

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/01/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MARCOS TADEU GERALDO

**Caracterização *in silico* dos mecanismos de
interação entre sequências de localização
nuclear e Importina- α**

Botucatu-SP

2016

MARCOS TADEU GERALDO

**Caracterização *in silico* dos mecanismos de interação
entre sequências de localização nuclear e Importina- α**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obten-
ção do título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Ge-
nética).

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: Ney Lemke

Coorientadora: Agnes Alessandra Sekijima Takeda

Botucatu-SP

2016

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TEC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Geraldo, Marcos Tadeu.

Caracterização in silico dos mecanismos de interação entre sequências de localização nuclear e Importina- α / Marcos Tadeu Geraldo. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ney Lemke

Coorientador: Agnes Alessandra Sekijima Takeda

Capes: 20205007

1. Dinâmica molecular. 2. Transporte ativo do núcleo celular. 3. Carioferinas. 4. Cristalografia de raio X.

Palavras-chave: Dinâmica molecular; Importação nuclear; Importina- α ; Modos normais; Sequência de localização nuclear.

*Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais
José Eduardo e Maria Helena e à minha amada noiva Natália Totti,
por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim,
sempre com muito amor.*

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de doutorado e de estágio no exterior (processos: 2012/19447-2 e 2014/21976-9). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado (processo: 142110/2012-4) no início do curso.

Ao meu orientador Ney Lemke, por participar diretamente nas discussões e análises dos meus resultados, sempre contribuindo ativamente, além de ser um orientador exemplar por nos oferecer algo muito importante para a nossa carreira científica: autonomia e liberdade para tomadas de decisão. Estas qualidades pretendo levar durante toda a minha vida profissional.

À minha coorientadora Agnes Takeda por ter sido a pessoa que acompanhou de perto o desenvolvimento do meu trabalho, além dos seus ensinamentos e conselhos que, com certeza, foram fundamentais para a produção desta tese.

Ao professor Antônio Sérgio (UFABC) pela colaboração, me ensinando sobre a técnica de análise de modos normais que utilizei em meu trabalho.

Ao professor David Perahia (ENS – Cachan, França) por me receber e ser o supervisor do meu estágio em seu laboratório por 5 meses, me auxiliando diretamente na preparação dos *scripts* para as análises dos dados de modos normais.

A todos do Laboratório de Bioinformática e Biofísica Computacional pelo companheirismo no dia a dia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao Departamento de Física e Biofísica pelo apoio institucional e pelos espaços físicos.

A todos da Seção de Pós-Graduação por toda ajuda referente ao controle da documentação e solicitude para atender a todas as minhas dúvidas.

À minha família, em especial aos meus pais José Eduardo e Maria Helena por todo o carinho, apoio e dedicação em todos os passos de minha vida. A eles sou eternamente grato! Agradeço também aos meus irmãos Cássia e Eduardo pelo carinho, risadas e apoio durante minha vida.

Aos meus sogros Wanda e Silvio por me receberem muito bem, além de terem sempre carinho e torcerem muito por mim.

À minha noiva Natália Totti por seu amor, carinho e atenção em todos os momentos

da minha vida desde que nos conhecemos. Não tenho palavras para expressar o quanto sou abençoado por estar ao seu lado! Todo o seu companheirismo e amor dedicados certamente foram essenciais durante estes 4 anos de doutorado, e sei que para as próximas etapas, tanto da minha vida científica e pessoal, você estará comigo. Muito obrigado, meu amor! Amo você imensamente! E, é claro, um agradecimento à nossa filhinha felina, Greta, que nos ensina sempre a meditar, com aquela sua carinha de paz e tranquilidade.

Por fim, desejo concluir meus agradecimentos lembrando que apesar dos problemas e entraves que possam surgir durante qualquer atividade, sempre precisamos da humildade e atenção necessária para perceber tudo de bom que também nos acontece. E por isso, tenho um grande sentimento de gratidão por tudo que vivenciei durante o meu curso de doutoramento e estou muito satisfeito pelo o que foi produzido!

*When you complain,
you make yourself a victim.
Leave the situation,
change the situation or accept it.
All else is madness.*

Eckhart Tolle

Resumo

Os sistemas de importação nuclear são responsáveis pelo intercâmbio entre o citoplasma e o núcleo da célula, permitindo que proteínas com função nuclear migrem através da membrana que separa essas duas regiões. A via de importação mais estudada é a via clássica de importação nuclear mediada pela Importina- α (Imp α). A Imp α é uma proteína solenóide, composta por repetições em *tandem* do motivo *Armadillo* (ARM) que formam uma estrutura longa e contorcida, com pequenos arcabouços ao longo do eixo da proteína. As sequências de localização nuclear clássicas (cNLSs) presentes nas proteínas-alvo de importação são compostas por resíduos carregados positivamente e estabelecem pontes salinas, ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos com esses arcabouços da Imp α . Esse reconhecimento pode ocorrer em um ou em dois sítios da Imp α , caracterizando a cNLS como monopartida ou bipartida, respectivamente. A maioria das informações estruturais do complexo cNLS-Imp α provém de dados de cristalografia e pouco se sabe sobre a dinâmica conformacional deste sistema. Uma abordagem para tratar da dinâmica de um sistema é o uso de técnicas de simulação de biomoléculas, tais como dinâmica molecular e análise de modos normais. Com base nessas técnicas de simulação, o presente estudo teve como objetivo compreender os mecanismos de interação e dinâmica conformacional envolvidos no reconhecimento de cNLSs pela Imp α . Particularmente, este trabalho focou nas cNLSs das proteínas Nucleoplasmina e Ku70 complexadas com a Imp α . O estudo com a Nucleoplasmina determinou dois movimentos principais da Imp α que podem estar associados na função de reconhecimento de cNLSs: dobramento e torção. Os movimentos de dobramento podem estar envolvidos na entrada da cNLS e na acomodação da proteína que a contém, dependendo do seu tamanho, enquanto que os movimentos de torção podem estar envolvidos no reconhecimento da cNLS e na sua acomodação aos sítios de ligação da Imp α . Além disso, resíduos correspondentes à região *linker*, situada entre os grupos de resíduos básicos da cNLS bipartida, também podem auxiliar no ajuste da cNLS na Imp α . Por fim, o estudo com a Ku70 verificou, com base na análise de contatos e correlações na interface peptídeo-proteína e nos perfis geométricos da Imp α , que esta não se ligaria à Imp α como uma cNLS bipartida. Em conclusão, os dados aqui obtidos podem auxiliar no entendimento das afinidades entre as cNLSs já descritas, como também na análise de outras potenciais cNLSs.

Palavras-chave: importação nuclear. importina- α . sequência de localização nuclear. dinâmica molecular. modos normais.

Abstract

Nuclear import systems are responsible for the exchange between the cytoplasm and the nucleus of a cell, allowing nuclear proteins to migrate through the membrane that separates these two regions. The most studied import pathway is the classical nuclear import mediated by Importin- α (Imp α). Imp α is a solenoid protein consisting of tandem repeats of the Armadillo (ARM) motif, forming an extended and twisted structure with small grooves along the protein axis. The classical nuclear localization sequences (cNLSs) of cargo proteins are composed of positively charged residues and establish salt bridges, hydrogen bonds and hydrophobic contacts with the grooves of Imp α . Such recognition can occur at one or two sites of Imp α , thus characterizing the cNLS as monopartite or bipartite, respectively. Most structural information of the cNLS-Imp α complex is from crystallographic data and little is known about the conformational dynamics of this system. One approach to address the dynamics of a system is the use of biomolecular simulation techniques such as molecular dynamics and normal modes analysis. Based on these techniques, this study aimed to understand the mechanisms of interaction and conformational dynamics involved in the recognition of cNLSs by Imp α . In particular, this work focused on the cNLSs of Nucleoplasmin and Ku70 proteins complexed with Imp α . The study of Nucleoplasmin determined two main motions of Imp α that may be associated to the cNLS recognition: bending and twisting. The bending motion may be involved in the cNLS entrance and the accommodation of cargo protein depending on its size, whereas the twisting motions may be involved in the cNLS recognition and accommodation into the binding sites of Imp α . Furthermore, the residues corresponding to the linker region, situated between the groups of basic residues from the bipartite cNLS, may also assist in setting the cNLS into Imp α . Finally, the study of Ku70 verified, based on the contact and correlation analyses of the peptide-protein interface and the geometric profiling of Imp α , that its peptide would not bind to Imp α as a bipartite cNLS. In conclusion, the data obtained here may help in understanding the affinities between the cNLSs already described, as well as the analysis of other potential cNLSs.

Keywords: nuclear import. importin- α . nuclear localization sequence. molecular dynamics. normal modes.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Transporte núcleo-citoplasma	11
1.2	Importação nuclear mediada por Importina-α	12
1.3	Simulação computacional de biomoléculas	17
1.3.1	Dinâmica molecular	17
1.3.2	Análise de modos normais	19
2	OBJETIVO	21
3	MANUSCRITO I: NUCLEOPLASMINA	22
3.1	Abstract	23
3.2	Introduction	24
3.3	Materials and Methods	25
3.3.1	Model of study: Classical bipartite NLS	25
3.3.2	MD simulations	26
3.3.3	NM analysis	27
3.3.4	Data Analysis	28
3.4	Results	30
3.4.1	Selection of Imp α -NpINLS model	30
3.4.2	Standard MD combined with NM-displacement method	30
3.4.3	Collective motions of Imp α	31
3.4.4	Main contacts in Imp α -NpINLS interface	32
3.5	Discussion	32
3.5.1	Bending and twisting motions may be directly related to Imp α function	32
3.5.2	The role of the linker residues in cNLS recognition	35
3.5.3	NM analysis with classic MD simulations	36
3.6	Conclusions	36
3.7	Acknowledgments	37
3.8	Figures	38
3.9	Supporting Information	45
4	MANUSCRITO II: KU70	60
4.1	Abstract	61
4.2	Introduction	62
4.3	Methods	63
4.3.1	In silico modeling: Ku70NLS complexed with Imp α	63

4.3.2	Search of similar structures to Imp α	63
4.3.3	MDeNM method procedure	64
4.3.4	Data analysis	65
4.4	Results	66
4.4.1	Geometric analysis of Imp α and selection of NMs for MDeNM	66
4.4.2	NMs activation	67
4.4.3	Contacts in major and minor sites	68
4.5	Discussion	68
4.5.1	Ku70NLS may not bind as a classical bipartite NLS	68
4.5.2	The conformational changes from MDeNM were limited to Imp α	69
4.6	Acknowledgments	70
4.7	Figures	71
4.8	Supporting Information	77
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	Referências	85

1 Introdução

1.1 Transporte núcleo-citoplasma

Um dos principais passos evolutivos que ocorreram no nível celular foi a aquisição de compartimentos internos, delimitados por membranas lipídicas. Internalização da membrana e a formação de organelas forneceram uma grande vantagem evolutiva pela realização simultânea de diferentes funções dentro destes compartimentos distintos, permitindo que as células aumentassem a sua robustez e complexidade (FLOCH; PALANCADE; DOYE, 2013).

O núcleo celular é a organela que distingue células eucarióticas de procarióticas e o seu limite, a membrana nuclear, permite que as células eucarióticas regulem espacial e temporalmente as distintas fases de expressão do genoma (transcrição do mRNA, maturação e tradução), pois ela se torna uma barreira importante para proteínas e RNA, já que ambos precisam ser transportados de forma regulada (FLOCH; PALANCADE; DOYE, 2013). Além da transferência de grandes quantidades de proteínas nucleares constitutivas, tais como as histonas, alterações na expressão gênica em geral requerem a entrada controlada no núcleo de moléculas de sinalização (STEWART, 2007). No entanto, o conteúdo nuclear não é totalmente isolado a partir do citoplasma, graças a um sistema chamado complexo poro nuclear (NPC). Macromoléculas maiores que aproximadamente 40 kilo-Daltons (kDa) são transportadas ativamente através do envelope nuclear por meio dos NPCs, utilizando fatores de transporte solúveis ou moléculas transportadoras que circulam entre o citoplasma e o núcleo (GÖRLICH; KUTAY, 1999; FAHRENKROG; AEBI, 2003; PEMBERTON; PASCHAL, 2005). Os NPCs são grandes complexos de macromoléculas que formam um canal através da membrana nuclear e possibilitam a troca de moléculas de maneira bidirecional entre o citoplasma e o núcleo com um diâmetro de canal limitante variando de 25 a 30 nanômetros (nm) (FELDHERR; AKIN; COHEN, 2001). NPCs são construídos a partir de múltiplas cópias de aproximadamente 30 diferentes proteínas denominadas nucleoporinas (ROUT; WENTE, 1994; ROUT et al., 2000; CRONSHAW et al., 2002).

A translocação de proteínas através de NPCs requer o suporte adicional de proteínas ou fatores de transporte. Muitas dessas transportadoras pertencem à superfamília das β -carioferinas (β -Kap) (ou Importina- β , Imp β). Todos os membros da família β -Kap são construídos de repetições em *tandem* HEAT (ANDRADE; BORK, 1995), cada um dos quais contém 40-45 aminoácidos que formam duas α -hélices antiparalelas ligadas por um *loop*. Esta estrutura repetitiva aloca as β -Kaps na categoria das proteínas em solenóide (KOBE; KAJAVA, 2000), que aparece com destaque entre proteínas envolvidas no transporte nucleocitoplasmático.

Um componente-chave adicional das vias de transporte nuclear é a Ran-GTPase. Os ciclos da Ran entre os estados ligados a GDP e GTP (GÖRLICH et al., 1996), e o estado do nucleotídeo ligado são determinados por proteínas Ran reguladoras, incluindo a Ran-GEF (*Fator de troca da guanosina*: induz a Ran-GDP a trocar o GDP por GTP) (BISCHOFF; PONSTINGL, 1991) e Ran-GAP (*Proteína ativadora da GTPase*: induz a proteína Ran a hidrolisar o GTP) (BISCHOFF et al., 1994). O gradiente da Ran-GDP/GTP, gerado por Ran-GEF e Ran-GAP que estão localizados no núcleo e no citoplasma, respectivamente, estabelece a direção das vias de transporte nucleocitoplasmático. Como resultado, os receptores de importação que se ligam no citoplasma a alguma molécula a ser importada, podem liberá-la no núcleo por meio da ligação à Ran-GTP, enquanto que os receptores de exportação que se ligam no núcleo a alguma molécula a ser exportada, podem se ligar simultaneamente à Ran-GTP e, posteriormente, podem liberá-la no citoplasma após a hidrólise do GTP (GÖRLICH et al., 1996; MOROIANU; BLOBEL; RADU, 1996; REXACH; BLOBEL, 1995).

A localização nuclear de uma proteína está geralmente associada à presença de sequências de localização nuclear (NLS). O primeiro sinal de direcionamento nuclear descoberto, e o melhor caracterizado até o momento, é a sequência de localização nuclear clássica (cNLS) reconhecida pela proteína Importina- α (Imp α) (ou Carioferina- α) (GÖRLICH et al., 1995). Imp α é também uma proteína do tipo solenóide, mas é composta a partir de 10 repetições ou motivos chamados de *Armadillo* (ARM) (KOBE, 1999; CONTI; KURIYAN, 2000) (Figura 1). Cada motivo ARM é formado por três α -hélices (H1, H2 e H3) com uma rotação em seu eixo que confere à molécula uma estrutura alongada e contorcida (CONTI et al., 1998). A porção côncava da Imp α é o local de ligação da cNLS e apresenta uma alta conservação de resíduos justamente na interface de contato com a cNLS (MARFORI et al., 2012) (Figura 1). A Imp α também apresenta uma pequena estrutura auto-inibitória na região N-terminal, que ocupa a região de ligação da cNLS. Esta estrutura é chamada de domínio de ligação à Imp β (IBB), pois se liga à Imp β (WEIS; RYDER; LAMOND, 1996) a fim de liberar o sítio de ligação à cNLS.

Além dos sinais de importação, algumas proteínas também têm sinais de exportação nuclear (NESs) (KUTAY; GÜTTINGER, 2005; COOK et al., 2007) e podem ser transportadas para dentro e fora do núcleo. Os membros da família β -Kap transportam proteínas que contêm NLS, ligando-se diretamente a ela ou por meio de uma molécula adaptadora tal como a Imp α ou a Snurportina-1 (STEWART, 2007).

1.2 Importação nuclear mediada por Importina- α

A via de importação nuclear clássica (Figura 2) é a melhor caracterizada destes ciclos de transporte, e todos os seus componentes foram identificados (GÖRLICH; KUTAY,

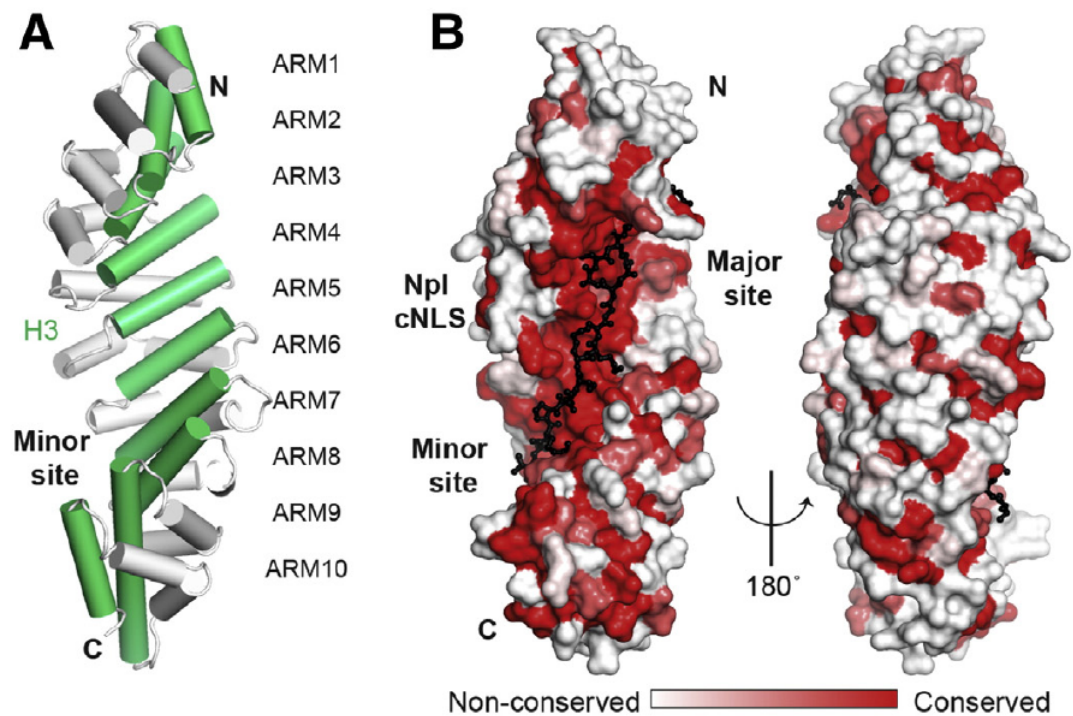


Figura 1 – Estrutura da Imp α [adaptado de Christie et al. (2015)]. (A) Estrutura da Imp α de arroz (PDB ID 4BQK) com α -hélices H3 na cor verde. (B) Estrutura da Imp α de camundongo complexada com a cNLS da Nucleoplasmina (PDB ID 3UL1) (mostrado em *stick*). A Imp α está colorida com base na conservação das seqüências de estruturas de Imp α conhecidas de diferentes espécies (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* e *Neurospora crassa*).

1999; CHOOK; BLOBEL, 2001; FAHRENKROG; AEBI, 2003; PEMBERTON; PASCHAL, 2005). Embora um número considerável de componentes e interações sejam necessárias para gerar o transporte nuclear, este sistema é menos complexo do que os sistemas que funcionam em outros processos celulares centrais, tais como sinalização, motilidade celular, ou o transporte de vesícula (STEWART, 2007). Isto, combinado com a disponibilidade de informação estrutural sobre a maioria dos componentes e muitos dos seus complexos, faz com que o ciclo da importação nuclear de proteínas se torne um sistema atrativo para desenvolver conceitos que podem servir como paradigmas da funcionalidade em sistemas biológicos mais complexos.

Existem diversas vias de importação nuclear de proteínas que usam diferentes carregadores, mas que compartilham muitas características comuns e são baseadas em uma série de proteínas que atuam em concerto: interações proteicas em que as proteínas transportadas são reconhecidas no citoplasma, translocadas através das NPCs e liberadas no núcleo (GÖRLICH; KUTAY, 1999; CHOOK; BLOBEL, 2001; FAHRENKROG; AEBI, 2003; PEMBERTON; PASCHAL, 2005). Em cada via, as proteínas a serem transportadas são reconhecidas por meio de um sinal denominado seqüência de localização nuclear (NLS). As NLSs foram subdivididas em diversas classes (KOSUGI et al., 2009), podendo inclusive

ser reconhecidas por componentes de vias diferentes. A via clássica de importação nuclear, a qual utiliza $\text{Imp}\alpha$ e $\text{Imp}\beta$ como transportadoras, importa uma ampla variedade de proteínas e tem sido estudada com mais detalhes. Proteínas com uma NLS clássica são importadas pela $\text{Imp}\beta$, que se liga a essas proteínas por meio da proteína adaptadora chamada $\text{Imp}\alpha$ (GÖRLICH; KUTAY, 1999; CHOOK; BLOBEL, 2001; FAHRENKROG; AEBI, 2003; PEMBERTON; PASCHAL, 2005). Ambas as importinas são moléculas alongadas formadas por uma série de sequências repetidas em *tandem*.

De forma simplificada, o ciclo de importação nuclear pode ser dividido em quatro etapas: i) montagem no citoplasma do complexo importina e proteína a ser transportada; ii) translocação através das NPCs; iii) desmontagem do complexo no núcleo e iv) reciclagem do complexo de importação (Figura 2).

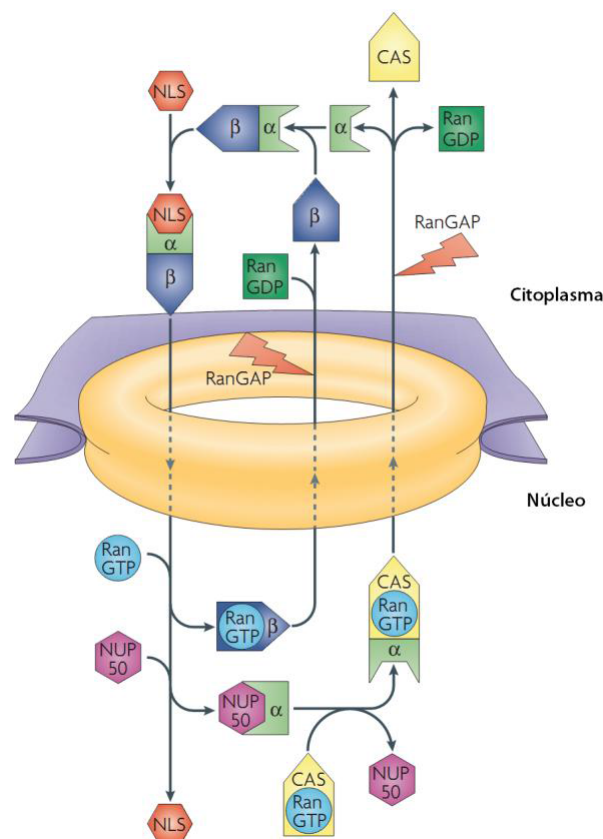


Figura 2 – Via clássica de importação nuclear [adaptado de Stewart (2007)].

O complexo de importação é formado no citoplasma entre proteínas a serem importadas que apresentam sinais de localização nuclear (NLSs), $\text{Imp}\alpha$ e $\text{Imp}\beta$. Depois de passar através do complexo poro-nuclear (NPCs), a ligação de RanGTP na $\text{Imp}\beta$ dissocia esta da $\text{Imp}\alpha$. A proteína contendo NLS é então deslocada da $\text{Imp}\alpha$ e esta é transportada para o citoplasma por seu fator de exportação nuclear (i.e. CAS) complexado com RanGTP . No citoplasma, RanGAP estimula a hidrólise de GTP, liberando as importinas para um outro ciclo de importação.

Os estudos de biologia estrutural tem desempenhado um papel importante em decifrar os eventos moleculares necessários para a importação nuclear. A técnica de

cristalografia de raios-X tem sido utilizada extensivamente para elucidar os detalhes moleculares da ligação de cNLSs à $\text{Imp}\alpha$.

O primeiro motivo de direcionamento nuclear foi identificado no antígeno-T (TA α) do vírus símio SV40 (SV40TA α). O SV40TA α é composto por uma pequena extensão de aminoácidos básicos (126-PKKKRRV-132: os resíduos básicos estão em negrito) fundamentais para a importação nuclear, já que substituições de resíduos neste motivo inibiram o transporte da proteína (KALDERON et al., 1984a). Posteriormente, outro sinal de localização nuclear foi identificado para a proteína Nucleoplasmina de *Xenopus laevis*. Esse sinal compreende dois grupos de resíduos básicos separados por uma região intermediária chamada de *linker*, composta de 10 a 12 resíduos (155-KRPAATKKAGQAKKKK-170: os resíduos básicos estão em negrito e a região *linker* está sublinhada) (DINGWALL et al., 1988). De maneira semelhante ao SV40TA α , substituições de resíduos em qualquer um destes grupos afetou o transporte nuclear da proteína, sugerindo que ambos os motivos foram necessários para o direcionamento nuclear (ROBBINS et al., 1991).

Muitas proteínas com cNLS já foram identificadas com base na similaridade com estas duas sequências, conseqüentemente, as cNLSs são definidas pela presença de um ou dois grupos de seqüência ricas em aminoácidos básicos, principalmente, arginina e lisina, que são necessários e suficientes para a importação nuclear pelo complexo $\text{Imp}\alpha:\text{Imp}\beta$ (FONTES; TEH; KOBE, 2000). Estes dois grupos são os sítios de ligação da cNLS à $\text{Imp}\alpha$ e são frequentemente denominados de sítio principal (repetições ARM 2–4) e secundário (repetições ARM 6–8). Além disso, as cNLS que se ligam aos dois ou a apenas um sítio da $\text{Imp}\alpha$ são denominadas de cNLSs bipartidas (e.g. Nucleoplasmina) e monopartidas (e.g. SV40TA α), respectivamente (FONTES; TEH; KOBE, 2000).

As análises estruturais por cristalografia de raios-X demonstraram que as cNLSs monopartidas ligam-se preferencialmente ao sítio de ligação principal (CONTI et al., 1998; FONTES; TEH; KOBE, 2000; YANG et al., 2010). Estes dados também foram corroborados por um estudo de mutagênese que mostrou que a mutação em resíduos do sítio principal inibiram a importação nuclear da cNLS monopartida, no entanto, as mutações no sítio secundário praticamente não afetaram o processo de importação (LEUNG et al., 2003). Por contraste, como já foi mencionado anteriormente para o estudo da Nucleoplasmina, a mutação em resíduos de qualquer um dos sítios de ligação afetaram substancialmente a importação das cNLSs bipartidas (LEUNG et al., 2003; ROBBINS et al., 1991).

Para cada sítio de ligação existem resíduos em posições específicas da cNLS que se ligam à $\text{Imp}\alpha$ durante o processo de formação deste complexo. Na região da cNLS que se liga ao sítio principal da $\text{Imp}\alpha$, as cadeias laterais dos resíduos nas posições P2–P5 formam contatos em quatro cavidades principais da proteína, destes, o mais fundamental é o contato em P2 que é representado por uma lisina, cuja cadeia lateral forma uma ponte salina com a cadeia lateral do ácido aspártico da $\text{Imp}\alpha$ (HODEL; CORBETT; HODEL,

2001; COLLEDGE et al., 1986; FONTES; TEH; KOBE, 2000; FONTES et al., 2003). Para as demais posições (P3–P5), há também uma preferência por resíduos com cadeia lateral básica, no entanto, este pode não ser um requerimento crítico. Por exemplo, um estudo mostrou que as cadeias laterais básicas não são estritamente necessárias para estas posições, contanto que a afinidade geral da cNLS seja suficiente para estabelecer e manter contatos mínimos com a $\text{Imp}\alpha$ a fim de manter a cNLS funcional (HODEL; CORBETT; HODEL, 2001). A manutenção desta afinidade pode ocorrer por meio da realização de contatos em regiões diretamente flanqueadoras do sítio principal, ou então, da ligação ao sítio secundário no caso das cNLSs bipartidas (HODEL; CORBETT; HODEL, 2001). Isto foi mostrado em um estudo da SV40TA α que teve seu sítio principal mutado e, conseqüentemente, teve sua distribuição nuclear afetada (MAKKERH; DINGWALL; LASKEY, 1996). Neste estudo, foram adicionados resíduos na região N-terminal que correspondem aos resíduos de ligação ao sítio secundário, e esta alteração foi suficiente para direcionar o acúmulo nuclear desta proteína. As posições fundamentais de ligação ao sítio secundário são compostas também por resíduos básicos, normalmente, de lisina (P1') e arginina (P2'), sendo que a cadeia lateral da arginina forma uma ponte salina com o resíduo de ácido glutâmico da $\text{Imp}\alpha$ (FONTES; TEH; KOBE, 2000; MARFORI et al., 2012). Uma comparação de valores de energia livre de ligação entre as posições de ambos os sítios demonstra que P1' e P2' são semelhantes às posições P3 e P5 de ligação ao sítio principal (HODEL; CORBETT; HODEL, 2001).

Para as cNLS bipartidas, as posições P2' e P2 são separadas por uma região intermediária, chamada de *linker*, de no mínimo 10 resíduos que possibilita que a cNLS se ligue simultaneamente nos dois sítios da $\text{Imp}\alpha$ (LAI et al., 2000). Os dados estruturais tem mostrado a ocorrência de algumas interações a partir da região *linker* com os resíduos $\text{Imp}\alpha\text{R}^{315}$, $\text{Imp}\alpha\text{Y}^{277}$ e $\text{Imp}\alpha\text{R}^{238}$ de algumas cNLSs bipartidas (FONTES; TEH; KOBE, 2000; FONTES et al., 2003; CONTI; KURIYAN, 2000; CHEN et al., 2005; CUTRESS et al., 2008; GIESECKE; STEWART, 2010; YANG et al., 2010; BARROS et al., 2012), porém estas interações não são conservadas e aparentam ser específicas de algumas cNLSs (MARFORI et al., 2012).

Com base nos estudos estruturais foi possível determinar os principais contatos envolvidos na ligação das cNLSs à $\text{Imp}\alpha$ (um esquema geral para os contatos entre a $\text{Imp}\alpha$ e a cNLS é mostrado na Figura 3), e assim, propor sequências-consenso para ambos os tipos de cNLSs. As cNLSs monopartidas são definidas como **K(K/R)X(K/R)**, enquanto que as bipartidas correspondem a KRX₁₀₋₁₂**KRRK**, KRX₁₀₋₁₂**K(KR)(KR)** e KRX₁₀₋₁₂**K(K/R)X(K/R)** (X corresponde a qualquer resíduo, resíduos de lisina em negrito indicam a posição crítica em P2 e os motivos KR do sítio secundário estão sublinhados) (MARFORI et al., 2011; MARFORI et al., 2012).

Apesar de todo o avanço na elucidação dos mecanismos de importação nuclear para

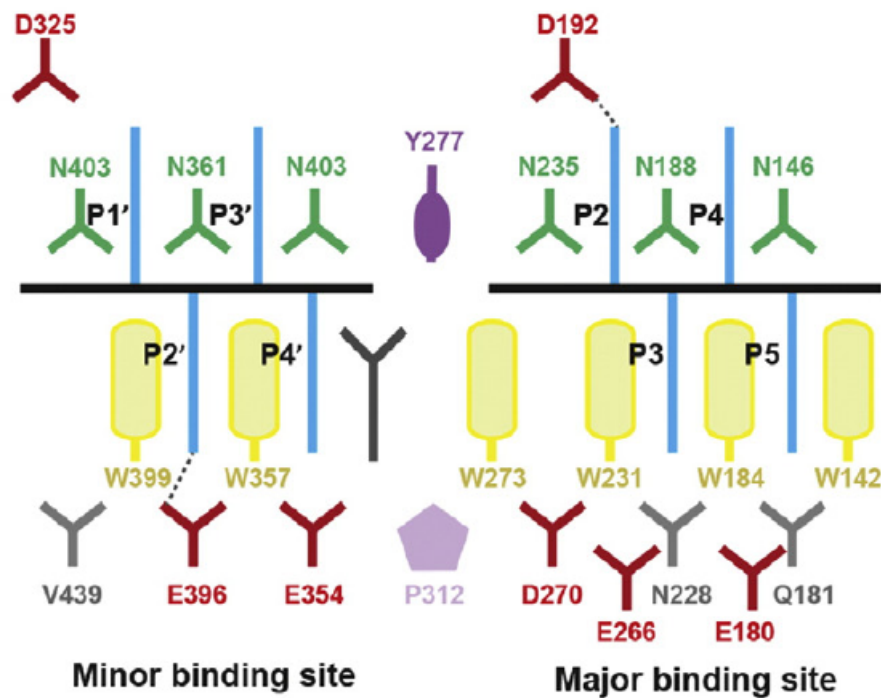


Figura 3 – Representação esquemática de uma NLS monopartida ligada à Imp α nos sítios principal (*major binding site*) e secundário (*minor binding site*) [adaptado de Christie et al. (2015)]. Resíduos de asparagina e triptofano conservados da Imp α são mostrados em verde e amarelo, respectivamente. As cadeias principal e lateral da cNLS são mostradas como linhas pretas e azuis, respectivamente. Linhas tracejadas indicam interações de ponte salina comuns nas cavidades de ligação P2 e P2'.

as vias clássicas, questões importantes ainda permanecem. Os movimentos funcionalmente importantes que a Imp α pode adotar durante o reconhecimento da cNLS ainda não foram explorados, bem como uma análise sistemática das interações na região *linker* a fim de avaliar a ocupação destes contatos durante a sua ligação à Imp α . A maior parte dos estudos estruturais com Imp α tiveram um enfoque estático do sistema estudado. Uma abordagem interessante para tratar questões dinâmicas de um sistema é o uso de técnicas computacionais envolvendo a simulação de biomoléculas. Elas permitem analisar a evolução de componentes interativos da molécula e acessar comportamentos dinâmicos globais do sistema, que seriam de alto custo ou de difíceis (até mesmo limitados) procedimentos para serem obtidos experimentalmente.

1.3 Simulação computacional de biomoléculas

1.3.1 Dinâmica molecular

Ao longo do último meio século, os avanços em biologia estrutural forneceram a resolução atômica de muitas das moléculas que são essenciais à vida, incluindo

proteínas e ácidos nucleicos (DROR et al., 2012). Embora modelos estruturais estáticos determinados por meio de técnicas como a cristalografia de raios-X sejam extremamente úteis, as moléculas que estes modelos representam são, na realidade, altamente dinâmicas, e seus movimentos são muitas vezes fundamentais para a sua função celular (DROR et al., 2012).

As proteínas estão envolvidas em processos biológicos como metabolismo, transmissão de sinal, armazenamento de energia, defesa contra invasores e formação de tecido muscular. A capacidade para a realização dessas funções depende das possíveis alterações conformacionais da proteína, da dinâmica dessas conformações e das conseqüentes interações geradas (HALPERIN et al., 2002). Um completo entendimento da função proteica, portanto, requer uma compreensão tanto do comportamento da dinâmica como das características estruturais estáticas da proteína (GIPSON et al., 2012).

Simulações computacionais de sistemas biomoleculares têm crescido rapidamente ao longo das últimas décadas, simulando desde proteínas muito pequenas no vácuo até grandes complexos de proteínas na presença de solvente (KARPLUS; MCCAMMON, 2002; OROZCO, 2014). Neste contexto, a simulação de dinâmica molecular é uma ferramenta computacional amplamente utilizada para simular as propriedades dos líquidos e sólidos a nível atômico em áreas de investigação, tais como a química, termodinâmica e várias outras áreas (YANG; WANG; CHEN, 2007). Simulações de dinâmica molecular *all atom*, empregando mecânica clássica, permitiram o estudo de complexos muito grandes de proteínas, tais como o ribossomo (SOTHISELVAM et al., 2014) e capsídeos de vírus (SUN et al., 2013; ZHAO et al., 2013). Métodos híbridos QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) permitiram o estudo da atividade enzimática (SENN; THIEL, 2007) e moléculas polarizáveis em membranas biológicas (BERNARDI; PASCUTTI, 2012).

Métodos computacionais de simulação biomolecular oferecem uma clara vantagem no entendimento da flexibilidade da proteína, podendo caracterizar a dinâmica deste sistema. Neste contexto, simulações de dinâmica molecular modelam as interações físicas entre átomos resolvendo as equações de movimento de Newton, Lagrange ou Langenvin (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). No entanto, a solução da dinâmica desses sistemas é complicada (SCHLICK et al., 1999; HENZLER-WILDMAN; KERN, 2007). Simulações de dinâmica molecular são ainda limitadas em dois aspectos: precisão dos campos de força e alto custo computacional. Essas limitações podem gerar uma amostragem inadequada dos estados conformacionais, limitando a capacidade de analisar e revelar propriedades funcionais dos sistemas examinados. Moléculas biológicas são conhecidas por terem perfis rugosos de energia, com muitos mínimos locais frequentemente separados por barreiras de alta energia (ONUCHIC; LUTHEY-SCHULTEN; WOLYNES, 1997), o que pode ocasionar num aprisionamento em algum estado não-funcional, de difícil deslocamento pela maioria dos métodos de simulações convencionais. Estudos recentes têm demonstrado que, de fato,

em simulações longas, as proteínas podem ficar “presas” em conformações não relevantes sem conseguir voltar à conformação original funcionalmente relevante (BERGONZO et al., 2013; MARSILI et al., 2010). Na tentativa de sobrepor essas limitações, vários métodos têm sido desenvolvidos para esta finalidade, como dinâmica molecular com troca de réplica (*replica-exchange molecular dynamics*) (REMD) (SUGITA; OKAMOTO, 1999; GARCÍA; SANBONMATSU, 2001), metadinâmica (LAIO; PARRINELLO, 2002; BARDUCCI; BUSSI; PARRINELLO, 2008) e simulação por termalização generalizada (*generalized simulated annealing*) (TSALLIS; STARIOLO, 1996). Outra alternativa para expandir a exploração conformacional de proteínas tem sido a aplicação do método analítico de modos normais de vibração. Independentemente dos métodos aplicados, todos estão associados a vantagens e desvantagens para a simulação efetiva de sistemas biológicos e a escolha adequada de qual método utilizar está atrelada à particularidade e ao tipo de informação que se deseja obter a partir de cada sistema biológico de interesse.

1.3.2 Análise de modos normais

Nas últimas décadas, houve um grande aumento no número de estudos baseados na análise de componentes principais de estruturas biomoleculares (JOLLIFFE, 2002). Estes estudos têm se mostrado útil em desvendar os modos coletivos, e em particular aqueles modos de baixa frequência, que fundamentam a dinâmica em equilíbrio de proteínas (KITAO; GO, 1999). Análise de modos normais de estruturas em equilíbrio (BAHAR; RADER, 2005; CUI; BAHAR, 2010), análise da dinâmica essencial de matrizes de covariância obtidas de simulações de dinâmica molecular (AMADEI; LINSSEN; BERENDSEN, 1994) e decomposição em valores singulares de trajetórias de dinâmica molecular ou Monte Carlo (BAHAR et al., 1997; GARCÍA; HARMAN, 1996; ROMO et al., 1995), todos estes compõem a categoria de métodos baseados em análise de componentes principais.

Análise de modo normal é uma ferramenta poderosa para prever os possíveis movimentos de uma determinada macromolécula. Modos normais de vibração são oscilações harmônicas simples a partir de um mínimo local de energia, característico de um sistema de estrutura \vec{R} e sua função de energia $V(\vec{R})$ (CUI; BAHAR, 2010). Para uma função $V(\vec{R})$ puramente harmônica, qualquer movimento pode ser exatamente expresso como uma combinação de modos normais (CUI; BAHAR, 2010). Para uma função $V(\vec{R})$ não-harmônica, o potencial próximo ao ponto de mínimo de energia ainda pode ser aproximado apropriadamente por um potencial harmônico e qualquer movimento de pequena amplitude ainda pode ser bem descrito por uma soma de modos normais (CUI; BAHAR, 2010).

Uma aplicação importante dos modos normais é a identificação de potenciais mudanças de conformação, por exemplo, de enzimas após a associação do ligante (TAMA et al., 2000; TAMA; SANEJOUAND, 2001; DELARUE; SANEJOUAND, 2002). O método também tem sido utilizado recentemente no estudo da abertura dos canais de membrana

(VALADIE et al., 2003), na análise de movimentos estruturais do ribossomo (TAMA et al., 2003), na maturação do capsídeo de vírus (KIM; JERNIGAN; CHIRIKJIAN, 2003) e na análise de movimentos de domínio em grandes proteínas em geral (HINSEN, 1998; HINSEN; THOMAS; FIELD, 1999).

Análise de modos normais é mais frequentemente usada na tentativa de prever que tipo de mudança conformacional uma proteína sofre, a fim de cumprir a sua função, por meio da análise de seus modos de menor frequência e, conseqüentemente, maior amplitude. Normalmente, 50% dos movimentos observados na proteína podem ser descritos com precisão apenas por um ou dois modos de baixa frequência (SUHRE; SANEJOUAND, 2004).

Cálculos de modos normais de moléculas de interesse biológico foram introduzidos vários anos após a primeira simulação de dinâmica molecular (CUI; BAHAR, 2010). É reconhecido que os modos normais têm vários atributos importantes, que os tornam de interesse como um complemento para simulações de dinâmica molecular. A principal desvantagem dos modos normais é justamente a sua aproximação do potencial total por uma função harmônica em torno de uma estrutura de mínima energia (CUI; BAHAR, 2010). Apesar de ser uma aproximação harmônica, há vantagens importantes que a tornam uma técnica que vem sendo utilizada em estudos de dinâmica de macromoléculas: (a) ao contrário de simulações de dinâmica molecular, os resultados são essencialmente precisos e sem erros estatísticos, (b) é necessária apenas a diagonalização de uma matriz, (c) a quantificação, que é de particular importância para os cálculos de calor e cálculos específicos de entropia, pode ser introduzida de uma forma simples, e (d) o fornecimento de informações sobre as alterações de conformação é muitas vezes mais fácil de visualizar do que simulações de dinâmica molecular, principalmente por proporcionar a observação de movimentos de maior amplitude (CUI; BAHAR, 2010).

Diferentes exemplos demonstram movimentos de transição funcionalmente importantes, frequentemente seguindo as trajetórias de um ou mais modos normais (MA, 2005). Uma conclusão importante nestes estudos é que as estruturas das proteínas evoluíram de uma maneira em que as flexibilidades estruturais intrínsecas, observadas nos modos normais, facilitam a ocorrência de variações conformacionais funcionalmente importantes.

A combinação do cálculo de modos normais com simulações de dinâmica molecular curtas tem favorecido a maior exploração conformacional atrelada a um refinamento das estruturas geradas. Recentemente, foi desenvolvido um protocolo de *dinâmica molecular com modos normais excitados* (COSTA et al., 2015), em que é possível explorar os perfis de energia livre de mudanças conformacionais amplas.

5 Considerações finais

A abordagem utilizada nesta tese combinando Dinâmica Molecular e Análise de Modos Normais se mostrou uma boa estratégia para compreender tanto a dinâmica como as interações do nosso sistema estudado.

As análises do complexo Nucleoplasmina- $\text{Imp}\alpha$ nos mostrou os possíveis movimentos apresentados durante o reconhecimento do peptídeo NLS. Apesar do nosso estudo enfatizar NLSs clássicas bipartidas, os resultados obtidos principalmente com os movimentos de alta amplitude da $\text{Imp}\alpha$ podem também estar presentes e serem igualmente importantes para outras NLSs, incluindo NLSs clássicas monopartidas e NLSs não clássicas. Fica cada vez mais claro que as proteínas de formato solenóide normalmente apresentam alta flexibilidade, e essa característica parece ser funcionalmente importante por gerar plasticidade de ligação, possibilitando o reconhecimento de proteínas com tamanhos e formatos distintos.

Além disso, com os dados que geramos, novas análises podem ser realizadas, em especial, para entender melhor o papel da região *linker*. Uma abordagem interessante seria a realização de mutações ou deleções em sequências NLS e a posterior avaliação dos seus efeitos nas interações com a $\text{Imp}\alpha$. Uma análise semelhante que estamos realizando é com relação ao nosso estudo com a NLS da proteína Ku70. Apesar do nosso objetivo principal ser a caracterização da Ku70NLS como monopartida ou bipartida, estamos tentando avaliar um modelo de NLS com um possível *linker* de tamanho reduzido ao que a literatura afirma como tamanho mínimo. Portanto, esses resultados poderão nos fornecer dados importantes para a atualização da definição de NLS clássicas, e nos servir de base para outras NLSs ainda não estudadas.

Por fim, para complementar e compreender melhor os nossos dados de simulação para a Ku70, pretendemos realizar experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). A técnica de ITC é uma técnica biofísica que avalia interações bioquímicas entre moléculas em virtude de calor absorvido ou gerado por essa interação. Essa medida de calor permite uma determinação acurada de constantes de ligação (K_b), reações de estequiometria (n), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS). Dessa maneira, é obtido um perfil termodinâmico da interação molecular em um único experimento. Por ser uma técnica que vai além das afinidades de ligação e possibilita a elucidação do mecanismo de interação molecular, como o número de sítios de ligação, a ITC é uma boa escolha para validação experimental das interações macromoleculares. Assim, poderemos complementar os nossos dados de simulação computacional referente à ligação entre Ku70NLS e $\text{Imp}\alpha$.

Referências

- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical reviews**, ACS Publications, v. 106, n. 5, p. 1589–1615, 2006. Citado na página 18.
- ALEXANDROV, V. et al. Normal modes for predicting protein motions: a comprehensive database assessment and associated web tool. **Protein science**, Wiley Online Library, v. 14, n. 3, p. 633–643, 2005. Citado na página 36.
- AMADEI, A.; LINSSEN, A.; BERENDSEN, H. Essential dynamics of proteins. **Proteins Structure Function and Bioinformatics**, n. 17, p. 412–25, 1994. Citado na página 19.
- ANDRADE, M. A.; BORK, P. Heat repeats in the huntington’s disease protein. **Nature genetics**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 2, p. 115–116, 1995. Citado na página 11.
- BAHAR, I. et al. Efficient characterization of collective motions and interresidue correlations in proteins by low-resolution simulations. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 36, n. 44, p. 13512–13523, 1997. Citado na página 19.
- BAHAR, I.; RADER, A. Coarse-grained normal mode analysis in structural biology. **Current opinion in structural biology**, Elsevier, v. 15, n. 5, p. 586–592, 2005. Citado na página 19.
- BAKAN, A.; MEIRELES, L. M.; BAHAR, I. Prody: protein dynamics inferred from theory and experiments. **Bioinformatics**, Oxford Univ Press, v. 27, n. 11, p. 1575–1577, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 63.
- BARDUCCI, A.; BUSSI, G.; PARRINELLO, M. Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method. **Physical review letters**, APS, v. 100, n. 2, p. 020603, 2008. Citado na página 19.
- BARROS, A. C. de et al. Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (fen1). **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 68, n. 7, p. 743–750, 2012. Citado 6 vezes nas páginas 16, 25, 35, 62, 68 e 69.
- BARROS, A. C. de et al. Structural and calorimetric studies demonstrate that xeroderma pigmentosum type g (xpg) can be imported to the nucleus by a classical nuclear import pathway via a monopartite nls sequence. **Journal of Molecular Biology**, Elsevier, 2016. Citado na página 34.
- BERGONZO, C. et al. Multidimensional replica exchange molecular dynamics yields a converged ensemble of an rna tetranucleotide. **Journal of chemical theory and computation**, ACS Publications, v. 10, n. 1, p. 492–499, 2013. Citado na página 19.
- BERNARDES, N. E. et al. Structure of importin- α from a filamentous fungus in complex with a classical nuclear localization signal. **PloS one**, Public Library of Science, v. 10, n. 6, p. e0128687, 2015. Citado na página 35.

BERNARDI, R. C.; PASCUTTI, P. G. Hybrid qm/mm molecular dynamics study of benzocaine in a membrane environment: how does a quantum mechanical treatment of both anesthetic and lipids affect their interaction. **Journal of Chemical Theory and Computation**, ACS Publications, v. 8, n. 7, p. 2197–2203, 2012. Citado na página 18.

BISCHOFF, F. R. et al. Rangap1 induces gtpase activity of nuclear ras-related ran. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 91, n. 7, p. 2587–2591, 1994. Citado na página 12.

BISCHOFF, F. R.; PONSTINGL, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on ran by the mitotic regulator rcc1. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 354, n. 6348, p. 80–82, 1991. Citado na página 12.

BROOKS, B.; KARPLUS, M. Normal modes for specific motions of macromolecules: application to the hinge-bending mode of lysozyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 82, n. 15, p. 4995–4999, 1985. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 36.

BROOKS, B. R. et al. Charmm: the biomolecular simulation program. **Journal of computational chemistry**, Wiley Online Library, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 64.

BRÜSCHWEILER, R. Collective protein dynamics and nuclear spin relaxation. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 102, n. 8, p. 3396–3403, 1995. Citado na página 28.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007. Citado na página 26.

CHEN, M.-H. et al. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin α . **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 280, n. 11, p. 10599–10606, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 16, 25, 35 e 69.

CHEN, V. B. et al. Molprobit: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 63.

CHOOK, Y.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Current opinion in structural biology**, Elsevier, v. 11, n. 6, p. 703–715, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14.

CHRISTIE, M. et al. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. **Journal of molecular biology**, Elsevier, 2015. Citado 5 vezes nas páginas 13, 17, 24, 35 e 62.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human dna repair: an update. **Toxicology**, Elsevier, v. 193, n. 1, p. 3–34, 2003. Citado na página 62.

CINGOLANI, G. et al. Structure of importin- β bound to the ibb domain of importin- α . **Nature**, Nature Publishing Group, v. 399, n. 6733, p. 221–229, 1999. Citado na página 24.

- COLLEDGE, W. et al. Extensive mutagenesis of the nuclear location signal of simian virus 40 large-t antigen. **Molecular and cellular biology**, Am Soc Microbiol, v. 6, n. 11, p. 4136–4139, 1986. Citado na página 16.
- CONTI, E.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . **Structure**, Elsevier, v. 8, n. 3, p. 329–338, 2000. Citado 5 vezes nas páginas 12, 16, 25, 35 e 69.
- CONTI, E. et al. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . **Cell**, Elsevier, v. 94, n. 2, p. 193–204, 1998. Citado 3 vezes nas páginas 12, 15 e 24.
- COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu. Rev. Biochem.**, Annual Reviews, v. 76, p. 647–671, 2007. Citado na página 12.
- COSTA, M. G. d. S. et al. Exploring free energy landscapes of large conformational changes: Molecular dynamics with excited normal modes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, ACS Publications, 2015. Citado 5 vezes nas páginas 20, 63, 64, 67 e 70.
- CRONSHAW, J. M. et al. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. **The Journal of cell biology**, Rockefeller Univ Press, v. 158, n. 5, p. 915–927, 2002. Citado na página 11.
- CUI, Q.; BAHAR, I. **Normal mode analysis: theory and applications to biological and chemical systems**. [S.l.]: CRC press, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- CUTRESS, M. L. et al. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **Journal of cell science**, The Company of Biologists Ltd, v. 121, n. 7, p. 957–968, 2008. Citado 4 vezes nas páginas 16, 25, 35 e 69.
- DELARUE, M.; SANEJOUAND, Y.-H. Simplified normal mode analysis of conformational transitions in dna-dependent polymerases: the elastic network model. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 320, n. 5, p. 1011–1024, 2002. Citado na página 19.
- DINGWALL, C.; LASKEY, R. Nucleoplasmin: the archetypal molecular chaperone. In: **Seminars in cell biology**. [S.l.: s.n.], 1990. v. 1, n. 1, p. 11–17. Citado na página 25.
- DINGWALL, C. et al. The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of sv-40 large t antigen. **The Journal of cell biology**, Rockefeller Univ Press, v. 107, n. 3, p. 841–849, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 24.
- DOYLE, L. et al. Rational design of α -helical tandem repeat proteins with closed architectures. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 528, n. 7583, p. 585–588, 2015. Citado na página 24.
- DROR, R. O. et al. Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. **Annual review of biophysics**, Annual Reviews, v. 41, p. 429–452, 2012. Citado na página 18.
- EMSLEY, P. et al. Features and development of coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010. Citado na página 29.

- ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. Citado na página 26.
- ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using modeller. **Current protocols in bioinformatics**, Wiley Online Library, p. 5–6, 2006. Citado na página 26.
- FAHRENKROG, B.; AEBI, U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nature Publishing Group, v. 4, n. 10, p. 757–766, 2003. Citado 3 vezes nas páginas 11, 13 e 14.
- FALCES, J. et al. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin α/β : insights into a complete import complex. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 49, n. 45, p. 9756–9769, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 69.
- FELDHERR, C. M.; AKIN, D.; COHEN, R. J. Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. **Journal of cell science**, The Company of Biologists Ltd, v. 114, n. 24, p. 4621–4627, 2001. Citado na página 11.
- FLOCH, A. G.; PALANCADE, B.; DOYE, V. Fifty years of nuclear pores and nucleocytoplasmic transport studies: multiple tools revealing complex rules. **Methods in cell biology**, v. 122, p. 1–40, 2013. Citado na página 11.
- FLOQUET, N. et al. Conformational equilibrium of cdk/cyclin complexes by molecular dynamics with excited normal modes. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 109, n. 6, p. 1179–1189, 2015. Citado na página 28.
- FONTES, M. R. et al. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 278, n. 30, p. 27981–27987, 2003. Citado 7 vezes nas páginas 16, 24, 25, 34, 35, 62 e 69.
- FONTES, M. R.; TEH, T.; KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 297, n. 5, p. 1183–1194, 2000. Citado 9 vezes nas páginas 15, 16, 25, 30, 34, 35, 62, 68 e 69.
- FORWOOD, J. K. et al. Quantitative structural analysis of importin- β flexibility: paradigm for solenoid protein structures. **Structure**, Elsevier, v. 18, n. 9, p. 1171–1183, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 33.
- GARCÍA, A. E.; HARMAN, J. G. Simulations of crp:(camp) 2 in noncrystalline environments show a subunit transition from the open to the closed conformation. **Protein science: a publication of the Protein Society**, Blackwell Publishing, v. 5, n. 1, p. 62, 1996. Citado na página 19.
- GARCÍA, A. E.; SANBONMATSU, K. Y. Exploring the energy landscape of a β hairpin in explicit solvent. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 42, n. 3, p. 345–354, 2001. Citado na página 19.
- GENHEDEN, S.; RYDE, U. Will molecular dynamics simulations of proteins ever reach equilibrium? **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 24, p. 8662–8677, 2012. Citado na página 36.

GERALDO, M. T. et al. Bending-twisting motions and main interactions in nucleoplasmin nuclear import. **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 11, n. 6, p. e0157162, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 65 e 69.

GIESECKE, A.; STEWART, M. Novel binding of the mitotic regulator tpx2 (target protein for xenopus kinesin-like protein 2) to importin- α . **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 285, n. 23, p. 17628–17635, 2010. Citado 4 vezes nas páginas 16, 25, 35 e 69.

GIPSON, B. et al. Computational models of protein kinematics and dynamics: Beyond simulation. **Annual review of analytical chemistry**, Annual Reviews, v. 5, p. 273–291, 2012. Citado na página 18.

GÖRLICH, D. et al. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. **The EMBO Journal**, Nature Publishing Group, v. 15, n. 8, p. 1810, 1996. Citado na página 24.

GÖRLICH, D. et al. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. **Current Biology**, Elsevier, v. 5, n. 4, p. 383–392, 1995. Citado na página 24.

GÖRLICH, D.; KUTAY, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annual review of cell and developmental biology**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 15, n. 1, p. 607–660, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 11, 13 e 14.

GÖRLICH, D. et al. Identification of different roles for rangdp and rangtp in nuclear protein import. **The EMBO journal**, Nature Publishing Group, v. 15, n. 20, p. 5584, 1996. Citado na página 12.

GÖRLICH, D. et al. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. Nature Publishing Group, 1995. Citado na página 12.

GROSSFIELD, A.; ZUCKERMAN, D. M. Quantifying uncertainty and sampling quality in biomolecular simulations. **Annual reports in computational chemistry**, Elsevier, v. 5, p. 23–48, 2009. Citado na página 36.

HALPERIN, I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 47, n. 4, p. 409–443, 2002. Citado na página 18.

HAYWARD, S.; KITAO, A.; BERENDSEN, H. J. Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: a comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 27, n. 3, p. 425–437, 1997. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 36.

HENZLER-WILDMAN, K.; KERN, D. Dynamic personalities of proteins. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 450, n. 7172, p. 964–972, 2007. Citado na página 18.

HESS, B. P-lincs: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, ACS Publications, v. 4, n. 1, p. 116–122, 2008. Citado na página 26.

- HESS, B. et al. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, Citeseer, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Citado na página 26.
- HINSEN, K. Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. **Proteins Structure Function and Genetics**, v. 33, n. 3, p. 417–429, 1998. Citado na página 20.
- HINSEN, K.; THOMAS, A.; FIELD, M. J. Analysis of domain motions in large proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 34, n. 3, p. 369–382, 1999. Citado na página 20.
- HODEL, M. R.; CORBETT, A. H.; HODEL, A. E. Dissection of a nuclear localization signal. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 276, n. 2, p. 1317–1325, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 25.
- HUANG, J.; MACKERELL, A. D. Charmm36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to nmr data. **Journal of computational chemistry**, Wiley Online Library, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013. Citado na página 26.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. Vmd: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, Elsevier, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Citado na página 29.
- ICHIYE, T.; KARPLUS, M. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 11, n. 3, p. 205–217, 1991. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 36.
- IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: a language for data analysis and graphics. **Journal of computational and graphical statistics**, Taylor & Francis, v. 5, n. 3, p. 299–314, 1996. Citado na página 29.
- JOLLIFFE, I. T. Principal component analysis, ser. **Springer Ser. Statist., 2nd ed.** New York: Springer, 2002. Citado na página 19.
- JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983. Citado na página 26.
- KAJAVA, A. V. Review: proteins with repeated sequence—structural prediction and modeling. **Journal of structural biology**, Elsevier, v. 134, n. 2, p. 132–144, 2001. Citado na página 33.
- KALDERON, D. et al. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-t antigen. Nature Publishing Group, 1984. Citado na página 15.
- KALDERON, D. et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, Elsevier, v. 39, n. 3, p. 499–509, 1984. Citado na página 24.
- KAPPEL, C. et al. An unusual hydrophobic core confers extreme flexibility to heat repeat proteins. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 99, n. 5, p. 1596–1603, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.

- KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural & Molecular Biology**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002. Citado na página 18.
- KESKIN, O. et al. Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 83, n. 2, p. 663–680, 2002. Citado na página 33.
- KIM, M. K.; JERNIGAN, R. L.; CHIRIKJIAN, G. S. An elastic network model of hk97 capsid maturation. **Journal of Structural Biology**, Elsevier, v. 143, n. 2, p. 107–117, 2003. Citado na página 20.
- KIRBY, T. W. et al. Nuclear localization of the dna repair scaffold xrccl: Uncovering the functional role of a bipartite nls. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 5, 2015. Citado na página 34.
- KITAO, A.; GO, N. Investigating protein dynamics in collective coordinate space. **Current opinion in structural biology**, Elsevier, v. 9, n. 2, p. 164–169, 1999. Citado na página 19.
- KNUDSEN, N. Ø. et al. Nuclear translocation contributes to regulation of dna excision repair activities. **DNA repair**, Elsevier, v. 8, n. 6, p. 682–689, 2009. Citado na página 62.
- KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . **Nature Structural & Molecular Biology**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 4, p. 388–397, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 12, 24 e 34.
- KOBE, B.; KAJAVA, A. V. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. **Trends in biochemical sciences**, Elsevier, v. 25, n. 10, p. 509–515, 2000. Citado 3 vezes nas páginas 11, 24 e 33.
- KOIKE, M. et al. Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of ku70 using its own nuclear localization signal. **Oncogene**, v. 18, n. 52, p. 7495–7505, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 62 e 63.
- KOIKE, M. et al. The nuclear localization signal of the human ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. **Experimental cell research**, Elsevier, v. 250, n. 2, p. 401–413, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 62, 63 e 68.
- KOIKE, M.; SHIOMI, T.; KOIKE, A. Dimerization and nuclear localization of ku proteins. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 276, n. 14, p. 11167–11173, 2001. Citado na página 62.
- KOSUGI, S. et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 284, n. 1, p. 478–485, 2009. Citado 4 vezes nas páginas 13, 24, 35 e 69.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 372, n. 3, p. 774–797, 2007. Citado na página 26.

- KUTAY, U.; GÜTTINGER, S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. **Trends in cell biology**, Elsevier, v. 15, n. 3, p. 121–124, 2005. Citado na página 12.
- LAI, M.-C. et al. A human importin- β family protein, transportin-sr2, interacts with the phosphorylated rs domain of sr proteins. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 275, n. 11, p. 7950–7957, 2000. Citado na página 16.
- LAINE, E. et al. Mutation d816v alters the internal structure and dynamics of c-kit receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. **PLoS Comput Biol**, v. 7, n. 6, p. e1002068–e1002068, 2011. Citado na página 70.
- LAI, A.; PARRINELLO, M. Escaping free-energy minima. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 99, n. 20, p. 12562–12566, 2002. Citado na página 19.
- LANGE, A. et al. Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. **Traffic**, Wiley Online Library, v. 11, n. 3, p. 311–323, 2010. Citado na página 69.
- LEE, S. J. et al. The adoption of a twisted structure of importin- β is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 302, n. 1, p. 251–264, 2000. Citado na página 33.
- LEE, S. J. et al. Structural basis for nuclear import complex dissociation by rangtp. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 435, n. 7042, p. 693–696, 2005. Citado na página 24.
- LEUNG, S. W. et al. Dissection of the karyopherin α nuclear localization signal (nls)-binding groove: Functional requirements for nls binding. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 278, n. 43, p. 41947–41953, 2003. Citado na página 15.
- LYMAN, E.; ZUCKERMAN, D. M. Ensemble-based convergence analysis of biomolecular trajectories. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 91, n. 1, p. 164–172, 2006. Citado na página 27.
- MA, J. Usefulness and limitations of normal mode analysis in modeling dynamics of biomolecular complexes. **Structure**, Elsevier, v. 13, n. 3, p. 373–380, 2005. Citado na página 20.
- MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The journal of physical chemistry B**, ACS Publications, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998. Citado na página 26.
- MAKKERH, J. P.; DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. **Current Biology**, Elsevier, v. 6, n. 8, p. 1025–1027, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 25.
- MARFORI, M. et al. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin- α . **Traffic**, Wiley Online Library, v. 13, n. 4, p. 532–548, 2012. Citado 10 vezes nas páginas 12, 16, 24, 25, 30, 34, 35, 62, 68 e 69.
- MARFORI, M. et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Elsevier, v. 1813, n. 9, p. 1562–1577, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 63.

MARSILI, S. et al. Orac: A molecular dynamics simulation program to explore free energy surfaces in biomolecular systems at the atomistic level. **Journal of computational chemistry**, Wiley Online Library, v. 31, n. 5, p. 1106–1116, 2010. Citado na página 19.

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 432, n. 7019, p. 872–877, 2004. Citado na página 24.

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Nup50/npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. **The EMBO journal**, EMBO Press, v. 24, n. 21, p. 3681–3689, 2005. Citado na página 24.

MOROIANU, J.; BLOBEL, G.; RADU, A. Nuclear protein import: Ran-gtp dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 93, n. 14, p. 7059–7062, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 24.

OCHI, T. et al. Structural biology of dna repair: spatial organisation of the multicomponent complexes of nonhomologous end joining. **Journal of nucleic acids**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2010, 2010. Citado na página 62.

ONUCHIC, J. N.; LUTHEY-SCHULTEN, Z.; WOLYNES, P. G. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. **Annual review of physical chemistry**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 48, n. 1, p. 545–600, 1997. Citado na página 18.

OROZCO, M. A theoretical view of protein dynamics. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 43, n. 14, p. 5051–5066, 2014. Citado na página 18.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied physics**, AIP Publishing, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981. Citado na página 27.

PEMBERTON, L. F.; PASCHAL, B. M. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. **Traffic**, Wiley Online Library, v. 6, n. 3, p. 187–198, 2005. Citado 3 vezes nas páginas 11, 13 e 14.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of dna double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, Oxford Univ Press, v. 15, n. 4, p. 289–302, 2000. Citado na página 62.

PUMROY, R. A. et al. Molecular determinants for nuclear import of influenza a pb2 by importin α isoforms 3 and 7. **Structure**, Elsevier, v. 23, n. 2, p. 374–384, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 34.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2015. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Citado na página 65.

RADU, A.; BLOBEL, G.; MOORE, M. S. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 92, n. 5, p. 1769–1773, 1995. Citado na página 24.

- REXACH, M.; BLOBEL, G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. **Cell**, Elsevier, v. 83, n. 5, p. 683–692, 1995. Citado na página 12.
- RIGGLEMAN, B.; WIESCHAUS, E.; SCHEDL, P. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a drosophila segment polarity gene. **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 3, n. 1, p. 96–113, 1989. Citado na página 24.
- ROBBINS, J. et al. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. **Cell**, Elsevier, v. 64, n. 3, p. 615–623, 1991. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 24.
- ROMO, T. et al. Singular value decomposition analysis of time-averaged crystallographic refinement. **Proteins**, v. 22, p. 311–321, 1995. Citado na página 19.
- ROUT, M. P. et al. The yeast nuclear pore complex composition, architecture, and transport mechanism. **The Journal of cell biology**, Rockefeller Univ Press, v. 148, n. 4, p. 635–652, 2000. Citado na página 11.
- ROUT, M. P.; WENTE, S. R. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. **Trends in cell biology**, Elsevier, v. 4, n. 10, p. 357–365, 1994. Citado na página 11.
- SCHLICK, T. et al. Algorithmic challenges in computational molecular biophysics. **Journal of Computational Physics**, Elsevier, v. 151, n. 1, p. 9–48, 1999. Citado na página 18.
- SCHRÖDINGER, L. The pymol molecular graphics system, version 1.3 r1; schrödinger, llc. **New York**, 2010. Citado na página 30.
- SEEBER, M. et al. Wordom: a program for efficient analysis of molecular dynamics simulations. **Bioinformatics**, Oxford Univ Press, v. 23, n. 19, p. 2625–2627, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 29, 65 e 66.
- SENN, H. M.; THIEL, W. Qm/mm methods for biological systems. In: **Atomistic approaches in modern biology**. [S.l.]: Springer, 2007. p. 173–290. Citado na página 18.
- SETTANNI, G. et al. Effects of ligand binding on the mechanical properties of ankyrin repeat protein gankyrin. **PLoS Comput Biol**, Public Library of Science, v. 9, n. 1, p. e1002864, 2013. Citado na página 24.
- SKJAERVEN, L.; MARTINEZ, A.; REUTER, N. Principal component and normal mode analysis of proteins; a quantitative comparison using the groel subunit. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 79, n. 1, p. 232–243, 2011. Citado na página 36.
- SOTHISELVAM, S. et al. Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 111, n. 27, p. 9804–9809, 2014. Citado na página 18.
- STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 3, p. 195–208, 2007. Citado 5 vezes nas páginas 11, 12, 13, 14 e 62.

- SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. **Chemical physics letters**, Elsevier, v. 314, n. 1, p. 141–151, 1999. Citado na página 19.
- SUHRE, K.; SANEJOUAND, Y.-H. Elnemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, v. 32, n. suppl 2, p. W610–W614, 2004. Citado na página 20.
- SUN, F. et al. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. **Biophysical Journal**, Elsevier, v. 104, n. 2, p. 414a, 2013. Citado na página 18.
- TAKEDA, A. A. et al. Structural basis of importin- α -mediated nuclear transport for ku70 and ku80. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 412, n. 2, p. 226–234, 2011. Citado na página 63.
- TAKEDA, A. A. et al. Biophysical characterization of the recombinant importin- α from neurospora crassa. **Protein and peptide letters**, Bentham Science Publishers, v. 20, n. 1, p. 8–16, 2013. Citado 3 vezes nas páginas 34, 36 e 69.
- TAMA, F. et al. Building-block approach for determining low-frequency normal modes of macromolecules. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2000. Citado na página 19.
- TAMA, F.; SANEJOUAND, Y.-H. Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. **Protein engineering**, Oxford Univ Press, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 28.
- TAMA, F. et al. Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 100, n. 16, p. 9319–9323, 2003. Citado na página 20.
- TSALLIS, C.; STARIOLO, D. A. Generalized simulated annealing. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, Elsevier, v. 233, n. 1, p. 395–406, 1996. Citado na página 19.
- VALADIE, H. et al. Dynamical properties of the mscl of escherichia coli: a normal mode analysis. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 332, n. 3, p. 657–674, 2003. Citado na página 20.
- WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the ku heterodimer bound to dna and its implications for double-strand break repair. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 412, n. 6847, p. 607–614, 2001. Citado na página 62.
- WEIS, K.; RYDER, U.; LAMOND, A. I. The conserved amino-terminal domain of hsrp1 alpha is essential for nuclear protein import. **The EMBO journal**, European Molecular Biology Organization, v. 15, n. 8, p. 1818, 1996. Citado na página 12.
- YANG, J.; WANG, Y.; CHEN, Y. Gpu accelerated molecular dynamics simulation of thermal conductivities. **Journal of Computational Physics**, Elsevier, v. 221, n. 2, p. 799–804, 2007. Citado na página 18.

YANG, S. N. et al. Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin- α using oriented peptide library screening. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 285, n. 26, p. 19935–19946, 2010. Citado 5 vezes nas páginas 15, 16, 25, 35 e 69.

ZHAO, G. et al. Mature hiv-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 497, n. 7451, p. 643–646, 2013. Citado na página 18.