDAL et al., 2017). Desta forma, os experimentos de DSC foram realizados em um equipamento Nano DSC (TA Instruments) e os termogramas foram coletados em um intervalo térmico de 20 °C a 90 °C, sob uma taxa de aquecimento de 1 °C min<sup>-1</sup>. As proteínas Hsp70 foram exaustivamente dialisadas frente ao tampão D e a concentração proteica utilizada foi de aproximadamente 1 mg mL<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina (200 µM) e dos cofatores MgCl<sub>2</sub> (2 mM) e CaCl<sub>2</sub> (2 mM). Assim como reportado em outras seções, os ensaios com nucleotídeos foram realizados mediante incubação proteica previa de 1 h em temperatura ambiente.

Os dados foram processados no programa *Launch Nanoanalyze* (TA Instruments), usando o ajuste em escala de dois estados para obter os valores de T<sub>m</sub> (temperatura do ponto médio de transição) e entalpia de desnaturação aparente (ΔH<sub>app</sub>), conforme descrito previamente (SILVA et al., 2020a). Como é sabido, a interação de ligantes à uma proteína pode ocasionar alterações conformacionais e, conseqüentemente, aumentar sua estabilidade térmica (BHANDAL et al., 2017; LAMB et al., 2006). Portanto, as T<sub>m</sub> obtidas para as proteínas HspA5 e HspA8, na ausência e presença dos nucleotídeos, foram utilizadas para calcular a constante de dissociação (K<sub>D</sub>), conforme mostrado pela Equação a seguir.

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{(RT_{m,o})}{(\Delta H_{app,o})} \cdot \ln\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right) \text{ Equação 8}$$

Na Equação 8, ΔT<sub>m</sub> é a variação de T<sub>m</sub> da proteína na forma apo em relação ao ligante utilizado, R é a constante dos gases, T<sub>m,o</sub> e ΔH<sub>app,o</sub> são, respectivamente, a T<sub>m</sub> da proteína e entalpia de desnaturação da mesma na ausência do ligante, e [L] é a concentração do ligante, conforme reportado por Lamb e colaboradores (LAMB et al., 2006).

### 2.2.11 Calorimetria de titulação isotérmica

A interação das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 com os nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) usando um microcalorímetro iTC200 (GE

Healthcare Life Sciences). Treze ou dezenove injeções de 1,5 µL de ATP (1000 µM) e dezenove injeções de 1,5 µL de ADP (300 µM) foram injetados em 203,8 µL das proteínas Hsp70 (30 µM), na presença de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> ou CaCl<sub>2</sub>. As proteínas foram exaustivamente dialisadas em tampão D e os ligantes foram preparados no tampão pós-diálise. Os experimentos foram realizados a 20 °C, 1000 rpm e intervalo de injeções de 150 seg. Como controle, as titulações foram realizadas usando as preparações de ATP e ADP em tampão de diálise. A integração da área do pico de cada uma das injeções para um dado período de tempo foi obtida e utilizada para calcular a variação na entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ). O software Microcal Origin foi empregue para a análise dos resultados, utilizando o modelo de um sítio de ligação para os ajustes das curvas (*One Set of Sites curve*), obtendo assim a  $\Delta H_{app}$ , o coeficiente estequiométrico (n) e a constante de associação ( $K_A$ ). Os parâmetros termodinâmicos energia livre de Gibbs de ligação aparente ( $\Delta G_{app}$ ) e a variação de entropia de ligação aparente ( $\Delta S_{app}$ ) foram calculadas pela Equação 9.

$$\Delta G_{app} = -RT \ln K_A = \Delta H_{app} - T \Delta S_{app} \text{Equação 9}$$

Os dados termodinâmicos foram gerados a partir de, pelo menos, 3 titulações experimentais independentes e em todos as titulações a injeção do titulante no tampão foi subtraída dos isotermogramas.

### 2.2.12 Atividade ATPásica

Os ensaios de atividade ATPásica das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 foram realizados para analisar a atividade enzimática das mesmas sob a hidrólise de ATP (MAYER; BUKAU, 2005; MAYER; GIERASCH, 2019). A fim de medir a quantidade de Pi liberado mediante à quebra da molécula de ATP pelas proteínas Hsp70, foi utilizado o kit colorimétrico *PiColorLock™ Gold Phosphate Detection System* (Innova Biosciences). Tal kit se baseia na alteração de absorvância do corante verde malaquita na presença de Pi (fosfato inorgânico), como resultado da formação de fosfomolibdatos (SILVA et al., 2018), sendo o Pi livre proporcional portanto à taxa de hidrólise de ATP por essas chaperonas. Neste sentido, os ensaios foram realizados em uma microplaca de 96 poços UV-Star (greiner), mediante a incubação de 2 µM das proteínas HspA5 e HspA8 com concentrações crescentes de ATP (0 a 2000 µM) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, por 1 h a 37 °C. Ademais, uma curva padrão foi construída com valores crescentes de fosfato inorgânico para a normalização dos dados obtidos. Após o período

de incubação, a leitura de absorbância foi realizada a 590 nm no leitor de microplacas Varioskan™ LUX 3020-197 (*Thermo Fisher Scientific*). Todos os ensaios foram realizados em tampão F.

### 2.2.13 Atividade Chaperona

Os experimentos de atividade chaperona foram realizados a fim de se avaliar a capacidade das proteínas HspA5 e HspA8 de prevenir a agregação proteica (BALCHIN; HAYER-HARTL; HARTL, 2020). Para isto, foram utilizadas duas proteínas-clientes modelo: Malato desidrogenase (MDH) (*Malate dehydrogenase from porcine heart* - Sigma M2634) e Citrato sintase (CS) (*Citrate Synthase from porcine heart* - Sigma C3260).

Todos os ensaios foram preparados em tampão D, fixando a concentração de 1  $\mu$ M para ambas as proteínas-clientes modelo e variando a concentração das Hsp70 (0- 2  $\mu$ M). Os experimentos foram realizados em uma microplaca de 96 poços UV-Star (Greiner), incubada por 2 h a 42 °C, e a agregação foi monitorada por espalhamento de luz a 320 nm no equipamento Varioskan™ LUX 3020-197 (*Thermo Fisher Scientific*). A agregação das proteínas-modelo no tempo de 90 min a 42 °C foi considerada como o sinal máximo de espalhamento de luz (100%) (SILVA et al., 2018).

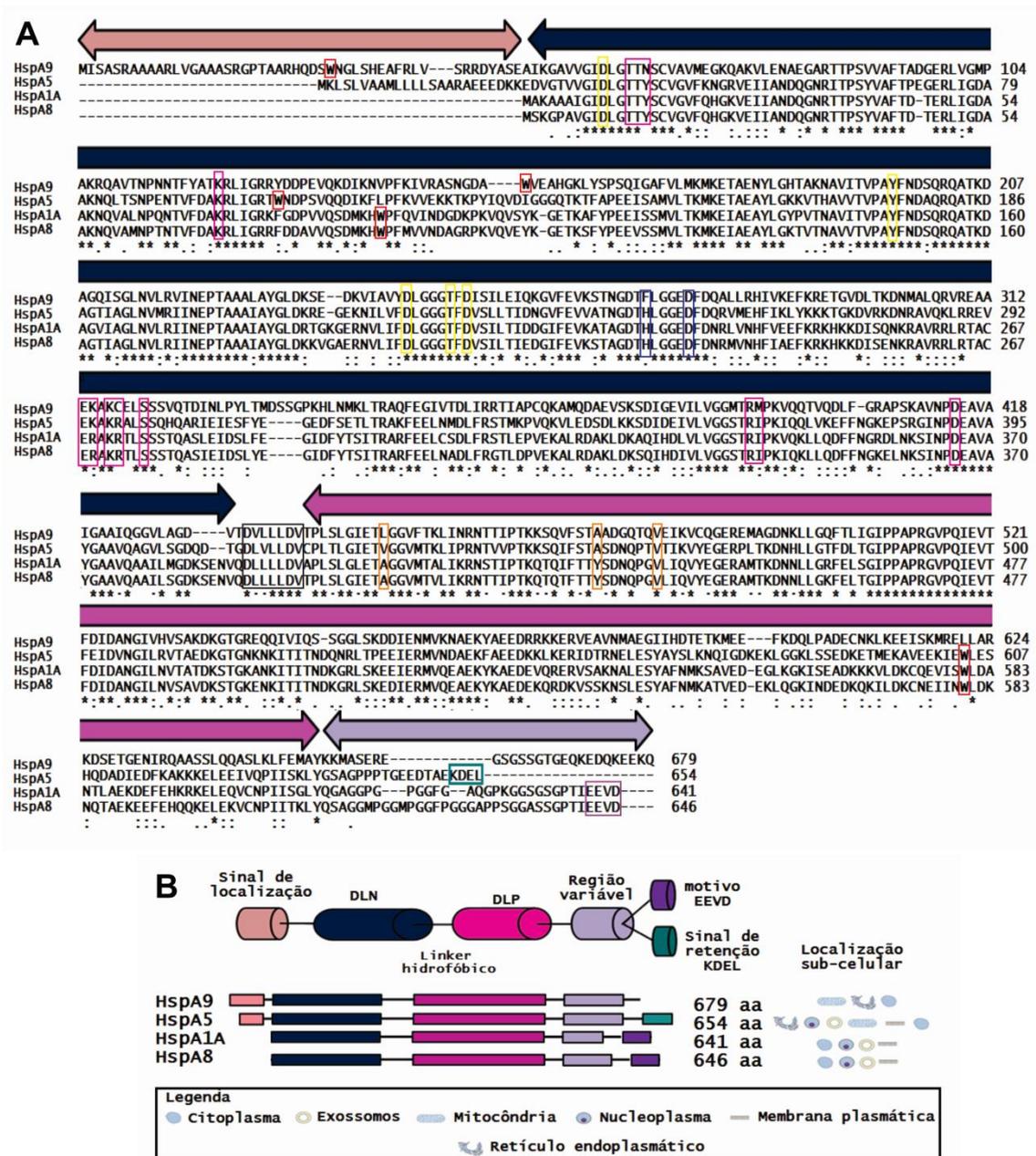
## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Análise da estrutura primária da HspA5 e HspA8

A fim de compreender a estrutura das proteínas humanas HspA5 e HspA8, bem como a similaridade na estrutura primária com as homólogas HspA1A e HspA9, o alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado. Conforme mostrado na Figura 11 e Tabela 5, as proteínas Hsp70 humanas apresentam um moderado grau de identidade e um alto grau de similaridade sequencial.

**Figura 11. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos e esquematização dos domínios das proteínas humanas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9.** A) O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas hHsp70 foi feito utilizando o programa Clustal Ômega, considerando o peptídeo sinal presente nas proteínas HspA5 e HspA9. Os símbolos destacados como (\*), (-), (:), e (.) representam os aminoácidos idênticos em todas as sequências, os ausentes, os que possuem estrutura similar e os pouco similares, respectivamente. Em caixas vermelhas foram destacados os resíduos de Triptofano (W), na caixa preta foi destacado o *linker* hidrofóbico, na caixa verde e roxa foram destacadas a sequência de retenção ao RE e o motivo EEVD, respectivamente. As caixas em rosa representam aminoácidos relacionados à interação com os nucleotídeos ATP e ADP e com os cofatores metálicos. Em azul estão as caixas correspondentes aos resíduos de interação ao Ca<sup>2+</sup>. Os resíduos descritos como importantes na atividade chaperona das Hsp70 são destacados pelas caixas laranjas enquanto os que interagem com os íons K<sup>+</sup> são destacados pelas caixas amarelas. As regiões presentes nas proteínas Hsp70 são destacadas em setas: a seta rosa claro representa o peptídeo sinal das proteínas HspA5 e HspA9, a seta azul, rosa e lilás representam o domínio DLN, DLP e a região variável, respectivamente. B) As estruturas das proteínas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9 é apresentada por meio de uma esquema comparativo das

regiões presentes nestas proteínas e sua localização subcelular (adaptado de (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007)).



Fonte: Autoria própria.

A maior porcentagem de identidade proteica observada entre as Hsp70 analisadas foi de 86% e ocorreu entre as proteínas HspA1A e HspA8, seguida pelos valores de 66% encontrado para a HspA5 e HspA8, 64% para a HspA5 e HspA1A e de aproximadamente 50% entre a HspA9 com as demais proteínas. Ademais, os menores valores de similaridade sequencial também foram obtidos comparando a sequência da HspA9 com a das outras homólogas (aproximadamente 77%), o que sugere diferenças estruturais entre essa proteína com as outras três Hsp70 em análise (Tabela 5). Interessantemente, o nível de conservação sequencial do DLN das Hsp70 apresenta

maior percentual de identidade do que o DLP, o que pode sugerir que boa parte das diferenças funcionais observadas entre elas podem estar relacionadas ao DLP.

**Tabela 5. Valores de identidade e similaridade entre as proteínas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9 e entre seus domínios DLN e DLP.**

Proteínas	Ident. total (%)*	Simil. total (%)*	Ident. do DLN (%)*	Simil. do DLN (%)*	Ident. do DLP (%)*	Simil. do DLP (%)*
HspA1A-HspA5	64	86	66	82	55	73
HspA1A-HspA8	86	95	89	95	80	90
HspA1A-HspA9	50	76	52	70	43	59
HspA5-HspA8	66	87	69	83	55	73
HspA5-HspA9	50	77	55	71	44	59
HspA8-HspA9	50	77	53	69	42	56

\* Valores obtidos por meio do programa *Emboss Needle*.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 11, na porção correspondente ao DLN, as caixas rosas indicam os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os nucleotídeos ATP e ADP, bem como com os cofatores metálicos (Thr13, Thr14, Tyr15, Lys71, Glu268, Arg269, Lys271, Arg272, Ser275, Arg342, Ile343 e Asp366, enumeração considerando a sequência da HspA8). As caixas amarelas destacam os resíduos de aminoácidos que interagem com os íons K<sup>+</sup> (Asp10, Tyr149, Asp199, Thr204 e Asp206, enumeração considerando a sequência de aminoácidos da HspA8) os quais são importantes para a hidrólise de ATP (O'BRIEN; MCKAY, 1995). Estudos anteriores demonstraram que a Thr13 é crítica para o acoplamento ao ATP e mudanças conformacionais na estrutura do DLN da Hsc70 bovina (SOUSA; MCKAY, 1998). Além disso, foi visto que, ao contrário da Lys71, a Thr204 influencia a estrutura do sítio ativo, mas não é essencial para que a hidrólise de ATP ocorra (O'BRIEN; FLAHERTY; MCKAY, 1996; O'BRIEN; MCKAY, 1993). Por fim, nas caixas azuis estão os resíduos relacionados ao segundo sítio de interação do DLN das proteínas HspA5 e HspA8 com o Ca<sup>2+</sup> (Asp232 e His227, enumeração considerando a sequência de aminoácidos da HspA8).

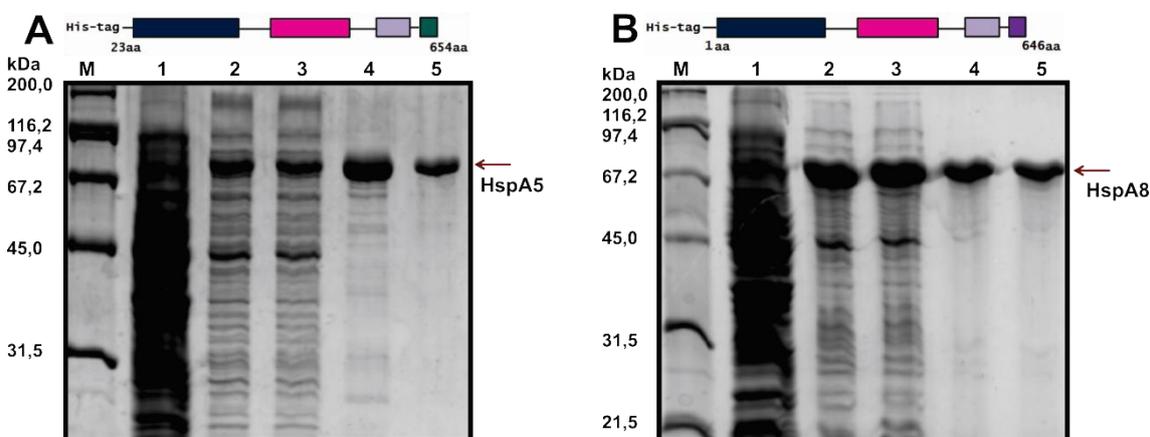
O *linker* hidrofóbico que conecta o DLN ao DLP é destacado pela caixa preta (Figura 11), os resíduos relacionados à modulação da atividade chaperona verificada para a ortóloga bacteriana DnaK são mostrados em caixas laranjas (RÜDIGER et al., 2000), o motivo EEVD responsável pela interação com co-chaperonas que possuem o domínio TPR é mostrado na caixa roxa (ODUNUGA et al., 2003; SCHEUFLER et al., 2000; SILVA et al., 2020b) e a sequência de retenção KDEL presente na HspA5 é

destacada na caixa verde (JIN; KOMITA; AOE, 2017). Todas as Hsp70 analisadas aqui apresentam 2 resíduos de triptofano (Figura 5, caixas vermelhas): um no DLN e outro no DLP, com exceção da HspA9 que apresenta um resíduo no peptídeo sinal e o outro no DLN.

### 2.3.2 Expressão e purificação da HspA5 e HspA8

Os ensaios de expressão e purificação das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 foram realizados de forma bem-sucedida. As proteínas foram purificadas por dois passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao níquel seguida por CEMp. Em todos os ensaios a His-tag foi mantida. A pureza proteica e a eficiência do processo de purificação foram acompanhadas por SDS-PAGE 12%, e as frações obtidas após as etapas de purificação permitiram que as proteínas HspA5 e HspA8 fossem utilizadas para os ensaios estruturais e funcionais aqui descritos (Figura 12).

**Figura 12. Monitoramento da Expressão e purificação das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8.** A eficiência da expressão e purificação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) foi analisada eletroforeticamente por géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corados com Coomassie Brilliant Blue R. M- marcador de massa molecular; 1 e 2- fração de células não induzidas e induzidas por IPTG, respectivamente; 3- fração solúvel; 4- proteína eluída após a cromatografia de afinidade ao níquel; 5- proteína eluída após a CEMp.



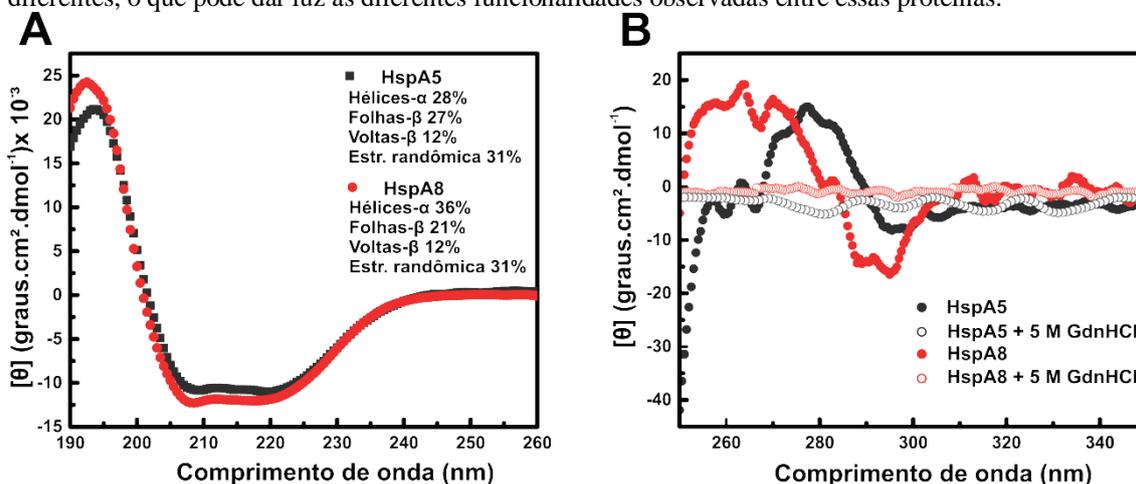
Fonte: Autoria própria.

Após os processos de purificação, as proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 apresentaram um rendimento de cerca de 8 a 12 mg por litro de indução, o que foi considerado satisfatório para a realização dos ensaios estruturais e funcionais apresentados nas próximas seções.

### 2.3.3 Caracterização da estrutura secundária e terciária

Com o intuito de investigar se as proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 foram obtidas em sua forma enovelada, as técnicas de CD e fluorescência foram aplicadas. Os espectros de CD obtidos mostraram que as proteínas em estudo foram produzidas com estrutura secundária (*Far-UV*) e terciária (*Near-UV*). A Figura 13 apresenta os espectros proteicos normalizados para  $[\theta]$  no UV distante (A) e no UV próximo (B).

**Figura 13. Espectro de Dicroísmo circular das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 no UV distante e próximo.** As proteínas humanas HspA5 e HspA8 tiveram sua estrutura secundária (A) e terciária (B) analisada por CD. Os espectros de CD, bem como os valores de deconvolução espectral, mostraram que as duas proteínas são ricas em hélices- $\alpha$  e que possuem perfis estruturais similares aos de outras Hsp70 humanas (ver texto para detalhes). No entanto, embora compartilhem 66% de identidade entre si (seção 2.3.1), as proteínas HspA5 e HspA8 apresentam perfis de estrutura terciária global diferentes, o que pode dar luz as diferentes funcionalidades observadas entre essas proteínas.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 13A mostra que ambas as proteínas HspA5 e HspA8 apresentaram assinaturas espectroscópicas de proteínas Hsp70 (BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015; SHAH et al., 2017), com mínimos característicos de estrutura secundária tipo hélice- $\alpha$  (208 nm e 222 nm) e um máximo correspondente à estrutura folha- $\beta$  (194 nm e 195 nm para a HspA5 e HspA8, respectivamente) (KELLY; PRICE, 2005). O programa *Dichroweb* foi utilizado para realizar a deconvolução dos espectros de CD distante das proteínas em estudo e obter as porcentagens referentes às estruturas secundárias das mesmas (WHITMORE; WALLACE, 2008). Ao compararmos os dados de deconvolução obtidos para os espectros das duas proteínas em análise (Figura 13A), ambas Hsp70 apresentaram como conteúdo de estrutura secundária majoritário hélices- $\alpha$  (28% para a HspA5 e 36% para a HspA8), o que também foi observado para as proteínas humanas HspA1A e HspA9 (BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015). É importante ressaltar que os espectros obtidos são uma mistura das

diferentes contribuições de estruturas secundárias e que a deconvolução não é uma predição estrutural, apresentando erro da ordem de 5-10%.

A Figura 13B apresenta os espectros de CD próximo (*Near-UV*) das hHsp70 na ausência e na presença do desnaturante químico GdnHCl (5 M). Nesta análise, os aminoácidos aromáticos W, Y e F e as pontes dissulfeto são os cromóforos contribuintes para os sinais de CD no UV próximo obtidos, os quais são sensíveis à estrutura terciária global das proteínas em estudo (KELLY; PRICE, 2005). Ademais, a magnitude destes sinais depende do número destes resíduos, da natureza do ambiente em que eles se encontram (ligações de H, grupos polares e polarizantes), da mobilidade e da disposição espacial em que estes aminoácidos se encontram nas proteínas (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Neste sentido, como apresentado na Tabela 4, a proteína HspA5 possui 2 Trp, 13 Tyr, 23 Phe e 2 Cys, enquanto a HspA8 possui 2 Trp, 15 Tyr, 24 Phe e 4 Cys. Em ambos os casos a maioria dos resíduos aromáticos estão localizados no DLN destas macromoléculas (1-W, 9-Y, 18-F e 1-C para a HspA5 e 1-W, 10-Y, 18-F e 2-C para a HspA8).

Os mínimos obtidos para o espectro de CD próximo da proteína HspA5 ocorreram em 297 nm, 277 nm, 270 nm, 266 nm, 263 nm e 260 nm, enquanto os máximos foram em 283 nm e 257 nm, sendo o perfil espectral similar ao observado para a ortóloga de hamster (LAMB et al., 2006). Por outro lado, o espectro da HspA8 apresentou mínimos em 295 nm, 289 nm e 266 nm e máximos em 280 nm, 283 nm, 280 nm, 263 nm e 260 nm. Em ambos os casos, na presença do agente GdnHCl (5 M) foi observada perda de sinal de CD no UV-próximo, sugerindo que as proteínas hHsp70 apresentavam estrutura terciária global. De forma geral, os mínimos observados em torno de 295 nm indicam a contribuição dos resíduos de Trp, os máximos observados em torno de 280 nm correspondem à contribuição de ambos Trp e Tyr e os sinais em torno de 270 nm a 260 nm correspondem à contribuição dos resíduos de Phe (Figura 13B).

Adicionalmente, por apresentarem 2 e 4 cisteínas, respectivamente, as proteínas HspA5 e HspA8 podem ainda formar cistinas, o que contribui para o sinal no UV-próximo em 260 nm (KELLY; PRICE, 2005). No entanto, a estrutura 3D da proteína HspA5 demonstra a inexistência da formação de pontes dissulfeto (PDB: 5E84, Figura 7). Interessantemente, embora a estrutura completa da HspA8 não esteja disponível e a da ortóloga bovina bHsc70 seja apenas parcial, há relatos na literatura que mostram que algumas proteínas Hsp70 citossólicas podem formar espécies oligoméricas, tais como

dímeros, por meio de pontes dissulfeto resultantes do aminoácido C574, presente no DLP (MORGNER et al., 2015; NEMOTO et al., 1995, 2006; TAKAKUWA et al., 2019). Isto pode explicar parte da diferença de sinais observados em 260 nm entre as proteínas HspA8 e HspA5 em estudo, uma vez que somente a HspA8 apresenta, em sua estrutura primária, tal aminoácido (Figura 14).

**Figura 14. Análise da estrutura primária da HspA5 e HspA8 com ênfase nos cromóforos para CD no UV próximo.** O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas humanas HspA5 (23-654) e HspA8 (1-646) foi realizado com o intuito de verificar a correspondência entre as seguintes sondas: resíduos de W (caixas vermelhas), Y (caixas amarelas), F (caixas em rosa) e C (caixas em verde), distribuídas no DLN (resíduos em cinza), *linker* (resíduos em preto) e DLP (resíduos em vermelho). Embora a maior parte dos cromóforos se encontre no DLN (ver texto para detalhes), as sondas com maiores posições estruturais não correspondentes observadas entre as hHsp70 em estudo estão no DLP, principalmente as Cys, as quais segundo a literatura são importantes para o processo de dimerização das Hsp70 citossólicas (NEMOTO et al., 2006).

HspA5	EDVGTVVGIDLGTIYSVGVFKNGRVEIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQL	84
HspA8	MSKGPVAVGIDLGTIYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTD-TERLIGDAAKNQV	59
	. * .*****:.*:***** ***** *****	
HspA5	TSNPENTVFDKRLIGRTINDPSVQQDIKFLPKVVEKTKFYIQVDIGGGQTKTFAPEE	144
HspA8	AMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHFMVVDAGRPKVQVEYK-GETKSFYPEE	118
	: ** ***** :.* ** :.* ** * :.* :.* **	
HspA5	ISAMVLTKMKETAEAAYLGKKVTHAVVTPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNVMRIINEPTA	204
HspA8	VSSMVLTKMKEIAEAAYLGKVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTA	178
	:.*:***** ***** :.*:*****:***** *****	
HspA5	AAIAYGLDKREG-EKNIIVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVATNGDTHLGGEDFDQRMV	263
HspA8	AAIAYGLDKKVGAEARNVLIIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMV	238
	*****: * * :.*:*****:*****:.* *****:.*:	
HspA5	EHIIKLYKKKTGKDVVRKDNRAVQKLRREVEKAKRALSSQHQARIEIESFYEGEDFSETLT	323
HspA8	NHIIAEIKRKHKKDISENKRAVRRLRTERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSIT	298
	:*** :.* ** :.*:*****:.* *****:.* ** :.*	
HspA5	RAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLKEDSDLKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKE	383
HspA8	RARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSKQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFEFGKE	358
	** :***** ** * :.*:*****:.* *****:***** *****	
HspA5	PSRGINPDEAVAYGAAVQAGVLSGDQD--TGDVLLDVPLTLGIETVGGVMTKLIPRNT	441
HspA8	LNKSNPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTLTKRNT	418
	:.*:***** *****:.*:***** ***** ***** *	
HspA5	VVPTKKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPIEVT	501
HspA8	TIPTKQTHTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKHELTGIPPAPRGVPIEVT	478
	:.*:.* * * * :.* ***** * * :.*:***** :.*:***** *****	
HspA5	EIDVNGILRVTAEDKGTGNKNTITNDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDT	561
HspA8	DIDANGILNVSVDKSTGKENKITTNDKGRLSKEDIERMVQEAEKYKAEDEKQRDKVSS	538
	:** ***** :.* ** * :.*:*****:.* *****:***** *****	
HspA5	RNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKETMEKAVEEKIEMLESHQDADIEDFKAKKK	621
HspA8	KNSLESYAFNMKATVED-EKLGKINDEKQKILDKNEIIMLDKNQTAEKEEHEHQK	597
	:.*:*****:.* : * ** * :.*:*****:.* *****:.* *****	
HspA5	ELEEIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAEKDEL-----	654
HspA8	ELEKVNPIITKLYQSAGMPGGMPGGPGGGAPPSSGGASSGPTIEEVD	646
	*****:***** ***** * * * * *	

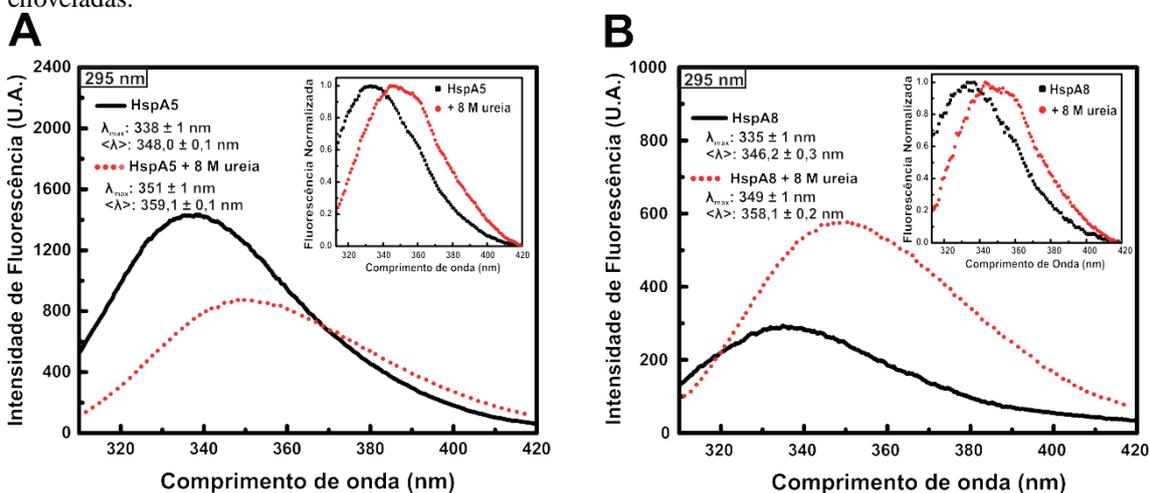
Fonte: Autoria própria.

De forma geral, as bandas espectrais observadas em diferentes regiões nos espectros de UV-próximo indicam que os aminoácidos aromáticos responsáveis pelos sinais observados se encontram em regiões estruturais diferentes em ambas as proteínas. Curiosamente, embora a maior parte dos cromóforos se encontre no DLN dessas chaperonas, o DLP apresenta as maiores divergências na correspondência estrutural

destes aminoácidos, o que pode sugerir a importância deste domínio para a estrutura 3D e, conseqüentemente, para as diferentes funções apresentadas por estas macromoléculas.

Além da análise em termos de estrutura terciária global, o ambiente terciário local das proteínas HspA5 e HspA8 também foi estudado por meio da técnica de emissão de fluorescência intrínseca (TAKALLOO et al., 2020). As sondas intrínsecas aqui analisadas foram os dois resíduos de Trp presentes em cada uma das duas proteínas em estudo, estando o primeiro presente no DLN e o segundo no DLP (ver Figura 14). Para a proteína HspA5, as respectivas posições dos triptofanos são W103 e W604 (considerando a presença do peptídeo sinal) e para a proteína HspA8 as respectivas posições são W90 e W580. Neste sentido as proteínas HspA5 (Figura 15A) e HspA8 (Figura 15B) foram excitadas em comprimento de onda específico (295 nm) na presença e ausência do agente caotrópico ureia (8 M) e tiveram seus espectros de emissão de fluorescência analisados.

**Figura 15. Espectros de Fluorescência intrínseca do triptofano das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença e ausência de ureia.** Quando incubadas com ureia (8 M), as proteínas humanas HspA5 (A) e HspA8 (B) apresentam deslocamento espectral para o vermelho, indicando que as mesmas possuem estrutura terciária local. No entanto, enquanto a HspA5 sofre supressão de fluorescência na presença de ureia, a HspA8 apresenta aumento na intensidade de emissão de fluorescência, o que sugere diferenças em termos de estrutura terciária local (ver texto para detalhes). Ademais, o delta de  $\lambda_{max}$  da HspA5 e HspA8 em tampão em relação a condição desnaturante, sob excitação a 295 nm, foi de 13 e 14 nm (insetos), respectivamente o que indicam que estas chaperonas foram obtidas em suas formas enoveladas.



Fonte: Autoria própria.

Em condições não desnaturantes, a HspA5 apresentou valores para  $\langle\lambda\rangle$  e  $\lambda_{max}$  de  $348,0 \pm 0,1$  nm e  $338 \pm 1$  nm (Tabela 6), respectivamente. Por outro lado, em condições desnaturantes, a HspA5 apresentou um desvio para comprimentos de onda menos energéticos resultando em  $\langle\lambda\rangle$  e  $\lambda_{max}$  de  $359,1 \pm 0,2$  nm e  $351 \pm 1$  nm, respectivamente (Figura 15A, inserto). Tais valores indicam que os 2 resíduos de W se encontram em um

ambiente parcialmente exposto ao solvente, e que na presença de ureia se tornam totalmente expostos ao solvente. O delta de  $\lambda_{\max}$  da HspA5 em tampão em relação à proteína em condições desnaturantes foi de 13 nm, o que sugere que a mesma possui estrutura terciária local enovelada. Ademais, a supressão de emissão de fluorescência desta macromolécula observada na presença de ureia indica que ocorre perda de tal estrutura, o que também foi visto para outras proteínas Hsp70, incluindo a HspA9 (DORES-SILVA et al., 2015, 2017; KIRALY et al., 2020).

A Figura 15B apresenta os espectros de emissão de fluorescência da HspA8. Em condições não desnaturantes, a HspA8 apresentou valores para  $\langle\lambda\rangle$  e  $\lambda_{\max}$  de  $346,2 \pm 0,3$  nm e  $335 \pm 1$  nm (Tabela 6), respectivamente. Por outro lado, em condições de desnaturação, a HspA8 apresentou um deslocamento espectral para  $\langle\lambda\rangle$  e  $\lambda_{\max}$  de  $358,1 \pm 0,2$  nm e  $349 \pm 1$  nm, respectivamente. (Figura 15B, inserto). Assim como observado para a HspA5, tais valores indicam que os 2 resíduos de W da HspA8 se encontram em um ambiente parcialmente exposto ao solvente, e que na presença de ureia se tornam totalmente expostos ao solvente. O delta de  $\lambda_{\max}$  da HspA8 em tampão em relação à proteína em condições desnaturantes foi de 14 nm, o que sugere que a mesma possui estrutura terciária local enovelada.

**Tabela 6. Parâmetros de Fluorescência intrínseca do Triptofano obtidos para as proteínas humanas HspA5 e HspA8 na ausência e presença de ureia.**

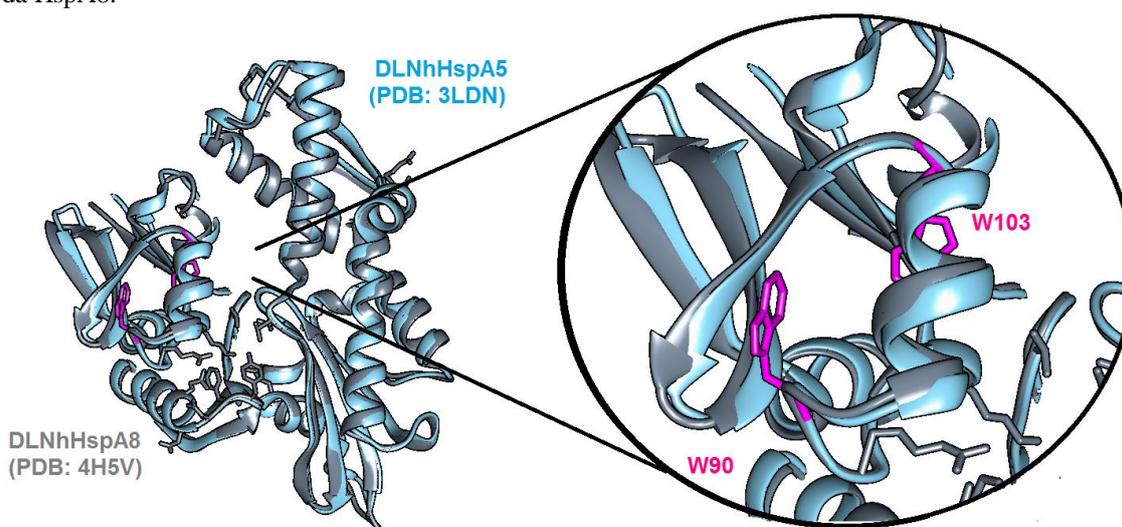
Proteína	Parâmetro de Fluorescência (nm)	APO	Ureia (8 M)
HspA5	$\lambda_{\max}$	$335 \pm 1$	$351 \pm 1$
	$\langle\lambda\rangle$	$348,2 \pm 0,1$	$359,1 \pm 0,1$
HspA8	$\lambda_{\max}$	$335 \pm 1$	$349 \pm 1$
	$\langle\lambda\rangle$	$346,2 \pm 0,3$	$358,1 \pm 0,2$

Fonte: Autoria própria.

Interessantemente, diferente do que foi observado para a HspA5, na presença do agente caotrópico a HspA8 apresentou um aumento na intensidade de emissão de fluorescência, o que pode ter sido resultado de uma maior exposição dos W ao solvente hidrofílico devido à desnaturação, essa característica também está presente na HspA1A (KIRALY et al., 2020). Cabe mencionar que os resíduos de W no DLN de ambas as proteínas não são equivalentes, apesar de próximos na sequência de aminoácidos e estrutura terciária, indicando que estão reportando eventos diferentes (Figura 16).

**Figura 16. Localização dos resíduos de triptofano presentes no domínio DLN das proteínas HspA5 e HspA8.** As estruturas moleculares do DLN das proteínas HspA5 (estrutura azul) e HspA8 (estrutura cinza) são apresentadas e os resíduos de triptofano são destacados em magenta. Embora apresentem

estruturas similares, a posição do resíduo Trp103 da HspA5 não corresponde à mesma do resíduo Trp90 da HspA8.



Fonte: Autoria própria.

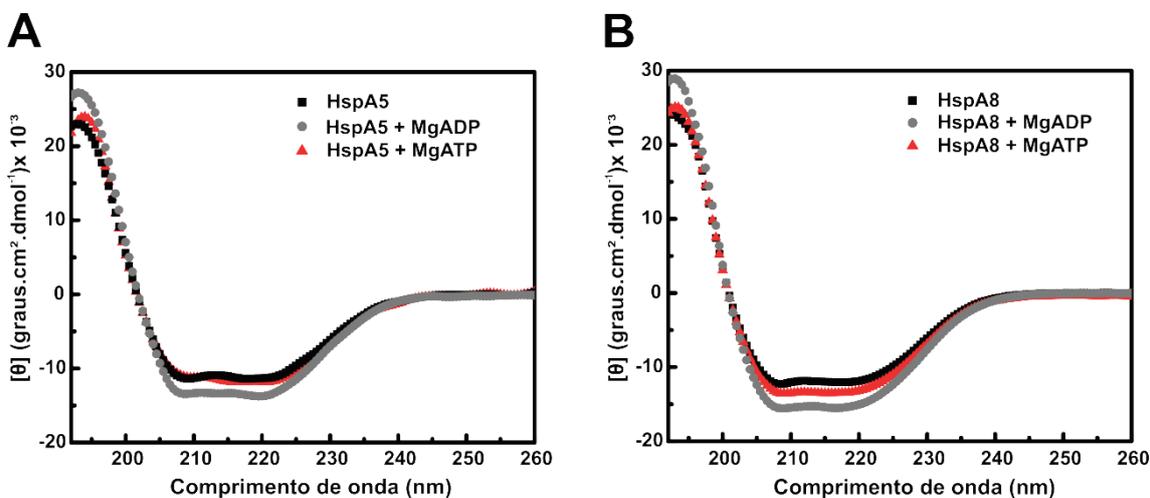
De forma geral, embora compartilhem moderado grau de identidade (Tabela 5) e possuam estruturas secundárias bastante similares (Figura 13A), as proteínas HspA5 e HspA8 apresentam diferenças locais em termos de estrutura terciária (Figura 13B, 14 e 15), o que pode influenciar e resultar nas distintas funções as quais estas chaperonas estão envolvidas (RADONS, 2016; VOSTAKOLAEI et al., 2020).

#### 2.3.4 Investigação das modificações conformacionais causadas pelos nucleotídeos adenosina

Com o intuito de investigar os potenciais efeitos, em termos de estrutura secundária e terciária local, causados pela ligação dos nucleotídeos ATP e ADP às proteínas humanas HspA5 e HspA8, as técnicas de CD e emissão de fluorescência intrínseca foram novamente empregadas. Nestes ensaios as proteínas foram incubadas previamente com os nucleotídeos adenosina (200  $\mu$ M) na presença do cofator metálico  $Mg^{2+}$  (2 mM) e os espectros de CD no UV-distante (Figura 17) e fluorescência<sub>295nm</sub> (Figura 18) posteriormente coletados.

Os dados espectrais de CD (Figura 17A e B), sugerem que na presença dos ligantes MgADP (curvas cinzas) e MgATP (curvas vermelhas), as proteínas HspA5 e HspA8 apresentam mudanças conformacionais sutis em termos de estrutura secundária, o que também foi verificado para as homólogas HspA1A e HspA9 (BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015).

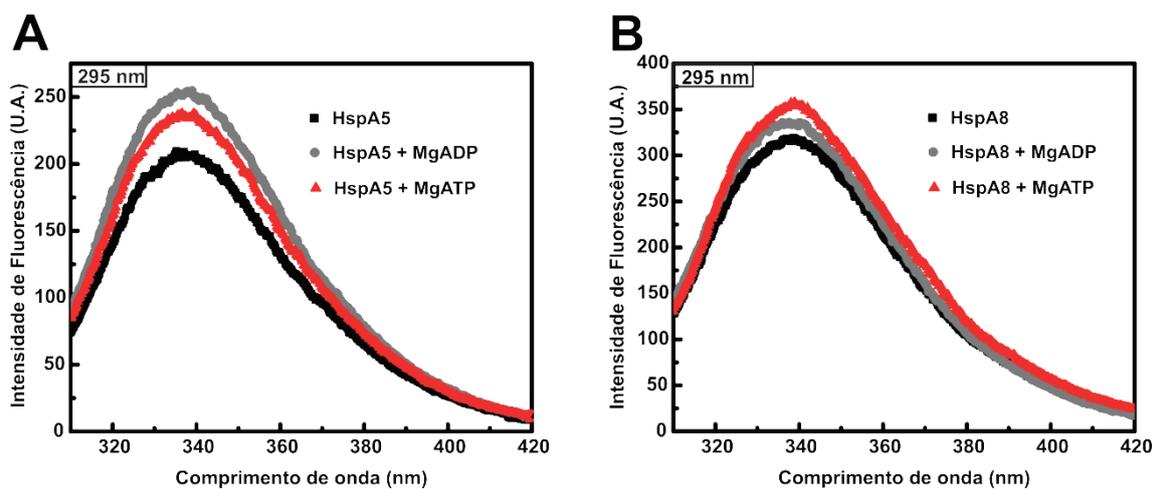
**Figura 17. Espectros de CD das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina.** As proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) tiveram sua caracterização de estrutura secundária analisada frente aos ligantes ADP e ATP na presença de  $Mg^{2+}$ . Ambas proteínas apresentaram modificações conformacionais sutis em termos de estrutura secundária.



Fonte: Autoria própria.

Além de CD, os espectros de emissão de fluorescência das proteínas HspA5 (Figura 18A) e HspA8 (Figura 18B) na presença de MgADP ou MgATP também foram coletados e analisados. De forma similar, ambas as proteínas não sofreram variações significativas em termos de deslocamento espectral (Tabela 7), por outro lado estas chaperonas apresentaram maior intensidade de emissão de fluorescência na presença dos ligantes supracitados. Tal aumento de intensidade pode ser resultado de um maior enterramento dos resíduos de triptofano presentes nestas macromoléculas, indicando que o ambiente de tais aminoácidos é susceptível à ligação dos nucleotídeos. Curiosamente, a maior intensidade de emissão observada para a HspA5 ocorreu na presença de MgADP, enquanto para a HspA8 ocorreu na presença de MgATP, o que sugere diferenças em termos de estrutura terciária local frente à presença dos nucleotídeos adenosina. É importante destacar ainda que tais comportamentos são diferentes dos observados para a proteína homóloga HspA9 (DORES-SILVA et al., 2015) e ortóloga PfHsp70-x (MABATE et al., 2018), as quais apresentaram supressão de fluorescência na presença dos nucleotídeos.

**Figura 18. Espectros de Fluorescência intrínseca do triptofano das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença dos nucleotídeos adenosina.** As proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) quando incubadas com 200  $\mu M$  de nucleotídeos ADP (curvas cinzas) e ATP (curvas vermelhas), na presença de  $Mg^{2+}$ , não sofreram variações significativas em termos de deslocamento espectral (ver Tabela 7), no entanto apresentaram maior intensidade de emissão de fluorescência na presença destes. Interessantemente, enquanto a maior intensidade aconteceu para a HspA5 na presença de MgADP, a maior intensidade para a HspA8 foi observada na presença de MgATP, o que sugere diferenças em termos de estrutura terciária local frente à presença dos nucleotídeos adenosina (ver texto para detalhes).



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 7. Parâmetros de Fluorescência intrínseca do Triptofano obtidos para as proteínas HspA5 e HspA8 na ausência e presença dos nucleotídeos adenosina e Mg<sup>2+</sup>.**

Proteína	Parâmetro de Fluorescência (nm)	APO	<sup>a</sup> ADP (200 µM)	<sup>a</sup> ATP (200 µM)
HspA5	λ <sub>max</sub>	335 ± 1	335 ± 1	332 ± 1
	<λ>	348,2 ± 0,2	346,3 ± 0,1	345,9 ± 0,1
HspA8	λ <sub>max</sub>	335 ± 1	336 ± 1	334 ± 1
	<λ>	346,2 ± 0,2	345,5 ± 0,1	345,9 ± 0,2

<sup>a</sup> Experimentos realizados na presença de MgCl<sub>2</sub> (2 mM).

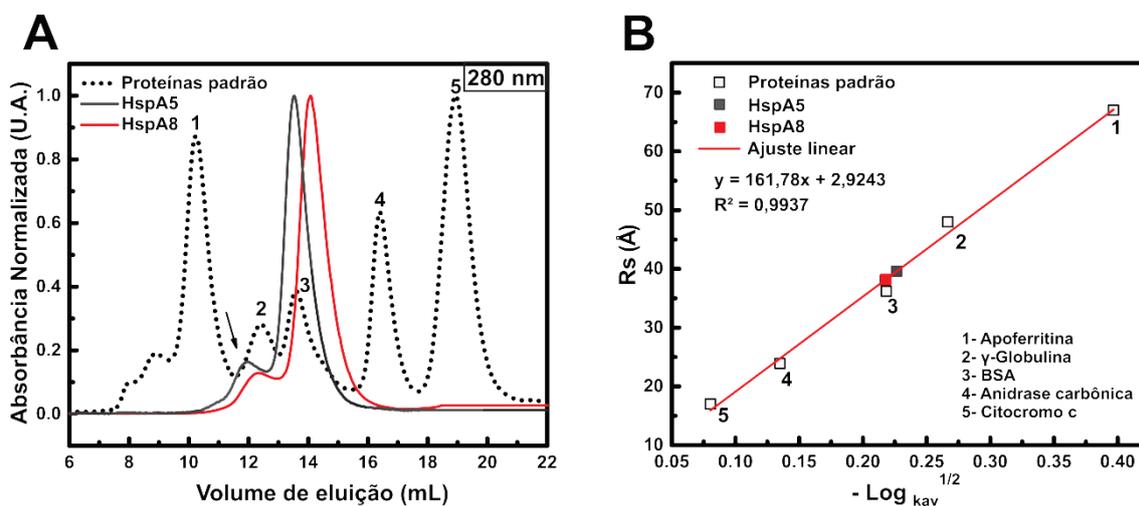
Fonte: Autoria própria.

### 2.3.5 Caracterização hidrodinâmica

Após obter informações acerca da estrutura primária, secundária e terciária das proteínas HspA5 e HspA8, a CEMa foi realizada com o intuito de se determinar se tais proteínas possuíam estrutura quaternária.

A Figura 19A apresenta o perfil de eluição e a determinação do raio de Stokes experimental (Rs) (Figura 19B) obtido para ambas as proteínas Hsp70 humanas em análise. As proteínas HspA5 e HspA8 eluíram com volumes próximos ao da proteína-padrão BSA (67 kDa), apresentando um valor de massa molecular aparente (MM<sub>app</sub>) de 110 ± 10 kDa e 90 ± 10 kDa, respectivamente. O valor de Rs experimental obtido para a proteína HspA5 foi de 40 ± 1 Å e para a HspA8 foi de 38 ± 1 Å. Tais valores (MM<sub>app</sub> e Rs) obtidos por CEMa para ambas Hsp70 foram distintos dos valores teóricos (Tabela 8), o que ser explicado devido ao fato desta técnica considerar as proteínas como moléculas esféricas, o que não acontece na maior parte dos casos.

**Figura 19. Cromatografia de exclusão molecular analítica das proteínas HspA5 e HspA8.** A) Os perfis de eluição das proteínas humanas HspA5 (curva cinza) e HspA8 (curva vermelha) entre as proteínas padrão (1-Apoferritina; 2- $\gamma$ - Globulina; 3-BSA; 4-Anidrase carbônica; 5-Citocromo C, curva tracejada) indicam que elas se comportam majoritariamente como monômeros levemente alongados em solução, mas que também existem como espécies oligoméricas (seta). Ademais, embora a normalização da absorbância demonstre que ambas Hsp70 eluem com volumes próximos à BSA, a proteína HspA5 elui primeiro do que a HspA8, apresentando  $MM_{app}$  de  $110 \pm 10$  kDa e  $90 \pm 10$  kDa, respectivamente. Tais valores, em conjunto com os dados de  $R_s$  e  $f/f_0$ , indicam que a HspA5 apresenta uma conformação estrutural mais alongada do que a HspA8 (ver Tabela 8). B) Estimativa do  $R_s$  das proteínas humanas HspA5 e HspA8, por meio da interpolação utilizando os valores de  $R_s$  teóricos das proteínas-padrão.



Fonte: Autoria própria.

A razão friccional ( $f/f_0$ ), obtida por meio dos dados de  $R_s$  experimentais e teóricos ( $R_{s_{sph}}$ ), é um parâmetro que indica como uma proteína se comporta em solução, sendo que quanto mais próximo de 1 este valor mais esférica é a proteína. Os valores de  $f/f_0$  obtidos para as proteínas HspA5 e HspA8 foram de  $1,4 \pm 0,1$  e  $1,3 \pm 0,1$ , respectivamente. Tais dados, juntamente com seus valores de massa molecular teórica ( $MM$ , 72,0 kDa para HspA5 e 73,0 kDa para a HspA8) e  $MM_{app}$ , sugerem que estas macromoléculas se apresentam como espécies monoméricas ligeiramente alongadas em solução, o que também foi observado para outras Hsp70 (DORES-SILVA et al., 2015, 2017; KIRALY et al., 2020). Interessantemente, embora se comportem majoritariamente como monômeros, picos correspondentes às espécies oligoméricas das Hsp70 em estudo também foram observados pela CEMa (Figura 19A, seta), o que demonstra a similaridade das mesmas com outras proteínas Hsp70 na formação de tais oligômeros (MORGNER et al., 2015; NEMOTO et al., 2006; TAKAKUWA et al., 2019; TRCKA et al., 2019).

**Tabela 8. Dados hidrodinâmicos das proteínas HspA5 e HspA8 obtidos por CEMa.**

Proteína	Parâmetros hidrodinâmicos					
	MM <sup>a</sup> (kDa)	K <sub>av</sub>	MM <sub>app</sub> <sup>b</sup>	R <sub>sph</sub> <sup>a</sup> (Å)	R <sub>s</sub> <sup>b</sup> (Å)	f/f <sub>0</sub> <sup>a,b</sup>
HspA5	72,014	0,35±0,01	110 ± 10	27,6	40 ± 1	1,4 ± 0,1
HspA8	73,062	0,37±0,01	90 ±10	27,7	38 ± 1	1,3 ±0,1

<sup>a</sup> Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácidos das proteínas com His-tag, considerando-as como monômeros, pelo programa *Sednterp*.

<sup>b</sup> Valores calculados usando o coeficiente de partição K<sub>av</sub>, obtido experimentalmente.

Fonte: Autoria própria.

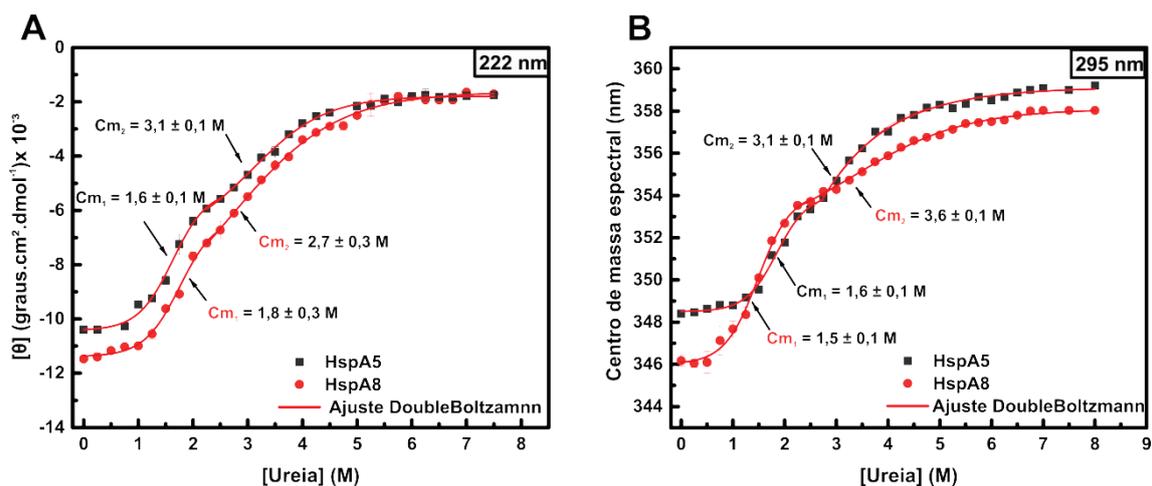
### 2.3.6 Análise da estabilidade química e térmica da HspA5 e HspA8

Com o objetivo de comparar as proteínas humanas HspA5 e HspA8 quanto a sua estabilidade, ensaios de desnovelamento químico e térmico foram realizados.

Nos ensaios de desnaturação química, as proteínas HspA5 e HspA8 foram incubadas previamente com ureia (0 a 8 M) e monitoradas quanto a sua estrutura secundária hélice- $\alpha$  e estrutura terciária local, utilizando as técnicas de CD<sub>222nm</sub> e emissão de fluorescência<sub>295 nm</sub> (Figura 20 e Tabela 9), respectivamente. Para os ensaios de desnovelamento químico com ureia monitorados por CD<sub>222nm</sub> (Figura 20A), a proteína HspA5 apresentou duas concentrações médias de desnaturação (C<sub>m</sub>): 1,6 ± 0,1 M e 3,1 ± 0,1 M. A proteína HspA8 também apresentou duas C<sub>m</sub> quando monitorada por CD<sub>222nm</sub>: 1,8 ± 0,3 M e 2,7 ± 0,3 M.

Ao serem analisadas por fluorescência<sub>295nm</sub> (Figura 20B), duas C<sub>m</sub> também foram observadas para as proteínas HspA5 (1,6 ± 0,1 M e 3,1 ± 0,1 M) e HspA8 (1,5 ± 0,1 M e 3,6 ± 0,1 M). Contudo, diferente da HspA5 que apresentou dados de C<sub>m1</sub> e C<sub>m2</sub> bastante similares por CD<sub>222nm</sub> e fluorescência, a proteína HspA8 apresentou diferenças nas respectivas C<sub>m</sub>, o que pode sugerir a existência de eventos de desnaturação diferentemente observados por monitoramento de estrutura secundária e terciária. De forma geral, estes resultados indicam que as proteínas estudadas aqui são constituídas por pelo menos dois domínios com estabilidades químicas diferentes, o que também foi visto para outras Hsp70 (KIRALY et al., 2020; SHAH et al., 2017).

**Figura 20. Desnovoelamento químico das proteínas HspA5 e HspA8 monitorados por CD<sub>222 nm</sub> e Fluorescência (excitação em 295 nm).** Nos ensaios de desnaturação química monitorados por CD<sub>222nm</sub> (A) e Fluorescência<sub>295nm</sub> (B) as proteínas humanas HspA5 e HspA8 apresentaram duas C<sub>m</sub> cada.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 9. Dados do desenovelamento químico das proteínas HspA5 e HspA8 acompanhado por CD<sub>222 nm</sub> e Fluorescência Intrínseca do triptofano (excitação em 295 nm).**

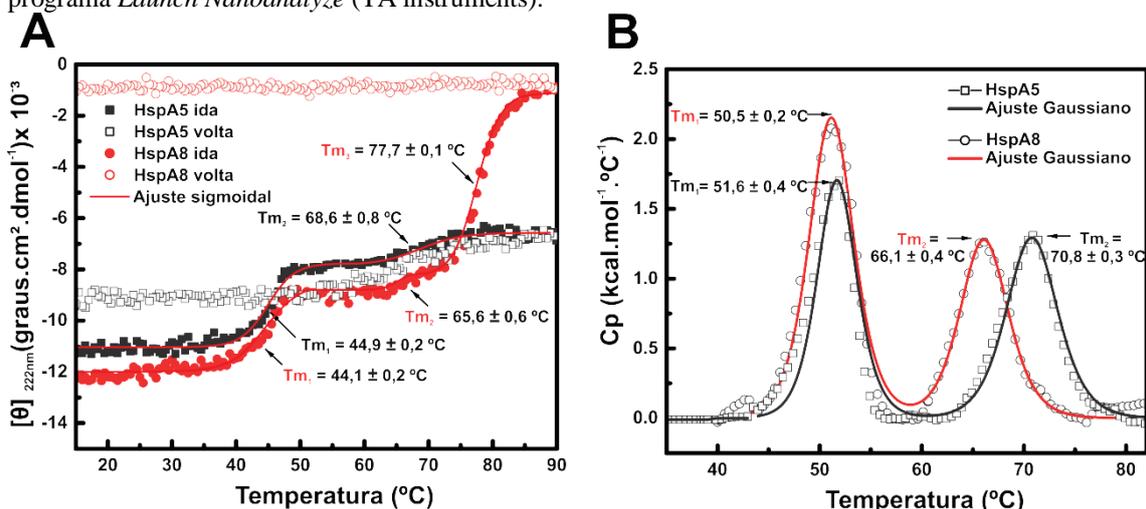
Proteína	Desenovelamento Químico *			
	CD <sub>222nm</sub>		<λ>	
	Cm <sub>1</sub> (M)	Cm <sub>2</sub> (M)	Cm <sub>1</sub> (M)	Cm <sub>2</sub> (M)
HspA5	1,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1
HspA8	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1

\* Ensaio realizado utilizando o agente caotrópico ureia (0 – 8 M).

Fonte: Autoria própria.

Além dos ensaios de estabilidade química, também foram realizados experimentos para a avaliação da estabilidade térmica das proteínas humanas HspA5 e HspA8 monitorada por CD<sub>222nm</sub> e DSC. A proteína HspA5 quando submetida à desnaturação térmica monitorada por CD<sub>222nm</sub> apresentou duas Tms,  $44,9 \pm 0,2$  °C e  $68,6 \pm 0,8$  °C, em um processo de desnaturação parcialmente reversível para a segunda transição térmica (Figura 21A). Curiosamente, assim como observado para a homóloga HspA9 (KIRALY et al., 2020) e ortóloga LbmtHsp70 (DORES-SILVA et al., 2017), ao ser desnaturada termicamente por CD<sub>222nm</sub> até 90 °C a HspA5 manteve parte de sua estrutura (cerca de  $-6000$  graus  $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$ ), demonstrando que potencialmente deve existir ainda uma terceira transição térmica a qual não foi observada nas condições experimentais realizadas. Por outro lado, o processo de desnaturação térmica da HspA8 monitorado por CD<sub>222nm</sub> apresenta três Tm, sendo duas evidentes ( $44,1 \pm 0,2$  °C e  $77,7 \pm 0,1$  °C) e uma bem discreta ( $65,6 \pm 0,6$  °C), em um processo de desenovelamento completamente irreversível com perda total da estrutura proteica em 222 nm (Figura 21A), o que também foi observado para a homóloga HspA1A (BORGES; RAMOS, 2006). Esses dados sugerem que em termos de estabilidade térmica, acompanhada por CD para estrutura secundária hélice- $\alpha$ , a proteína HspA5 é mais similar às proteínas Hsp70 mitocondriais enquanto a HspA8 é mais similar à homóloga citossólica.

**Figura 21. Desnaturação térmica das proteínas humanas HspA5 e HspA8 monitorada por CD (222 nm) e DSC.** A) As proteínas HspA5 e HspA8 foram submetidas à desnaturação térmica por CD<sub>222nm</sub> e em ambos os casos foram observadas duas T<sub>m</sub> evidentes, enquanto uma terceira T<sub>m</sub> pouco evidente foi observada para a HspA8 em torno de 65 °C. Adicionalmente, enquanto a HspA8 se desnaturou em um processo completamente irreversível, a HspA5 apresentou reversibilidade parcial para a segunda transição. Interessantemente, embora a HspA8 perca todo o sinal em 222 nm, a HspA5 retém parte do sinal de CD (cerca de -6000 graus dmol<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>). Em todos os casos se aplicou o ajuste sigmoidal DoubleBoltzmann disponível no Origin. B) Os termogramas de desnaturação térmica das proteínas HspA5 e HspA8 monitorada por DSC são apresentados e, em ambos os casos duas transições de desenovelamento foram observadas. Os dados foram tratados por ajustes gaussianos disponíveis no programa *Launch Nanoanalyze* (TA instruments).



Fonte: Autoria própria.

Os ensaios de desnaturação térmica das proteínas HspA5 e HspA8 monitorados por DSC são apresentados na Figura 21B. A proteína HspA5 quando submetida à desnaturação térmica monitorada por DSC apresentou duas T<sub>m</sub>s, 51,6 ± 0,4 °C e 70,8 ± 0,3 °C, em um processo de desnaturação irreversível (dados não mostrados). De maneira similar, a proteína HspA8 também apresentou irreversibilidade no processo de desnaturação monitorado por DSC (dados não mostrados) e duas T<sub>m</sub> bastante evidentes, 50,5 ± 0,2 °C e 66,1 ± 0,4 °C, o que também foi observado para outras Hsp70 (KIRALY et al., 2020; LAMB et al., 2006; SHAH et al., 2017).

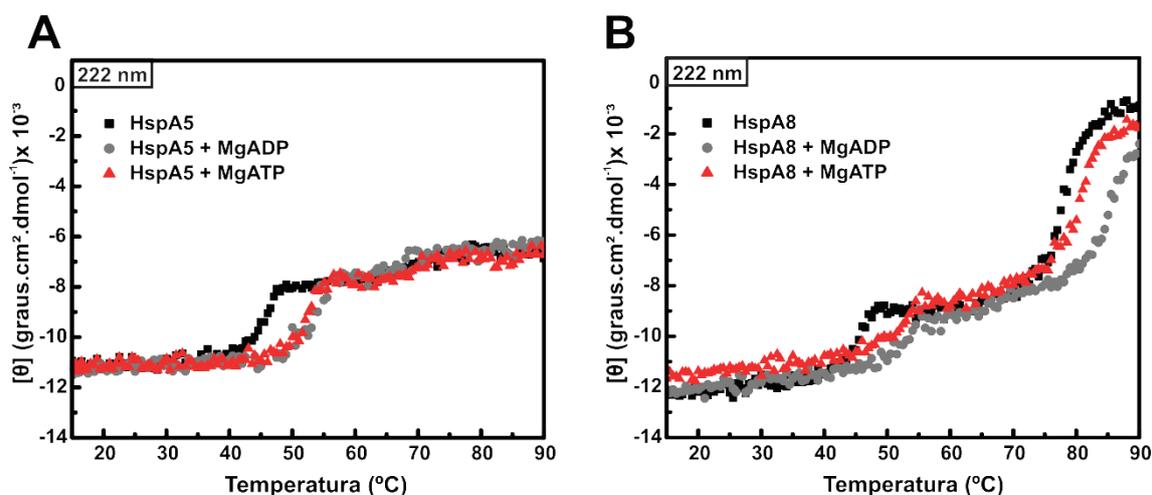
### 2.3.7 Investigação da estabilidade térmica das proteínas HspA5 e HspA8 frente aos nucleotídeos adenosina e cofatores metálicos

Com o objetivo de verificar o efeito causado pelos nucleotídeos adenosina e cofatores metálicos em cada uma das transições térmicas das proteínas HspA5 e HspA8, ensaios de desnaturação induzida termicamente foram realizados por CD<sub>222nm</sub> e DSC.

A Figura 22A apresenta a desnaturação térmica da proteína HspA5 monitorada por CD<sub>222nm</sub> na presença e ausência dos ligantes MgADP e MgATP. Assim como visto anteriormente, a proteína HspA5 apresenta duas transições térmicas monitoradas por CD<sub>222nm</sub> sob aquecimento até 90 °C (Figura 21A), interessantemente houve um

incremento substancial no valor da  $T_m$  para a primeira transição na presença dos nucleotídeos adenosina. Quando incubada com MgADP a  $T_{m1}$  da HspA5 passou de  $44,9 \pm 0,2$  °C para  $52,9 \pm 0,2$  °C, por outro lado ao ser incubada com MgATP passou para  $51,8 \pm 0,2$  °C, com um aumento na estabilização térmica de 6,7 e 8 °C, respectivamente (Tabela 10). Contudo, a presença dos nucleotídeos adenosina não afetou significativamente a estabilidade da  $T_{m2}$  monitorada por  $CD_{222nm}$ , que passou de  $68,6 \pm 0,8$  °C para  $69,5 \pm 0,4$  °C e  $69,4 \pm 0,8$  °C, considerando os ligantes MgADP e MgATP, respectivamente. Com base nestes dados, é possível inferir que dentre as transições observadas por  $CD_{222nm}$  somente a primeira corresponde ao DLN da HspA5, o que também foi visto para a ortóloga mitocondrial LbmtHsp70 (DORES-SILVA et al., 2017).

**Figura 22. Curvas de desnaturação térmica das proteínas HspA5 e HspA8, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina, monitoradas por CD (222nm).** O processo de desenovelamento térmico das proteínas humanas HspA5 (A) e HspA8 (B) foram monitorados por  $CD_{222nm}$  na presença dos ligantes MgADP e MgATP, apresentado duas  $T_m$  cada uma delas (ver Tabela 10 para detalhes). Embora somente a primeira transição da HspA5 tenha sido estabilizada na presença dos nucleotídeos adenosina, ambas as transições da HspA8 sofreram estabilização térmica, indicando que o DLN está relacionado à uma das transições da primeira proteína e às duas transições da segunda (ver texto para detalhes).



Fonte: Autoria própria.

Curiosamente, a primeira e a terceira transição de desnaturação térmica da proteína HspA8 monitorada por  $CD_{222nm}$  foram estabilizadas na presença dos ligantes MgADP e MgATP (Figura 22B). A  $T_{m1}$  da HspA8 passou de  $44,1 \pm 0,2$  °C para  $54,7 \pm 0,7$  °C e  $52,3 \pm 0,5$  °C, considerando as condições ligadas à MgADP e MgATP, respectivamente. Por outro lado, a  $T_{m3}$  da HspA8 passou de  $77,7 \pm 0,1$  °C para  $85,7 \pm 0,4$  °C na presença de MgADP e para  $80,4 \pm 0,1$  °C na presença de MgATP (Tabela 10). As variações observadas em relação à  $T_{m1}$  e à  $T_{m3}$  da HspA8 na presença de MgADP gerou uma estabilização de 10,6 °C e 8 °C, respectivamente. Adicionalmente, a estabilização gerada pela ligação do MgATP à HspA8 foi de 8,3 °C e 2,7 °C para a  $T_{m1}$

e  $T_{m3}$ , respectivamente. Neste sentido, devido a tais variações térmicas observadas, pode-se inferir que ambas transições térmicas ( $T_{m1}$  e  $T_{m3}$ ) apresentadas pela proteína HspA8 ao ser monitorada por  $CD_{222nm}$  estão relacionadas ao DLN desta chaperona, o que também foi verificado para a isoforma citossólica HspA1A (BORGES; RAMOS, 2006). Ademais, conforme mostrado por Montgomery e colaboradores (MONTGOMERY; MORIMOTO; GIERASCH, 1999), a  $T_{m1}$  das Hsp70 está relacionada ao sítio de ligação ao nucleotídeo presente no DLN, enquanto a  $T_{m2}$  está relacionada ao desenovelamento do DLP e a  $T_{m3}$  corresponde às porções restantes de ambos os domínios.

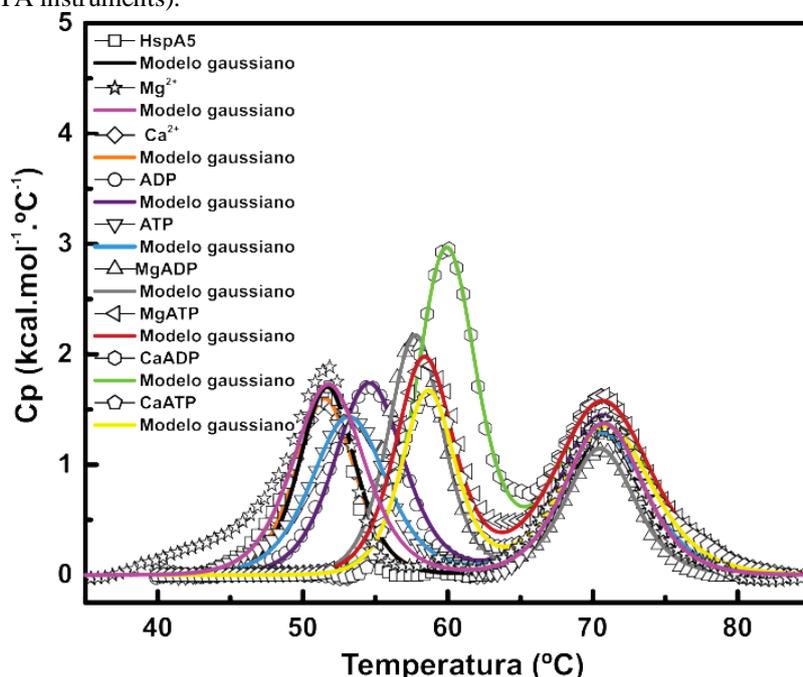
As transições térmicas das proteínas HspA5 e HspA8 na presença dos nucleotídeos adenosina também foram estudadas por DSC. A Figura 23 apresenta os termogramas da proteína HspA5 frente à presença de diferentes ligantes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , ADP, ATP, MgADP, CaADP, MgATP e CaATP). Interessantemente, em todas as condições testadas foi observado o aumento de estabilidade térmica somente para a  $T_{m1}$  dessa chaperona, com exceção das condições  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  em que não houve modificação da estabilidade nem para a  $T_{m1}$  nem para  $T_{m2}$  (Tabela 10).

Além de não ser estabilizada por nucleotídeos, a segunda transição da HspA5 acompanhada por DSC ( $70,8 \pm 0,3$  °C) é similar àquela obtida por  $CD_{222nm}$  (Figura 21A), o que indica que ambas as transições correspondem a mesma transição, ou seja, à segunda transição das Hsp70 que está relacionada somente à desnaturação do DLP (MONTGOMERY; MORIMOTO; GIERASCH, 1999; SHAH et al., 2017). Embora os nucleotídeos ATP e ADP causem o aumento da  $T_{m1}$  da HspA5, dentre eles o que mais estabiliza termicamente o DLN dessa chaperona é o ADP, fazendo com que a  $T_{m1}$  ganhe 3 °C de estabilidade, enquanto o ATP somente 1,6 °C.

De forma sinérgica, a presença dos íons metálicos  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  potencializa o efeito de estabilidade causado pelos nucleotídeos na  $T_{m1}$  da HspA5 (Tabela 10), sugerindo o fortalecimento da ligação por meio de tais cofatores (BORGES; RAMOS, 2006). Cabe destacar ainda que dentre todas as condições experimentalmente testadas, a que mais favoreceu a estabilização térmica da HspA5 foi a ligação ao ADP na presença de  $Ca^{2+}$ , o que também foi observado para a BiP de hamster (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020). Embora os dados demonstrem que a HspA5 tem sua  $T_{m1}$  aumentada em 6 °C e 8,3 °C quando incubada com MgADP e CaADP, respectivamente, não se observou diferenças significativas quando a proteína foi incubada com MgATP ou CaATP, apresentando valores de  $T_{m1}$  similares (Tabela 10). Isto sugere que o efeito

do  $\text{Ca}^{2+}$  potencializa a estabilidade térmica apenas no estado ADP ligado, o que foi proposto por Preissler e colaboradores (PREISLER et al., 2020) como um mecanismo de regulação da proteostase em que a ligação da BiP de metazoários ao CaADP permite, por meio da alosteria heterotrópica bidirecional, que o DLP tenha maior tempo de interação com a proteína-cliente.

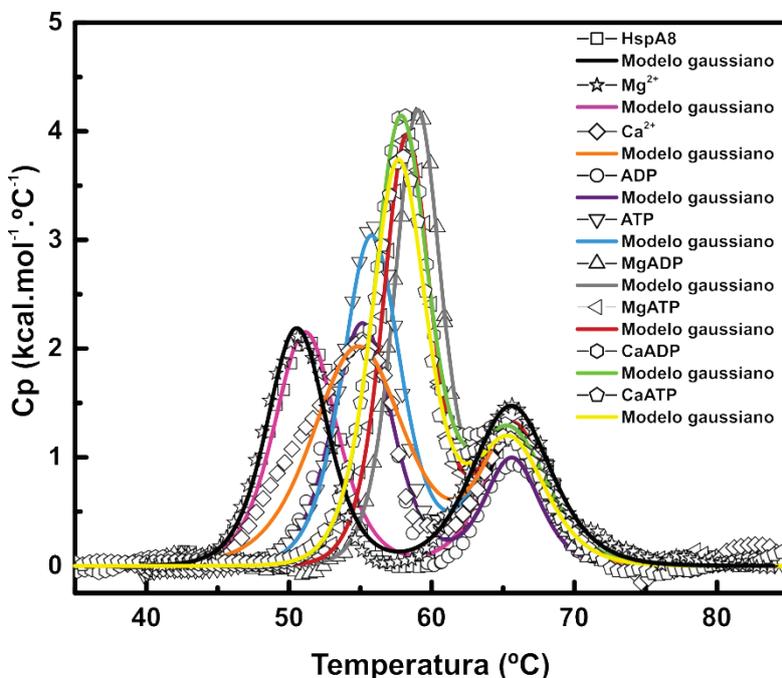
**Figura 23. Desnaturação térmica da proteína HspA5, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina e cofatores, monitorada por DSC.** Em todos os ensaios a HspA5 apresentou duas  $T_m$ , contudo somente a  $T_{m1}$  sofreu estabilização frente aos nucleotídeos (ADP, ATP, MgADP, MgATP, CaADP e CaATP), indicando que esta corresponde ao DLN. Dentre todas as condições estudadas, a responsável por maior estabilização térmica proteica foi a ligação ao ADP na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (linha verde), o que também foi observado para proteínas BiP de mamíferos (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020). Os termogramas foram ajustados utilizando modelos gaussianos do software Launch Nanoanalyze (TA instruments).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 24 apresenta os termogramas da proteína HspA8 na presença de diferentes ligantes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP, ATP, MgADP, CaADP, MgATP e CaATP) monitorados por DSC. Assim como visto para a HspA5, somente a  $T_{m1}$  da HspA8 foi sensível à presença dos nucleotídeos e cofatores metálicos, o que demonstra que da mesma forma que observado para outras Hsp70 essa transição corresponde ao DLN dessa chaperona (BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015, 2017; KIRALY et al., 2020; LAMB et al., 2006; MONTGOMERY; MORIMOTO; GIERASCH, 1999). Ademais, a  $T_{m2}$  obtida por DSC apresenta valor próximo ao observado para a discreta  $T_{m2}$  monitorada por  $\text{CD}_{222\text{nm}}$ , indicando que ambas se tratam da mesma transição e correspondem à desnaturação do DLP (KIRALY et al., 2020; MONTGOMERY; MORIMOTO; GIERASCH, 1999).

**Figura 24. Desnaturação térmica da proteína HspA8, na presença e ausência dos nucleotídeos adenosina e cofatores, monitorada por DSC.** Em todos os ensaios a HspA8 apresentou duas  $T_m$ , contudo, assim como observado para a HspA5, somente a  $T_{m1}$  sofreu estabilização frente aos nucleotídeos (ADP, ATP, MgADP, MgATP, CaADP e CaATP), indicando que esta corresponde ao DLN. Ademais a presença dos íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  também foram capazes de alterar levemente a  $T_{m1}$  dessa chaperona. Dentre todas as condições estudadas, a responsável por maior estabilização térmica proteica foi a ligação ao ADP na presença de  $Mg^{2+}$  (linha cinza). Os termogramas foram ajustados utilizando modelos gaussianos do software Launch Nanoanalyze (TA instruments).



Fonte: Autoria própria.

A presença de 2 mM dos cofatores metálicos  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  foi capaz de aumentar 0,7 °C e 4,4 °C na  $T_{m1}$  da HspA8, respectivamente, sugerindo que a presença destes íons já é capaz de alterar substancialmente a conformação estrutural desta chaperona. Além disso, valores similares de variação de  $T_{m1}$  foram observados para a HspA8 quando a mesma foi monitorada na presença dos nucleotídeos ADP e ATP sozinhos, os quais aumentaram a  $T_{m1}$  em 4,7 °C e 5,3 °C, respectivamente (Tabela 10). Interessantemente, embora a presença dos cofatores tenha aumentado significativamente a estabilidade térmica da HspA8 na presença dos nucleotídeos, as condições que proporcionaram maior  $\Delta T_{m1}$  correspondem aos complexos formados entre esta proteína com os ligantes MgADP ( $\Delta T_{m1} = 8,6$  °C) e MgATP ( $\Delta T_{m1} = 7,8$  °C).

**Tabela 10. Dados do desenovelamento térmico das proteínas HspA5 e HspA8 monitorados por CD<sub>222nm</sub> e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).**

Condição	CD <sub>222nm</sub>			DSC				
	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	T <sub>m3</sub> (°C)	T <sub>m1</sub> (°C)	ΔH <sub>app1</sub> (kJ/mol)	T <sub>m2</sub> (°C)	ΔH <sub>app2</sub> (kJ/mol)	K <sub>D</sub> (μM)*
<b>HspA5</b>	44,9 ± 0,2	68,6 ± 0,8	-	51,6 ± 0,4	150 ± 10	70,8 ± 0,3	140 ± 10	-
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	-	-	-	51,5 ± 0,3	160 ± 10	70,8 ± 0,2	140 ± 10	-
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	-	-	-	51,7 ± 0,2	150 ± 10	70,8 ± 0,2	115 ± 10	-
<b>ADP</b>	-	-	-	54,6 ± 0,1	130 ± 10	70,7 ± 0,2	120 ± 10	27,0 ± 2
<b>ATP</b>	-	-	-	53,2 ± 0,2	120 ± 10	70,7 ± 0,2	120 ± 10	94,0 ± 5
<b>MgADP</b>	52,9 ± 0,2	69,5 ± 0,4	-	57,8 ± 0,2	170 ± 10	70,5 ± 0,2	150 ± 10	2,6 ± 0,2
<b>CaADP</b>	-	-	-	59,9 ± 0,1	160 ± 10	70,7 ± 0,2	120 ± 10	0,6 ± 0,1
<b>MgATP</b>	51,8 ± 0,2	69,4 ± 0,8	-	58,4 ± 0,2	160 ± 10	70,7 ± 0,1	110 ± 10	1,7 ± 0,1
<b>CaATP</b>	-	-	-	58,7 ± 0,2	180 ± 20	71 ± 0,3	110 ± 10	1,4 ± 0,1
<b>HspA8</b>	44,1 ± 0,2	65,6 ± 0,6	77,7 ± 0,1	50,5 ± 0,2	150 ± 10	66,1 ± 0,4	130 ± 10	-
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	-	-	-	51,2 ± 0,1	140 ± 10	65,4 ± 0,3	130 ± 20	3065 ± 250
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	-	-	-	54,9 ± 0,3	100 ± 10	65,7 ± 0,2	150 ± 10	90 ± 15
<b>ADP</b>	-	-	-	55,2 ± 0,2	150 ± 20	65,6 ± 0,2	160 ± 15	13,2 ± 1,1
<b>ATP</b>	-	-	-	55,8 ± 0,4	160 ± 10	65,5 ± 0,2	150 ± 10	8,0 ± 1,5
<b>MgADP</b>	54,7 ± 0,7	66,3 ± 0,7	85,7 ± 0,4	59,1 ± 0,1	200 ± 20	65,9 ± 0,2	160 ± 10	0,8 ± 0,1
<b>CaADP</b>	-	-	-	57,9 ± 0,1	170 ± 10	65,5 ± 0,2	130 ± 10	1,1 ± 0,1
<b>MgATP</b>	52,3 ± 0,6	66,2 ± 0,6	80,4 ± 0,1	58,3 ± 0,2	190 ± 10	65,8 ± 0,3	150 ± 10	1,4 ± 0,2
<b>CaATP</b>	-	-	-	57,7 ± 0,2	170 ± 10	65,5 ± 0,2	130 ± 10	1,3 ± 0,1

\* Valores calculados a partir da Equação 8 (LAMB et al., 2006).

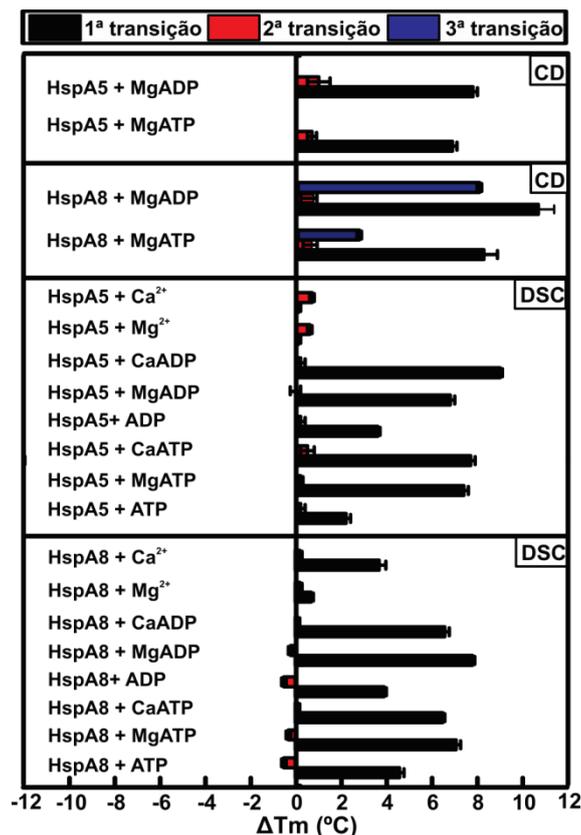
Fonte: Autoria própria.

Através dos ensaios de DSC foi possível calcular a K<sub>D</sub> das proteínas humanas HspA5 e HspA8 na presença dos diferentes ligantes. Como apresentado pela Equação 8, o cálculo de K<sub>D</sub> leva em consideração não somente o valor de T<sub>m</sub> mas também a entalpia de desnaturação aparente (ΔH<sub>app</sub>) e, como visto na Tabela 10, a afinidade de ambas HspA5 e HspA8 pelos nucleotídeos ATP e ADP é aumentada na presença dos cofatores metálicos. Enquanto a maior afinidade observada para a HspA5 ocorreu na presença de CaADP (0,6 ± 0,1 μM), para a HspA8 foi observada na presença de MgADP (0,8 ± 0,1 μM). Tais dados sugerem que existem diferenças em termos de estabilização dos complexos proteicos na presença de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> para tais macromoléculas. Enquanto o Ca<sup>2+</sup> aumenta em até 45 vezes a afinidade da HspA5 pelo ADP, um efeito de apenas 12 vezes é observado a HspA8. Contudo, para o íon Mg<sup>2+</sup> se observa o oposto, o qual aumenta em 10 vezes e 17 vezes a afinidade das proteínas HspA5 e HspA8 pelo ADP, respectivamente (Tabela 10). Curiosamente, ensaios de fluorimetria de varredura diferencial (DSF) e cristalografia mostraram que a maior diminuição na flexibilidade estrutural conferida pela ligação do CaADP ao DLN de Hsp70s localizadas no RE contribui para que haja a inibição relativamente mais forte da liberação de ADP pelo Ca<sup>2+</sup>, resultando em uma ligação mais forte entre as erHsp70 do que com as de outros compartimentos celulares (PREISSLER et al., 2020).

Surpreendentemente, enquanto o  $\text{Ca}^{2+}$  não alterou significativamente a estabilidade térmica da HspA5, foi observado um aumento substancial de 4,4 °C na  $T_{m1}$  da HspA8 demonstrando que esta proteína pode interagir com o  $\text{Ca}^{2+}$ . Além de interessantes, estes dados levantam hipóteses acerca da potencial atuação do  $\text{Ca}^{2+}$  como um modulador da chaperona HspA8 e do papel desta no sequestro deste íon, ainda que a nível citossólico seja observada menor concentração do mesmo quando em comparação com o RE (LAMB et al., 2006; PREISLER et al., 2020), por exemplo. Ademais, há relatos na literatura que reportam que a deleção de proteínas Hsp70 citossólicas pode afetar a homeostase do cálcio e que alterações na concentração intracelular deste íon podem induzir a expressão de Hsp70 citossólicas (DE OLIVEIRA et al., 2021; TUPLING et al., 2008). Um estudo realizado por Liu e colaboradores (LIU et al., 2006) mostrou que o bloqueio da síntese da Hsc70 em miócito ventricular de rato ocasiona a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  e maiores efeitos sobre lesões cardíacas, o que sugere que esta proteína ortóloga pode interagir com este íon e mediar a homeostase do mesmo (TUPLING et al., 2008).

De forma geral, os dados apresentados nesta seção demonstram que existem diferenças estruturais nas proteínas HspA5 e HspA8 que afetam a estabilidade térmica das mesmas, de forma que enquanto foi possível observar 3 transições térmicas para a HspA8, somente duas foram observadas para a HspA5 pelas técnicas utilizadas. Além disso, os estudos aqui realizados reafirmam a ideia apresentada na seção 2.3.4 de que os nucleotídeos adenosina são capazes de interagir e alterar estruturalmente a conformação das proteínas Hsp70 em análise. Por fim, diferenças quanto à ligação destes nucleotídeos a essas chaperonas na presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  também foram observadas, indicando que tais íons podem afetar de forma diferencial a estrutura das mesmas ou até mesmo o sítio pelo qual estas interagem com os nucleotídeos adenosina. Todos os dados de variação das Tms para as chaperonas aqui estudadas mediante todas as condições testadas são apresentados na Figura 25.

**Figura 25. Variação das transições térmicas das proteínas HspA5 e HspA8 monitoradas por CD (222 nm) e DSC na presença de ligantes.** O gráfico de variação das Tms, expressa como  $\Delta T_m$  (°C), das proteínas HspA5 e HspA8 submetidas a diferentes condições experimentais monitoradas por  $\text{CD}_{222\text{nm}}$  e DSC é apresentado. As barras em preto, vermelho e azul correspondem respectivamente à  $\Delta T_{m1}$ ,  $\Delta T_{m2}$  e  $\Delta T_{m3}$  das proteínas hHsp70. Os cálculos foram realizados mediante subtração da  $T_m$  das proteínas em estudo em sua forma apo.



Fonte: Autoria própria.

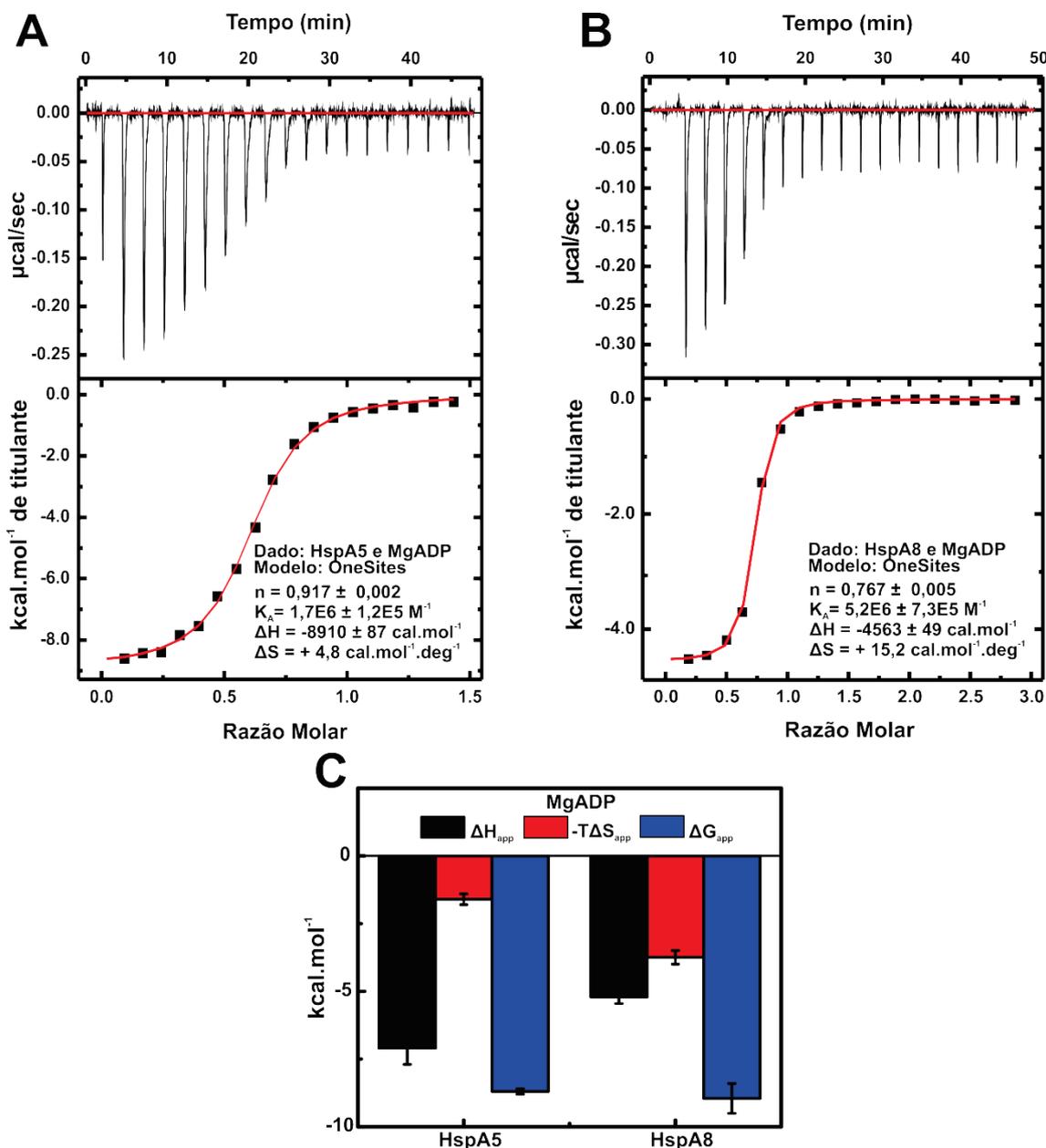
### 2.3.8 Análise termodinâmica das interações entre a HspA5 e HspA8 com os nucleotídeos ATP e ADP

Com o intuito de se estudar a interação das proteínas humanas HspA5 e HspA8 com os nucleotídeos adenosina, ensaios de ITC foram realizados. A Figura 26 apresenta os isotermogramas (painéis superiores) obtidos para a titulação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) com MgADP, a 20 °C. Os painéis inferiores apresentados correspondem ao ajuste dos dados experimentais resultando nos dados de assinatura termodinâmica ( $\Delta G_{app}$ ,  $\Delta H_{app}$  e  $\Delta S_{app}$ ).

As titulações com MgADP indicam uma interação exotérmica entre as proteínas HspA5 e HspA8 com  $\Delta H_{app}$  de  $-8900 \pm 500 \text{ cal.mol}^{-1}$  e  $\Delta H_{app}$  de  $-4600 \pm 300 \text{ cal.mol}^{-1}$ , respectivamente. Interessantemente, embora a  $\Delta H_{app}$  tenha sido similar entre a HspA8 e as homólogas para HspA1A ( $-3500 \pm 50 \text{ cal.mol}^{-1}$ ) (BORGES; RAMOS, 2006) e HspA9 ( $-4600 \pm 100 \text{ cal.mol}^{-1}$ ) (DORES-SILVA et al., 2015), o valor observado para a HspA5 é maior o que sugere que o processo de ligação desta chaperona ao MgADP libera mais calor do que quando comparado as demais.

**Figura 26. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com MgADP.** A interação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) com MgADP apresentam valores similares de  $K_D$  de  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ . Além disso, os isotermogramas sugerem que as interações são impulsionadas tanto pela entropia quanto pela entalpia. Painel superior: os picos negativos indicam o calor liberado em cada uma das titulações e a linha vermelha representa a linha de base. Painel inferior: os valores de  $\Delta H_{app}$  foram obtidos integrando

cada pico das titulações apresentadas no painel superior e ajustados contra a razão molar nucleotídeo/hHsp70. Os dados foram ajustados ao modelo de ajuste de curva *One Set of Sites* fornecido pelo programa Origin. Os parâmetros de ajuste são mostrados na Figura e Tabela 11. C) Gráficos de barras que resumem as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta H_{app}$ ,  $-\Delta S_{app}$  e  $\Delta G_{app}$ ) para a interação das proteínas HspA5 e HspA8, com MgADP, as quais apresentam perfis termodinâmicos semelhantes.



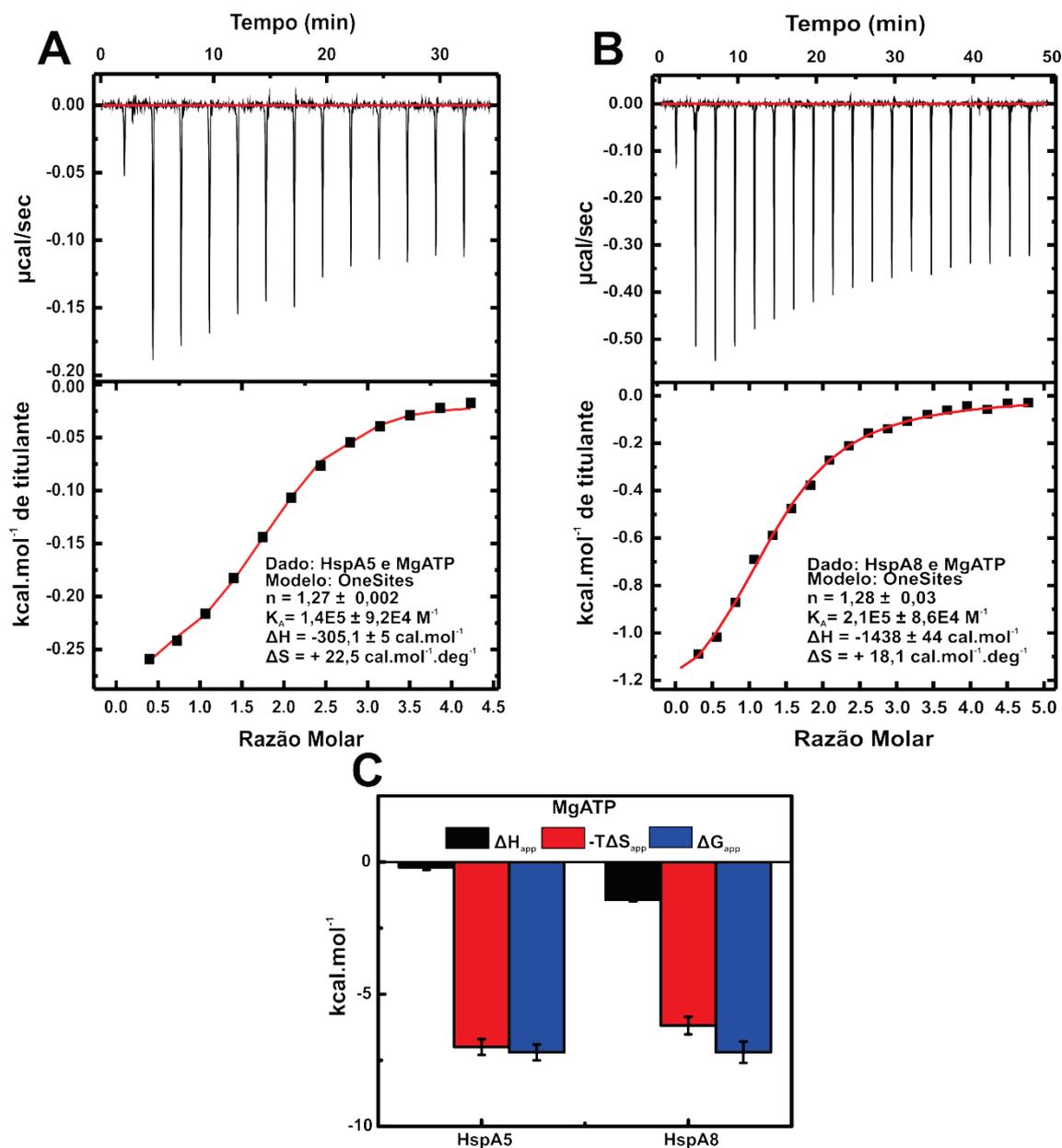
Os dados observados para  $\Delta S_{app}$  foram maiores para a HspA8 ( $+14 \pm 2 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) do que para a HspA5 ( $+5 \pm 1 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), indicando que o processo de ligação ao MgADP pela Hsp70 cognata é mais favorecido entropicamente do que para a HspA5. Ademais, além de similares entre si, os valores de  $\Delta G_{app}$  obtidos para a HspA5 ( $-8700 \pm 100 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e HspA8 ( $-8900 \pm 200 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) frente ao MgADP foram semelhantes aos registrados para as homólogas HspA9 e HspA1A (ARAKAWA et al., 2011; BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015) e ortóloga LbmtHsp70

(DORES-SILVA et al., 2017). O gráfico de barras que resume as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta G_{app}$ ,  $\Delta H_{app}$  e  $-T\Delta S_{app}$ ) das proteínas HspA5 e HspA8 no processo de ligação ao MgADP está apresentado na Figura 26C.

A Figura 27 apresenta os isotermogramas (painéis superiores) para as proteínas humanas HspA5 (A) e HspA8 (B) tituladas com o ligante MgATP, a 20 °C. Curiosamente, a interação entre as proteínas HspA5 e HspA8 ao MgATP exibiu os respectivos valores de  $\Delta H_{app}$  exotérmicos de  $-250 \pm 50 \text{ cal.mol}^{-1}$  e  $-1400 \pm 100 \text{ cal.mol}^{-1}$ , os quais são menores quando comparados à HspA1A ( $-5800 \pm 100 \text{ cal.mol}^{-1}$ ) (BORGES; RAMOS, 2006), mas semelhantes a HspA9 ( $-1400 \pm 20 \text{ cal.mol}^{-1}$ ) (DORES-SILVA et al., 2015). Além disso, os valores observados para  $\Delta S_{app}$  de  $+22 \pm 1 \text{ cal mol}^{-1}$  e  $+22 \pm 3 \text{ cal.mol}^{-1}$  para as proteínas HspA5 e HspA8, respectivamente, foram semelhantes aos encontrados para HspA9 (DORES-SILVA et al., 2015). Portanto, além da HspA5 apresentar um perfil de interação ao MgATP menos exotérmico do que a HspA1A, HspA8 e HspA9, sua assinatura termodinâmica bem como a assinatura da HspA8 para a ligação ao MgATP se assemelham mais à homóloga mitocondrial do que a isoforma citossólica.

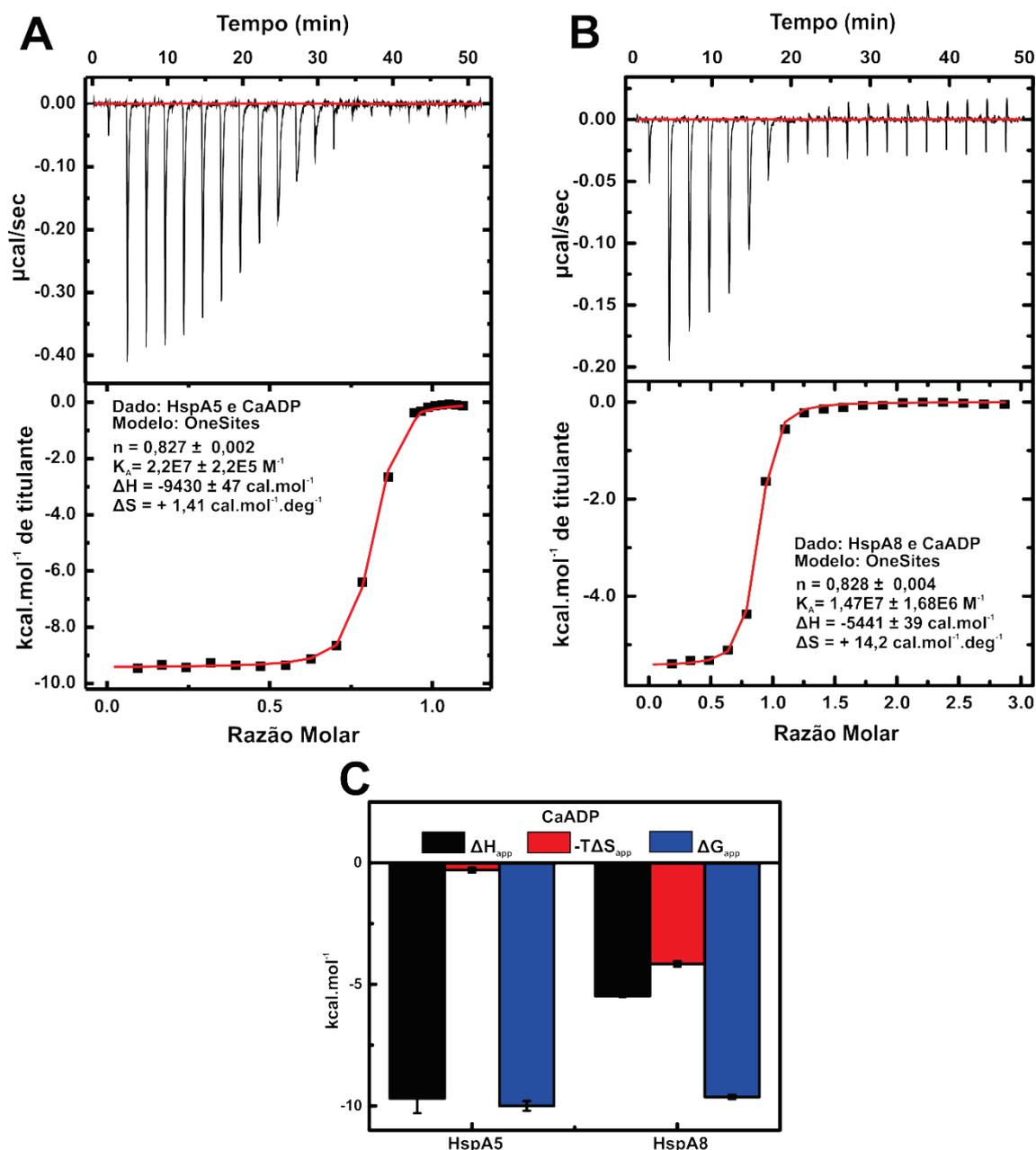
Os valores de  $\Delta G_{app}$  de  $-7200 \pm 300 \text{ cal.mol}^{-1}$  e  $-7100 \pm 100 \text{ cal.mol}^{-1}$  obtidos para a interação de MgATP com as proteínas HspA5 e HspA8, respectivamente, foram menores do que aqueles encontrados para a HspA1A e HspA9 (ambas  $-8200 \text{ cal.mol}^{-1}$ ) (BORGES; RAMOS, 2006; DORES-SILVA et al., 2015), indicando que as Hsp70 em estudo tem menor afinidade para MgATP. O gráfico de barras que resume as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta G_{app}$ ,  $\Delta H_{app}$  e  $-T\Delta S_{app}$ ) das proteínas HspA5 e HspA8 no processo de ligação ao MgATP está apresentado na Figura 27C.

**Figura 27. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com MgATP.** A interação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) com MgATP apresentam valores similares de  $K_D$  de  $4,0 \pm 1 \mu\text{M}$  e de  $5,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , respectivamente. Além disso, os isotermogramas sugerem que as interações são impulsionadas mais por entalpia do que por entropia, sendo diferentes da homóloga HspA1A (BORGES; RAMOS, 2006). Painel superior: os picos negativos indicam o calor liberado em cada uma das titulações e a linha vermelha representa a linha de base. Painel inferior: os valores de  $\Delta H_{app}$  foram obtidos integrando cada pico das titulações apresentadas no painel superior e ajustados contra a razão molar nucleotídeo/hHsp70. Os dados foram ajustados ao modelo de ajuste de curva *One Set of Sites* fornecido pelo programa Origin. Os parâmetros de ajuste são mostrados na Figura e Tabela 11. C) Gráficos de barras que resumem as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta H_{app}$ ,  $-T\Delta S_{app}$  e  $\Delta G_{app}$ ) para a interação das proteínas HspA5 e HspA8, com MgATP, as quais apresentam perfis termodinâmicos semelhantes.



A Figura 28 apresenta os isotermogramas (painéis superiores) obtidos para a titulação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) com CaADP, a 20 °C. Os painéis inferiores apresentados correspondem ao ajuste dos dados experimentais resultando nos dados de assinatura termodinâmica ( $\Delta G_{\text{app}}$ ,  $\Delta H_{\text{app}}$  e  $\Delta S_{\text{app}}$ ).

**Figura 28. Análise da interação das proteínas HspA5 e HspA8 tituladas com CaADP.** A interação das proteínas HspA5 (A) e HspA8 (B) com CaADP apresentam valores similares de  $K_D$  de  $40 \pm 10 \text{ nM}$  e de  $70 \pm 10 \text{ nM}$ , respectivamente. Além disso, os isotermogramas sugerem que assim como observado para MgADP, as interações são mais exotérmicas para a HspA5 do que para HspA8, e mais entrópicas para a HspA8. Pannel superior: os picos negativos indicam o calor liberado em cada uma das titulações e a linha vermelha representa a linha de base. Pannel inferior: os valores de  $\Delta H_{\text{app}}$  foram obtidos integrando cada pico das titulações apresentadas no pannel superior e ajustados contra a razão molar nucleotídeo/hHsp70. Os dados foram ajustados ao modelo de ajuste de curva *One Set of Sites* fornecido pelo programa Origin. Os parâmetros de ajuste são mostrados na Figura e Tabela 11. C) Gráficos de barras que resumem as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta H_{\text{app}}$ ,  $-\Delta S_{\text{app}}$  e  $\Delta G_{\text{app}}$ ) para a interação das proteínas HspA5 e HspA8 com CaADP, as quais, conforme os valores de  $\Delta G_{\text{app}}$ , são mais favorecidas por  $\text{Ca}^{2+}$  do que por  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 26 C).



Fonte: Autoria própria.

As titulações com CaADP indicam uma interação exotérmica entre as proteínas HspA5 e HspA8 com  $\Delta H_{app}$  de  $-9700 \pm 600$  cal.mol<sup>-1</sup> e  $\Delta H_{app}$  de  $-5400 \pm 100$  cal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Curiosamente, assim como observado para a titulação com MgADP, o valor de  $\Delta H_{app}$  foi maior para a HspA5, enquanto o valor obtido para a HspA8 foi similar a BiP de hamster ( $-5300 \pm 100$  cal.mol<sup>-1</sup>) (LAMB et al., 2006). Além disso, os dados observados para  $\Delta S_{app}$  também foram maiores para a HspA8 ( $+14 \pm 1$  cal.mol<sup>-1</sup>) do que para a HspA5 ( $+1,4 \pm 0,1$  cal.mol<sup>-1</sup>), indicando que o processo de ligação ao MgADP pela Hsp70 cognata é mais favorecido entropicamente do que para a homóloga reticular. Interessantemente, os valores de  $\Delta G_{app}$  obtidos para a HspA5 ( $-10000 \pm 200$

cal.mol<sup>-1</sup>) e HspA8 (-9600 ± 100 cal.mol<sup>-1</sup>) frente ao CaADP foram maiores do que os obtidos para a interação entre as chaperonas e MgADP (Tabela 11), o que sugere que a ligação destas ao ADP é mais favorecida na presença de Ca<sup>2+</sup> do que de Mg<sup>2+</sup>. O gráfico de barras que resume as assinaturas termodinâmicas ( $\Delta G_{app}$ ,  $\Delta H_{app}$  e  $-T\Delta S_{app}$ ) das proteínas HspA5 e HspA8 no processo de ligação ao CaADP está apresentado na Figura 28C.

Os coeficientes estequiométricos encontrados para a proteína HspA5 e HspA8 para as interações com MgADP, MgATP e CaATP foram de aproximadamente 1 (Tabela 11), sugerindo que cada molécula de chaperona interage com uma molécula de nucleotídeo. Ademais, a  $K_{Dapp}$  de interação entre a HspA5 e HspA8, de 0,3 ± 0,1 μM foi similar ao observado para a HspA1A (BORGES; RAMOS, 2006), enquanto a  $K_{Dapp}$  dessas proteínas, em torno de 5,0 μM, para MgATP foi semelhante ao verificado para a HspA9 (DORES-SILVA et al., 2015). Tais dados sugerem que estas chaperonas apresentam maior afinidade para se ligar ao ADP do que ao ATP na presença de Mg<sup>2+</sup>, o que também foi verificado nos ensaios de DSC e CD<sub>222nm</sub> (ver seção anterior). Ademais, embora compartilhe 86% de identidade com a HspA1A, a  $K_{Dapp}$  da interação ao MgATP é pelo menos 16 vezes menor para a isoforma cognata (BORGES; RAMOS, 2006), o que pode sugerir que o mecanismo de interação entre elas com MgATP apresenta diferenças.

**Tabela 11. Parâmetros experimentais obtidos por ITC para as proteínas HspA5 e HspA8 na presença dos nucleotídeos adenosina ATP e ADP.** Os dados apresentados foram obtidos pela média de pelo menos 3 experimentos independentes a 20 °C.

Propriedade	HspA5			HspA8		
	MgATP	MgADP	CaADP	MgATP	MgADP	CaADP
<b>n</b>	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b><math>\Delta H_{app}</math> (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-0,2 ± 0,1	-7,1 ± 0,6	-9,7 ± 0,6	-1,4 ± 0,1	-4,6 ± 0,3	-5,4 ± 0,1
<b><math>-T\Delta S_{app}</math> (kcal.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>	-7,0 ± 0,3	-1,6 ± 0,2	-0,3 ± 0,1	-6,5 ± 0,3	-4,1 ± 0,5	-4,2 ± 0,1
<b><math>K_A</math> (10<sup>6</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>	0,25 ± 20	32 ± 0,6	29,4 ± 0,8	0,20 ± 0,01	2,8 ± 0,2	15 ± 1
<b><math>\Delta G_{app}</math> (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-7,2 ± 0,3	-8,7 ± 0,1	-10,0 ± 0,2	-7,1 ± 0,1	-8,7 ± 0,2	-9,6 ± 0,1
<b><math>K_D</math> (μM)</b>	4,0 ± 1,0	0,3 ± 0,1	0,04 ± 0,01	5,0 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,07 ± 0,01

Fonte: Autoria própria.

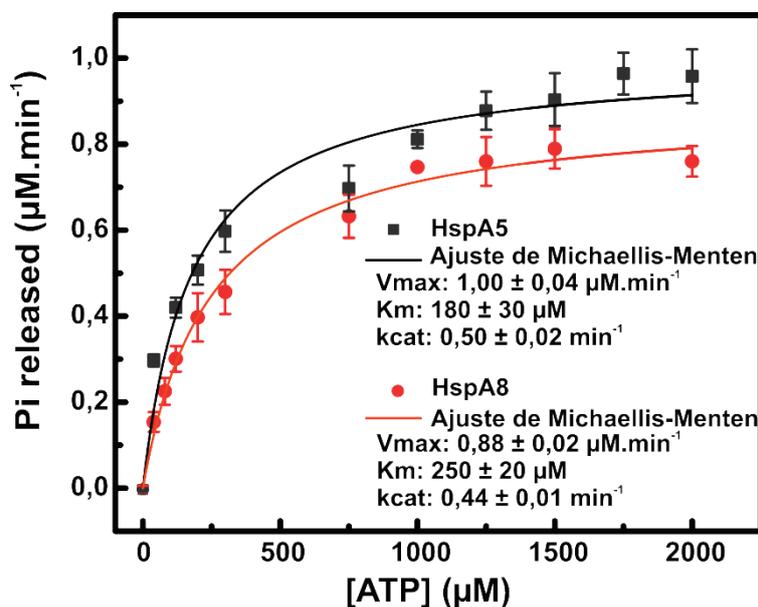
Corroborando com os resultados apresentados na seção 2.3.7., os valores de  $K_{Dapp}$  para a interação entre CaADP e as proteínas HspA5 (40 ± 10 ηM) e HspA8 (70 ± 10 ηM) foram menores do que para a condição MgADP. Ademais, embora os  $K_D$ s obtidos por DSC e ITC tenham sido relativamente diferentes, o ITC é a técnica de maior confiabilidade porque permite a mensuração direta das interações, sendo menos

susceptível a diferentes efeitos (CELEJ et al., 2006; DU et al., 2016). Cabe destacar ainda que as diferenças observadas especialmente para o ATP em termos de  $K_D$  podem ser reflexo do aquecimento constante do DSC, o qual pode induzir a hidrólise térmica do nucleotídeo. Ensaio entre as proteínas Hsp70 em estudo com CaATP foram realizados, porém não foram observadas interações por ITC.

### 2.3.9 Determinação da atividade ATPásica da HspA5 e HspA8

Como forma de direcionar seu ciclo funcional as proteínas Hsp70 hidrolisam ATP em ADP e Pi (KITYK et al., 2015; MAYER; GIERASCH, 2019). Com o intuito de saber se as proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 apresentavam atividade enzimática, ensaios de atividade ATPásica foram realizados. Os parâmetros cinéticos foram ajustados considerando o modelo não-linear de Michaelis-Menten e as curvas são apresentadas na Figura 29.

**Figura 29. Curvas de atividade enzimática das proteínas humanas HspA5 e HspA8.** As proteínas HspA5 e HspA8 (2  $\mu\text{M}$ ) foram incubadas com ATP por 30 min a 37 °C, e a hidrólise do ATP foi monitorada pelo Pi liberado. As curvas foram ajustadas pelo ajuste não linear de Michaelis-menten, a fim de obter os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 12. Os valores sugerem que HspA5 e HspA8 apresentaram baixa atividade ATPásica, e que a HspA5 possui uma constante catalítica maior que HspA8.



Fonte: Autoria própria.

Os dados cinéticos (Tabela 12) sugerem que as proteínas hHsp70 estavam funcionais e apresentavam atividade enzimática, hidrolisando o ATP (Figura 30). Ademais, os valores de  $K_M$  obtidos para a HspA5 ( $180 \pm 30 \mu\text{M}$ ) e HspA8 ( $250 \pm 20 \mu\text{M}$ ) são similares aos observados para as proteínas humanas HspA1A e HspA9 (DORES-SILVA et al., 2015) e maiores do que os publicados para as ortólogas de *P. falciparum* (SILVA et al., 2020b) e *L. braziliensis* (DORES-SILVA et al., 2017).

Interessantemente, a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) obtida para as proteínas em estudo foram maiores do que os das isoformas HspA1A e HspA9, o que resulta em uma maior constante catalítica ( $k_{cat}$ ) e, conseqüentemente, a uma maior eficiência enzimática ( $k_{cat}/K_M$ ).

Embora as Hsp70 em estudo apresentem baixas atividades enzimáticas, tal comportamento é uma característica dessa família de chaperonas, as quais também são reguladas por ligantes, como co-chaperonas e proteínas-clientes (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018; GENEST; WICKNER; DOYLE, 2019; ROSENZWEIG et al., 2019; RYU et al., 2020). Ademais, a baixa taxa na hidrólise de ATP justifica o uso da molécula de ATP e não de um análogo não hidrolisável em todos os experimentos realizados neste trabalho (MINARI et al., 2019).

**Tabela 12. Parâmetros cinéticos da atividade ATPásica das proteínas HspA5 e HspA8 e comparação com outras proteínas Hsp70.**

Proteína	Parâmetros cinéticos				Referência
	$K_M$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu M \cdot min^{-1}$ )	$K_{cat}$ ( $min^{-1}$ )	$K_{cat}/K_M$ ( $\eta M \cdot min^{-1}$ )	
HspA5	180 ± 30	1,00 ± 0,04	0,50 ± 0,02	2.8 ± 0.7	Este estudo.
HspA8	250 ± 20	0,88 ± 0,02	0,44 ± 0,01	1.8 ± 0.4	Este estudo.
HspA1A	270 ± 40	0,21 ± 0,01	0,093 ± 0,04	0.34 ± 0.1	(DORES-SILVA et al., 2015)
HspA9	190 ± 20	0,38 ± 0,01	0,151 ± 0,001	0.79 ± 0.05	(DORES-SILVA et al., 2015)
LbmtHsp70	26 ± 1	0,42 ± 0,01	0,183 ± 0,005	7.04 ± 0.005	(DORES-SILVA et al., 2017)
PfHsp70-1	120 ± 10	0,69 ± 0,02	0,35 ± 0,01	2.92 ± 1	(SILVA et al., 2020b)

Fonte: Autoria própria.

### 2.3.10 Determinação da atividade chaperona da HspA5 e HspA8

A importância das proteínas Hsp70 na prevenção da agregação proteica é tema de diversas revisões científicas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; VALPUESTA, 2018; ROSENZWEIG et al., 2019; SHIBER; RAVID, 2014). Na literatura muito tem sido estudado acerca das preferências em termos de substratos proteicos aos quais essa família de chaperonas está envolvida (CALLONI et al., 2012; KOHLER; ANDRÉASSON, 2020; RYU et al., 2020).

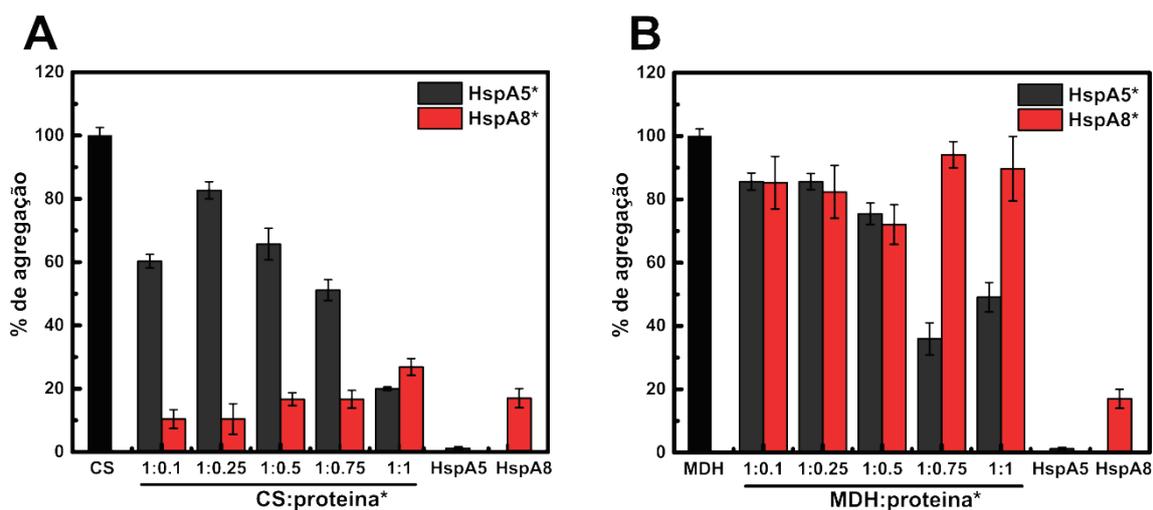
Embora sejam aptas em prevenir a agregação e assistir ao enovelamento de proteínas diversas, as Hsp70 apresentam preferências por clientes que apresentem resíduos hidrofóbicos, especialmente alifáticos, bem como resíduos com cargas positivas, os quais conferem maior especificidade de ligação ao bolsão de interação

presente no subdomínio DLP $\beta$  dessas chaperonas (KOHLER; ANDRÉASSON, 2020). Com base em tais informações duas proteínas modelo foram escolhidas: CS e MDH, as quais apresentam um percentual de resíduos alifáticos e positivamente carregados em torno de 60%. Neste sentido, com o intuito de avaliar a funcionalidade das proteínas recombinantes HspA5 e HspA8 quanto à sua atividade chaperona intrínseca, ensaios de prevenção de agregação induzida por calor foram realizados. Nestes ensaios, o espalhamento de luz (320 nm) das proteínas-modelo sozinhas no tempo de 90 min foi considerado para o cálculo de 100% de agregação (Figura 30).

Os resultados indicam que enquanto a HspA8 foi capaz de prevenir cerca de 90% da agregação da proteína CS mesmo na concentração mais baixa testada (0,1  $\mu$ M), somente em doses 10 vezes maiores de HspA5 foi observado um efeito similar na prevenção de agregação dessa proteína (Figura 30A). Curiosamente, o máximo de prevenção da MDH observado foi de 60% e aconteceu na presença de 0,75  $\mu$ M de HspA5, contudo a HspA8 foi pouco efetiva na prevenção de agregação desta proteína-modelo (Figura 30B). Tais achados sugerem que embora haja redundância funcional na ação da HspA5 e HspA8 para proteínas-clientes existe diferenças em termos de especificidades, o que está em concordância com o que tem sido visto na literatura para a família Hsp70 (HAGEMAN et al., 2011; RYU et al., 2020; SERLIDAKI et al., 2020).

Ademais, como já foi visto em seções anteriores, o domínio responsável pela interação com a proteína-cliente e, conseqüentemente, atividade chaperona das Hsp70 é o DLP, o qual apresenta somente 55% de identidade entre as proteínas estudadas aqui (Tabela 5 e Figura 11). Tais dados indicam um moderado grau de identidade o qual possibilita que ambas as proteínas consigam atuar em uma gama distinta de substratos proteicos, além disso a cinética de interação entre o DLP e o substrato é um fator limitante para a divergência funcional observada entre as Hsp70 (KOHLER; ANDRÉASSON, 2020). Curiosamente, um estudo realizado por Ryu e colaboradores (RYU et al., 2020) mostrou por meio de marcações proteicas mediadas por ubiquitina que embora a HspA8 compartilhe alta identidade com a HspA1A (86%), elas apresentam especificidades amplamente não sobrepostas.

**Figura 30. Atividade chaperona das proteínas HspA5 e HspA8 sobre proteínas-modelo.** A atividade chaperona das proteínas humanas HspA5 e HspA8 induzida por calor foi analisada usando as proteínas Citrato sintase (CS) e Malato desidrogenase (MDH) como proteínas-modelo. Os ensaios utilizaram concentrações crescentes de hHsp70 (0 a 1  $\mu$ M) e concentrações fixas de MDH e CS (1  $\mu$ M), incubadas a 42 °C por 2h. A) A proteína HspA8 evitou a agregação de CS em 90% em concentrações subestequiométricas (0,1  $\mu$ M), enquanto efeito similar só foi observado em doses 10 vezes maiores para HspA5. B) Mediante incubação com CS, o efeito máximo observado na prevenção de agregação foi de cerca de 60% para a proporção de 1:0.75 de HspA5, sendo que a HspA8 se mostrou pouco efetiva. Em concentrações superiores a 1  $\mu$ M de HspA5 e HspA8, foi observada co-agregação proteica (dados não mostrados).



Fonte: Autoria própria.

### 3 CONCLUSÕES

Como observado ao longo deste trabalho de tese de doutorado, as proteínas Hsp70 humanas, aqui denominadas HspA5 e HspA8, obtidas de maneira heteróloga, foram caracterizadas em solução quanto à estrutura, estabilidade e função. Ambas proteínas exibiram assinaturas espectroscópicas características de Hsp70, apresentando-se majoritariamente como monômeros levemente alongados em solução e com domínios proteicos com diferentes estabilidades química e térmica. As proteínas Hsp70 humanas recombinantes foram sensíveis à presença dos nucleotídeos adenosina e sofreram alterações conformacionais em nível de estrutura secundária e terciária na presença destes, sendo inclusive estabilizadas termicamente por eles. O papel dos íons  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  favorece a ligação dos nucleotídeos adenosina, mas parece divergir entre as proteínas Hsp70 aqui estudadas. Ademais, ambas Hsp70 apresentaram atividade enzimática sobre o ATP e foram capazes de prevenir a agregação de proteínas-clientes com especificidades diferentes. Desta forma, os dados apresentados aqui elucidam bem aspectos estruturais e funcionais das proteínas HspA5 e HspA8, e podem contribuir para

sua produção heteróloga para triagens de compostos, tendo as mesmas como potenciais alvos terapêuticos para diferentes doenças.

### 3.1 Conclusões específicas

- ✓ A identidade sequencial encontrada entre as proteínas humanas HspA1A, HspA5, HspA8 e HspA9 é moderada e a similaridade entre elas é alta.
- ✓ As proteínas HspA5 e HspA8 se apresentaram majoritariamente como espécies monoméricas levemente alongadas em solução, com conteúdo estrutural rico em hélices- $\alpha$ .
- ✓ Os ambientes terciários local e global das proteínas HspA5 e HspA8 são relativamente diferentes.
- ✓ As estabilidades químicas são notavelmente similares entre as proteínas HspA5 e HspA8. Contudo, os ensaios térmicos mostraram que embora a proteína HspA8 apresente três transições de desnaturação, a HspA5 apresenta somente duas.
- ✓ A primeira e a terceira transição de desnaturação térmica são sensíveis aos nucleotídeos adenosina e estão relacionadas ao domínio de ligação ao nucleotídeo.
- ✓ A segunda transição térmica é atribuída somente ao domínio DLP.
- ✓ Ambas Hsp70 interagem com os nucleotídeos adenosina na presença de íons  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  em processos regidos termodinamicamente por entropia e entalpia.
- ✓ A afinidade das proteínas HspA5 e HspA8 pelo ADP é maior do que pelo ATP.
- ✓ Os íons  $Ca^{2+}$  ocasionam alterações conformacionais que favorecem a ligação das proteínas Hsp70 em estudo ao ADP.
- ✓ Os íons  $Ca^{2+}$  modulam a estabilidade térmica da HspA8.
- ✓ As proteínas HspA5 e HspA8 foram capazes de hidrolisar o ATP em ADP e Pi, apresentando, portanto, atividade ATPásica.
- ✓ Apesar de serem redundantes funcionalmente na prevenção de agregação de proteínas-modelo, as chaperonas HspA5 e HspA8 apresentaram diferenças na especificidade de ação.

#### 4. LISTA DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO DOUTORADO

SILVA, N. S. M.; SERAPHIM, T.V; MINARI, K.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in Plasmodium falciparum genome. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 193–204, 2018.

SILVA, N. S. M; TORRICILLAS, M.S.; MINARI, K.; BARBOSA, L.R.S.; SERAPHIM, T.V.; BORGES, J.C. Solution structure of Plasmodium falciparum Hsp90 indicates a high flexible dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 690, p. 108468, 2020b.

SILVA, N. S. M.; BERTOLINO-REIS, D.E.; DORES-SILVA, P.R.; ANNETA, F.B.; SERAPHIM, T.V.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. Structural studies of the Hsp70/Hsp90 organizing protein of Plasmodium falciparum and its modulation of Hsp70 and Hsp90 ATPase activities. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 1, p. 140282, 2020c.

##### 4.1 Artigos científicos em preparação referentes ao doutorado

SILVA, N.S.M.; RODRIGUES, L.F.C.; DORES-SILVA, P.R.; MONTANARI, C.A.; BARBOSA, L.R.S.; RAMOS, C.H.I.; BORGES, J.C. Structural characterization, stability assays and kinetics studies of human 71 kDa heat shock cognate protein (HSPA8/hHsc70) (submetido).

SILVA, N.S.M.; CANDURI, F.; QUEIROZ, S.L. A Bioquímica envolvida por trás da covid-19: desenvolvimento e aplicação de WebQuest direcionada ao ensino remoto emergencial.

SILVA, N.S.M.; SIEBENEICHLER, B.; RODRIGUES, L.F.C.; DORES-SILVA, P.R.; BARBOSA, L.R.S.; BORGES, J.C. The regulation of the structure, stability and affinity of the human BiP protein by clients and nucleotides is modulated by its bidirectional heterotropic mechanism.

SILVA, N.S.M.; SIEBENEICHLER, B.; SABINO, C.O.; BORGES, J.C. Molecular determinants of the interaction between Hep-1 and Hsp70 proteins: a highly synergistic and thermally regulated mechanism.

## 5. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, S. P. et al. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 29, p. 1–12, 2020.

AGUIAR, J. A. et al. Gene expression and in situ protein profiling of candidate SARS-CoV-2 receptors in human airway epithelial cells and lung tissue. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 3, 2020.

ALHALMI, A.; ALZOBAYDI, N.; ABDULRAHMAN, A. Intracellular Protein Biosynthesis: A Review. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, v. 5, n. 2, p. 10–18, 2020.

ANAGLI, J. et al. Effects of cathepsins B and L inhibition on postischemic protein alterations in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 1, p. 86–91, 2008.

ARAKAWA, A. et al. Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. **Protein Science**, v. 20, n. 8, p. 1367–1379, 2011.

AROSIO, A. et al. HSC70 expression is reduced in lymphomonocytes of sporadic ALS patients and contributes to TDP-43 accumulation. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 21, n. 1-2, p. 51–62, 2020.

AZUMA, K. et al. Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1079–1085, 2003.

BAAKLINI, I. et al. Selective Binding of HSC70 and its Co-Chaperones to Structural Hotspots on CFTR. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

BAILLY, C.; WARING, M. J. Pharmacological effectors of GRP78 chaperone in cancers. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, n. February, p. 269–278, 2019.

BALCHIN, D.; HAYER-HARTL, M.; HARTL, F. U. Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. **FEBS Letters**, v. 594, n. 17, p. 2770–2781, 2020.

BANKS, S. M. L. et al. Hsc70 ameliorates the vesicle recycling defects caused by excess  $\alpha$ -synuclein at synapses. **eNeuro**, v. 7, n. 1, 2020.

BARRAL, J. M. et al. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 17–29, 2004.

BATISTA, F. A. H. et al. Low sequence identity but high structural and functional conservation: The case of Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop/Sti1) of *Leishmania braziliensis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 600, p. 12–22, 2016.

BAUER, P. O. et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 256–263, 2010.

BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of

proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5142–5147, 2003.

BHANDAL, K. S. et al. Differential Scanning Calorimetry &#8212; A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen. **Journal of Visualized Experiments**, n. 121, p. 1–8, 2017.

BHATTARAI, A.; EMERSON, I. A. Dynamic conformational flexibility and molecular interactions of intrinsically disordered proteins. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, p. 1–17, 2020.

BOOTH, L. et al. GRP78/BiP/HSPA5/Dna K is a universal therapeutic target for human disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 7, p. 1661–1676, 2015.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, v. 12, p. 257–261, 2005.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, n. 1, p. 46–54, 2006.

BORNHORST, J.A., FALKE, J. . Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods Enzymol**, v. 2000, n. 326, p. 245–254, 2010.

BRODSKY, J.; CHIOSIS, G. Hsp70 Molecular Chaperones: Emerging Roles in Human Disease and Identification of Small Molecule Modulators. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1215–1225, 2006.

CALLONI, G. et al. DnaK Functions as a Central Hub in the E. coli Chaperone Network. **Cell Reports**, v. 1, n. 3, p. 251–264, 2012.

CAPLAN, A. J. What is a co-chaperone? **Cell stress & chaperones**, v. 8, n. 2, p. 105–107, 2003.

CARLOS, A. J. et al. GRP78 binds SARS-CoV-2 Spike protein and ACE2 and GRP78 depleting antibody blocks viral entry and infection in vitro. **bioRxiv**, p. 2021.01.20.427368, 2021.

CASAS, C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. APR, p. 1–15, 2017.

CASONI, F. et al. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: Possible multifunctional role in the pathogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16295–16304, 2005.

CELEJ, M. S. et al. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n. 2, p. 277–284, 2006.

CHAKAFANA, G.; ZININGA, T.; SHONHAI, A. Comparative structure-function features of Hsp70s of Plasmodium falciparum and human origins. **Biophysical Reviews**, v. 11, n. 4, p. 591–602, 2019.

CHEN, A. et al. Upregulation of dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin  $\alpha$  II

chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats-A proteomics approach. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 1078–1086, 2007.

CHEN, H. Y. et al. The Endogenous GRP78 Interactome in Human Head and Neck Cancers: A Deterministic Role of Cell Surface GRP78 in Cancer Stemness. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CHEN, S.; BROWN, I. R. Translocation of Constitutively Expressed Heat Shock Protein Hsc70 to Synapse-Enriched Areas of the Cerebral Cortex After Hyperthermic Stress Sheng. **Journal of Neuroscience Research**, v. 3253, n. April, p. 3244–3253, 2007.

CHIARANTE, N. et al. Lysosomal permeabilization and endoplasmic reticulum stress mediate the apoptotic response induced after photoactivation of a lipophilic zinc(II) phthalocyanine. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 103, n. 11, p. 89–98, 2018.

CHO, H. J. et al. A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 50, p. 20267–20276, 2011.

CHU, H. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus and bat coronavirus HKU9 both can utilize GRP78 for attachment onto host cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 30, p. 11709–11726, 2018.

CIECHANOVER, A.; KWON, Y. T. Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. APR, p. 1–18, 2017.

CONNER, C. et al. Cell surface GRP78 promotes stemness in normal and neoplastic cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

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

DE OLIVEIRA, A. A. et al. Dissecting the interaction between HSP70 and vascular contraction: role of Ca<sup>2+</sup> handling mechanisms. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

DEDIEGO, M. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, 2011.

DEMYANENKO, S. et al. Exogenous recombinant Hsp70 mediates neuroprotection after photothrombotic stroke. **Cell Stress and Chaperones**, 2020.

DHAMAD, A. E. et al. Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) and Biochemical Characterization of the ER $\alpha$ - Hsp70 Interaction. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–19, 2016.

DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1: An essential mortalin co-chaperone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 140–148, 2013.

- DORES-SILVA, P. R. et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): Shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–24, 2015.
- DORES-SILVA, P. R. et al. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* mitochondrial Hsp70: Similarities and dissimilarities to human orthologues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 613, p. 43–52, 2017.
- DOU, J. et al. Targeting Hsc70-based autophagy to eliminate amyloid  $\beta$  oligomers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 524, n. 4, p. 923–928, 2020.
- DU, X. et al. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–34, 2016.
- EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948–1954, 1967.
- EKIMOVA, I. V. et al. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 1035–1044, 2010.
- ELFIKY, A. A. et al. GRP78 targeting: Hitting two birds with a stone. **Life Sciences**, v. 260, n. 118317, 2020a.
- ELFIKY, A. A. et al. A possible role for GRP78 in cross vaccination against COVID-19. **Journal of Infection**, v. 2, n. 82, p. 10–12, 2020b.
- ELLIOTT, E.; TSVETKOV, P.; GINZBURG, I. BAG-1 associates with Hsc70-Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 51, p. 37276–37284, 2007.
- ENGLISH, C. A. et al. The Hsp70 interdomain linker is a dynamic switch that enables allosteric communication between two structured domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 36, p. 14765–14774, 2017.
- ENOGIERU, A. B. et al. GRP78/BIP/HSPA5 as a Therapeutic Target in Models of Parkinson’s Disease: A Mini Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2019, n. 2706783, p. 1–11, 2019.
- ERICKSON, R. R.; DUNNING, L. M.; HOLTZMAN, J. L. The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: The possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 435–443, 2006.
- FARSHBAF, M. et al. Cell surface GRP78: An emerging imaging marker and therapeutic target for cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 236, n. 4, p. 2352–2363, 2020.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R.; VALPUESTA, J. M. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. **F1000Research**, v. 7, p. 1497, 2018.
- FLORIN, L. et al. Nuclear Translocation of Papillomavirus Minor Capsid Protein L2

- Requires Hsc70. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5546–5553, 2004.
- FULDA, S. et al. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 214074, 2010.
- GASTPAR, R. et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes. **October**, v. 65, n. 12, p. 5238–5247, 2005.
- GE, R. Cell Surface GRP78 as a Death Receptor and an Anticancer Drug Target. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1787, 2019.
- GENEST, O.; WICKNER, S.; DOYLE, S. M. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 6, p. 2109–2120, 2019.
- GONZALEZ-GRONOW, M. et al. GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2299–2306, 2009.
- GRAHAM, B. B. S. Rapid Covid-19 vaccine development. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 945–946, 2020.
- HAGEMAN, J. et al. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 127–142, 2011.
- HAGEMAN, J.; KAMPINGA, H. H. Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. **Cell stress & chaperones**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2009.
- HALL, S.; MANTEEN, A. Mechanism of Interaction between SARS-CoV-2 Spike Protein and Mechanism of Interaction between SARS-CoV-2 Spike Protein and Human Cell Receptors on Cell Membranes. **Seton Hall University**, v. 1, n. 2, p. 1–11, 2020.
- HAYNES, B. F. et al. Prospects for a safe COVID-19 vaccine. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 568, p. 1–12, 2020.
- HAYS, P. Clinical sequelae of the novel coronavirus: Does COVID-19 infection predispose patients to cancer? **Future Oncology**, v. 16, n. 20, p. 1463–1474, 2020.
- HEGDE, R. S. Protein Maturation and Processing at the Endoplasmic Reticulum. **The Liver: Biology and Pathobiology**, v. 5, p. 108–121, 2020.
- HELMBRECHT, K.; RENSING, L. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. **Neurochemical Research**, v. 24, n. 10, p. 1293–1299, 1999.
- HERSEY, P.; ZHANG, X. D. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 21, n. 3, p. 358–367, 2008.
- HETZ, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 89–102, 2012.
- HOLTZ, W. A.; MALLEY, K. L. O. Parkinsonian Mimetics Induce Aspects of Unfolded Protein Response in Death of Dopaminergic Neurons \*. **Journal of**

**Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19367–19377, 2003.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S. P. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 35, n. 20, p. 2923–2950, 2012.

HOOZEMANS, J. J. M. et al. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 110, n. 2, p. 165–172, 2005.

HOOZEMANS, J. J. M. et al. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Neurodegenerative Diseases**, v. 10, n. 1-4, p. 212–215, 2012.

HOU, X. et al. Autophagy in Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 8, p. 2651–2672, 2020.

IBRAHIM M. IBRAHIM, DOAA H. ABDELMALEK, MOHAMMED E. ELSHAHAT, A. A. E. CoVID-19 spike host cell receptor GRP78 binding site prediction. **The Journal of Infection**, v. 80, n. 5, p. 554–562, 2020.

IBRAHIM, I. M. et al. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. **Journal of Infection**, v. 80, n. 5, p. 554–562, 2020.

IBRAHIM, I. M.; ABDELMALEK, D. H.; ELFIKY, A. A. GRP78: A cell's response to stress. **Life Sciences**, v. 226, n. April, p. 156–163, 2019.

INCIARDI, R. M. et al. Coronavirus 2019 Disease (COVID-19), Systemic Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 9, n. 16, p. e017756, 2020.

INOUE, A. et al. 70-kDa heat shock cognate protein interacts directly with the N-terminal region of the retinoblastoma gene product pRb: Identification of a novel region of pRb-mediating protein interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 38, p. 22571–22576, 1995.

JIANG, M. et al. Downregulation of miR-384-5p attenuates rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through inhibiting endoplasmic reticulum stress. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 310, n. 9, p. C755–C763, 2016.

JIANG, P. et al. Nutrient deprivation induces  $\alpha$ -synuclein aggregation through endoplasmic reticulum stress response and SREBP2 pathway. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 268, p. 1–17, 2014.

JIN, H.; KOMITA, M.; AOE, T. The Role of BiP Retrieval by the KDEL Receptor in the Early Secretory Pathway and its Effect on Protein Quality Control and Neurodegeneration. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 222, p. 1–8, 2017.

JINWAL, U. K. et al. Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16798–16805, 2010.

KABAKOV, A. E. et al. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 283, n. 2 52-2, p. 521–534, 2002.

- KAMPINGA, H. H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 105–111, 2009.
- KAMPINGA, H. H.; BERGINK, S. Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 7, p. 748–759, 2016.
- KAMPINGA, H. H.; MAYER, M. P.; MOGK, A. Protein quality control: from mechanism to disease. **Cell Stress and Chaperones**, v. 24, n. 6, p. 1013–1026, 2019.
- KANIA, E.; PAJAK, B.; ORZECZOWSKI, A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 352794, p. 1–12, 2015.
- KAWAGUCHI, Y. et al. Endoplasmic reticulum chaperone BiP / GRP78 knockdown leads to autophagy and cell death of arginine vasopressin neurons in mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.
- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 4, p. 349–384, 2005.
- KHACHATOORIAN, R. et al. The NS5A-binding heat shock proteins HSC70 and HSP70 play distinct roles in the hepatitis C viral life cycle. **Virology**, v. 454-455, n. 1, p. 118–127, 2014.
- KIRALY, V. T. R. et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 320–331, 2020.
- KITYK, R. et al. Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. **Nature Communications**, v. 6, n. 8308, 2015.
- KOHLER, V.; ANDRÉASSON, C. Hsp70-mediated quality control: should I stay or should I go ? **Biol . chem.**, v. 401, n. 11, p. 1233–1248, 2020.
- KÖSELER, A. et al. Endoplasmic reticulum stress markers in SARS-COV-2 infection and pneumonia: Case-control study. **In Vivo**, v. 34, p. 1645–1650, 2020.
- KOSIK, K. S.; SHIMURA, H. Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1739, n. 2, p. 298–310, 2005.
- KUBOTA, H. et al. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 1003–1011, 2010.
- KUDO, T. et al. Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 2, p. 525–530, 2006.

- LACKIE, R. E. et al. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. 254, p. 1–23, 2018.
- LAMB, H. K. et al. The affinity of a major Ca<sup>2+</sup> binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8796–8805, 2006.
- LERMYTE, F. Roles, Characteristics, and Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: A Minireview. **Life**, v. 10, n. 12, p. 320, 2020.
- LIU, J. et al. Further study on the role of HSP70 on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat ventricular myocytes subjected to simulated ischemia. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 290, n. 2, p. 583–591, 2006.
- LUO, B.; LEE, A. S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 805–818, 2013.
- MABATE, B. et al. Structural and biochemical characterization of Plasmodium falciparum Hsp70-x reveals functional versatility of its C-terminal EEVN motif. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 86, n. 11, p. 1189–1201, 2018.
- MACARIO, A. J. L.; CONWAY DE MACARIO, E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 14, p. 1489–501, 2005.
- MAEDA, A. et al. Aberrant expression of photoreceptor-specific calcium-binding protein (recoverin) in cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 60, n. 7, p. 1914–1920, 2000.
- MAK, S. K. et al. Lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 18, p. 13621–13629, 2010.
- MARCION, G. et al. C-terminal amino acids are essential for human heat shock protein 70 dimerization. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, n. 1, p. 61–72, 2015.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.
- MAYER, M. P.; GIERASCH, L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 6, p. 2085–2097, 2019.
- MCLAUGHLIN, B. A. et al. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 715–720, 2003.
- MINARI, K. et al. Thermodynamic analysis of interactions of the Hsp90 with adenosine nucleotides: A comparative perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 125–138, 2019.
- MIZUKAMI, S. et al. Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors. **Cancer Science**, v. 99, n. 5, p. 1008–1015, 2008.

- MOGK, A.; BUKAU, B.; KAMPINGA, H. H. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 214–226, 2018.
- MOKRY, D. Z.; ABRAHÃO, J.; RAMOS, C. H. I. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1273–1292, 2015.
- MONTGOMERY, D. L.; MORIMOTO, R. I.; GIERASCH, L. M. Mutations in the substrate binding domain of the Escherichia coli 70 kDa molecular chaperone, DnaK, which alter substrate affinity or interdomain coupling. **Journal of Molecular Biology**, v. 2866, n. 3, p. 915–932, 1999.
- MORGNER, N. et al. Hsp70 Forms Antiparallel Dimers Stabilized by Post-translational Modifications to Position Clients for Transfer to Hsp90. **Cell Reports**, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2015.
- MURANYI, M. et al. Induction of heat shock proteins by hyperglycemic cerebral ischemia. **Molecular Brain Research**, v. 139, n. 1, p. 80–87, 2005.
- NACHMAN, E. et al. Disassembly of Tau fibrils by the human Hsp70 disaggregation machinery generates small seeding-competent species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 28, p. 9676–9690, 2020.
- NEMOTO, T. et al. Mechanism of Dimer Formation of the 90-kDa Heat-Shock Protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 233, n. 1, p. 1–8, 1995.
- NEMOTO, T. K. et al. A disulfide bridge mediated by cysteine 574 is formed in the dimer of the 70-kDa heat shock protein. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 4, p. 677–687, 2006.
- NUSS, J. E. et al. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 2, p. 355–361, 2008.
- O'BRIEN, M. C.; FLAHERTY, K. M.; MCKAY, D. B. Lysine 71 of the chaperone protein Hsc70 is essential for ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 15874–15878, 1996.
- O'BRIEN, M. C.; MCKAY, D. B. Threonine 204 of the chaperone protein Hsc70 influences the structure of the active site, but is not essential for ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 24323–24329, 1993.
- O'BRIEN, M. C.; MCKAY, D. B. How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. I. Potassium is required for optimal ATPase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 5, p. 2247–2250, 1995.
- ODUNUGA, O. O. et al. Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 6896–6904, 2003.
- OROZ, J. et al. Mechanistic basis for the recognition of a misfolded protein by the molecular chaperone Hsp90. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 24, n. 4, p. 407–413, 2017.

- PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 4, n. 11, p. 2411–2423, 1995.
- PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein structure: A practical approach**. [s.l.: s.n.]. p. 311–330.
- PANG, L. et al. Influence of aging on deterioration of patients with COVID-19. **aging**, v. 12, n. 24, p. 26248–26262, 2020.
- PARK, K. W. et al. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP Modulates Prion Propagation in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 44723, p. 1–13, 2017.
- PARK, Y. J.; YOO, S. A.; KIM, W. U. Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 2–11, 2014.
- PASSARELLA, R. J. et al. Targeted nanoparticles that deliver a sustained, specific release of paclitaxel to irradiated tumors. **Cancer Research**, v. 70, n. 11, p. 4550–4559, 2010.
- PATRICK REID, S. et al. HSPA5 is an essential host factor for Ebola virus infection. **Antiviral Research**, v. 109, n. 1, p. 171–174, 2014.
- PAVITHRA, S. R.; KUMAR, R.; TATU, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 9, p. 1701–1715, 2007.
- PFÄFFENBACH, K. T.; LEE, A. S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stre. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2011.
- POBRE, K. F. R.; POET, G. J.; HENDERSHOT, L. M. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 6, p. 2098–2108, 2019.
- PREISSLER, S. et al. Calcium depletion challenges endoplasmic reticulum proteostasis by destabilising BiP-substrate complexes. **eLife**, v. 9, n. e62601, 2020.
- RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 379–404, 2016.
- RAUSCHERT, N. et al. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 4, p. 375–386, 2008.
- RAYNER, J. O. et al. AR12 (OSU-03012) suppresses GRP78 expression and inhibits SARS-CoV-2 replication. **Biochemical Pharmacology**, v. 182, p. 114227, 2020.
- REDDY, R. K. et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. Role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20915–20924, 2003.

- RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253–266, 2010.
- ROHDE, M. et al. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. **Genes and Development**, v. 19, n. 5, p. 570–582, 2005.
- ROSENZWEIG, R. et al. ClpB N-terminal domain plays a regulatory role in protein disaggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 50, p. E6872–E6881, 2015.
- ROSENZWEIG, R. et al. The Hsp70 chaperone network. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 20, p. 665–680, 2019.
- RUBIO, E. et al. Programmed cell death in the neurulating embryo is prevented by the chaperone heat shock cognate 70. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1646–1654, 2002.
- RÜDIGER, S. et al. Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, n. 3, p. 245–251, 2000.
- RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: Coping with stress. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 20–28, 2004.
- RYU, S. W. et al. Proteome-wide identification of HSP70/HSC70 chaperone clients in human cells. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000606, 2020.
- SABIRLI, R. et al. High GRP78 levels in Covid-19 infection : A case-control study. **Life Sciences**, v. 265, n. 2021, p. 118781, 2021.
- SALGANIK, M. et al. The loss of glucose-regulated protein 78 (GRP78) during normal aging or from siRNA knockdown augments human alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) toxicity to rat nigral neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 6, p. 2213–2223, 2015.
- SANDOVAL, J. A. et al. Novel peptides secreted from human neuroblastoma: Useful clinical tools? **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 1, p. 245–251, 2006.
- SATO, M. et al. GRP78 Signaling Hub. A Receptor for Targeted Tumor Therapy. In: **Advances in Genetics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 69p. 97–114.
- SCHEUFLER, C. et al. Structure of TPR Domain–Peptide Complexes. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 199–210, 2000.
- SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania Parasites. **The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation**, p. 445–458, 2014.
- SERLIDAKI, D. et al. Functional diversity between HSP70 paralogs due to variable interactions with specific co-chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.RA119.012449, 2020.
- SHAH, D. D. et al. Biophysical analysis of the effect of chemical modification by 4-

oxononal on the structure, stability, and function of binding immunoglobulin protein (BiP). **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–21, 2017.

SHARMA, D., M. D. C. Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 6, p. 571–581, 2009.

SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The Molecular Chaperone Hsp70 Family Members Function by a Bidirectional Heterotropic Allosteric Mechanism. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, n. 2, p. 132–142, 2011.

SILVA, N. S. M. et al. Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in Plasmodium falciparum genome. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 193–204, 2018.

SILVA, N. S. M. et al. Solution structure of Plasmodium falciparum Hsp90 indicates a high flexible dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 690, n. 108468, 2020a.

SILVA, N. S. M. et al. Structural studies of the Hsp70/Hsp90 organizing protein of Plasmodium falciparum and its modulation of Hsp70 and Hsp90 ATPase activities. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 1, p. 140282, 2020b.

SMOCK, R. G.; BLACKBURN, M. E.; GIERASCH, L. M. Conserved, disordered C terminus of DnaK enhances cellular survival upon stress and DnaK in vitro chaperone activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31821–31829, 2011.

SÕTI, C. et al. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 769–80, 2005.

SOUSA, M. C.; MCKAY, D. B. The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kDa heat shock cognate protein is essential for transducing the ATP-induced conformational change. **Biochemistry**, v. 37, n. 44, p. 15392–15399, 1998.

SRINIVASAN, V. et al. Dynamic Interaction of USP14 with the Chaperone HSC70 Mediates Crosstalk between the Proteasome, ER Signaling, and Autophagy. **iScience**, v. 23, n. 1, p. 100790, 2020.

STEEL, R. et al. Hsp70 Architecture: The Formation of Novel Polymeric Structures of Hsp70.1 and Hsc70 after Proteotoxic Stress. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52351, 2012.

STRICHER, F. et al. HSPA8/HSC70 chaperone protein: Structure, function, and chemical targeting. **Autophagy**, v. 9, n. 12, p. 1937–1954, 2013.

SUN, F. C. et al. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. **Biochemical Journal**, v. 396, n. 1, p. 31–39, 2006.

SWINEHART, D. F. The Beer-Lambert Law. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 7, p. 333, 1962.

TAKAKUWA, J. E. et al. Oligomerization of Hsp70: Current Perspectives on Regulation and Function. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. 81, p. 1–7, 2019.

TAKALLOO, Z. et al. Probing heat and oxidation induced conformational changes of molecular chaperone artemin by excitation-emission fluorescence spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 211, p. 112013, 2020.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. I. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 2, p. 101–109, 2011.

TRCKA, F. et al. Human stress-inducible Hsp70 has a high propensity to form ATP-dependent antiparallel dimers that are differentially regulated by cochaperone binding. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 18, n. 2, p. 320–337, 2019.

TSAI, Y. L.; LEE, A. S. Cell Surface GRP78: Anchoring and Translocation Mechanisms and Therapeutic Potential in Cancer. In: **Cell Surface GRP78, a New Paradigm in Signal Transduction Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 41–62.

TSENG, C. C.; ZHANG, P.; LEE, A. S. The COOH-Terminal Proline-Rich Region of GRP78 Is a Key Regulator of Its Cell Surface Expression and Viability of Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells. **Neoplasia (United States)**, v. 21, n. 8, p. 837–848, 2019.

TUPLING, A. R. et al. Interaction between Hsp70 and the SR Ca<sup>2+</sup> pump: A potential mechanism for cytoprotection in heart and skeletal muscle. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 33, n. 5, p. 1023–1032, 2008.

URUSHITANI, M. et al. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 1, p. 231–244, 2004.

VALSALA, G. et al. Molecular Chaperones and Their Applications. In: **Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects**. [s.l.: s.n.]. p. 521–552.

VAN LEEUWEN, F. W.; KAMPINGA, H. H. Heat Shock Proteins and Protein Quality Control in Alzheimer's Disease. In: **The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases: Underlying Mechanisms**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 269–298.

VILA-CARRILES, W. H. et al. Participation of the chaperone Hsc70 in the trafficking and functional expression of ASIC2 in glioma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34381–34391, 2007.

VOSTAKOLAEI, M. A. et al. Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. **Journal of Cellular Physiology**, n. May, p. 1–25, 2020.

WALERYCH, D. et al. Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. **Oncogene**, v. 28, n. 48, p. 4284–4294, 2009.

WANG, J. et al. HSPA5 Gene Encoding Hsp70 Chaperone BiP in the Endoplasmic Reticulum. **Gene**, v. 618, n. 1, p. 14–23, 2017.

WANG, M. et al. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2307–2316, 2009.

WESTERHEIDE, S. D.; MORIMOTO, R. I. Heat shock response modulators as

therapeutic tools for diseases of protein conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33097–33100, 2005.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.

WILLIAMS, D. R. et al. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 39, p. 7466–7469, 2008.

WISNIEWSKA, M. et al. Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

XIONG, Q. et al. Clinical sequelae of COVID-19 survivors in Wuhan, China: a single-centre longitudinal study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 1, p. 89–95, 2021.

XUN, Z. et al. Quantitative proteomics of a presymptomatic A53T  $\alpha$ -synuclein Drosophila model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 7, p. 1191–1203, 2008.

YANG, Y.; TURNER, R. S.; GAUT, J. R. The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25552–25555, 1998.

YU, A. et al. Protein aggregation can inhibit clathrin-mediated endocytosis by chaperone competition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1481–E1490, 2014.

ZHANG, H. et al. Fusion protein of ATPase domain of Hsc70 with TRP2 acting as a tumor vaccine against B16 melanoma. **Immunology Letters**, v. 105, n. 2, p. 167–173, 2006.

ZHANG, L. H.; ZHANG, X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 6, p. 1299–1305, 2010.

ZHANG, Y. et al. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15065–15075, 2010.

ZHANG, Y. J. et al. Carboxyl terminus of heat-shock cognate 70-interacting protein degrades tau regardless its phosphorylation status without affecting the spatial memory of the rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 3, p. 483–491, 2008.

ZHANG, Z. et al. High-level production of membrane proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZHU, X. et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1606–1614, 1996.

ZYLICZ, M.; KING, F. W.; WAWRZYNOW, A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. **EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4634–4638, 2001.