

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 26/05/23.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DE *Leishmania*
major E SEQUÊNCIA DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE
PROTEÍNA DO METABOLISMO DE LEISHMANIA

Cíntia Akemi Fukuda

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração de Biomoléculas: Estrutura e Função.

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fukuda, Cíntia Akemi.

Estudos estruturais com a Importina- α ; de *leishmania major* e sequência de localização nuclear de proteína do metabolismo de *leishmania* / Cíntia Akemi Fukuda. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos

Fontes Capes: 20804008

1. Cromatografia. 2. Carioferinas. 3. Peptídeos.
4. Proteínas recombinantes. 5. Protozoário.

Palavras-chave: Cromatografia; Importina-alfa;
Leishmania major; Peptídeo NLS; Proteína recombinante.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram para a realização do mesmo de forma direta ou indiretamente, aos meus pais e amigos que me apoiaram durante todo o período acadêmico. Dedico também este trabalho à Francisca, que me criou como se fosse uma segunda filha, desde o momento que abri meus olhos até os últimos momentos que a vida lhe permitiu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Jorge e Eiko por me darem todo o apoio e incentivo para que eu continuasse a realizar o projeto. Obrigada por sempre me deixarem escolher meu próprio caminho me dando todo o apoio em minhas decisões, por me ensinarem a ter perseverança e a sempre se dedicar da melhor maneira possível em cada etapa da vida.

Agradeço a todos os membros, agora amigos, do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural do departamento de Biofísica e Farmacologia, especialmente ao Fábio, Guilherme e Áleff, por me ajudarem nos processos do projeto, auxiliando nos experimentos, discutindo opiniões, alternativas para a resolução de problemas e apoio dentro e fora do laboratório. Também agradeço a Prof^ª. Maria Isabel Nogueira Cano e seus alunos principalmente ao Vítor e a Stephany por me permitirem compartilhar o laboratório e também pelas trocas de informações que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Marcos Roberto de Mattos Fontes por me aceitar no laboratório desde a minha época de graduanda e partilhar de sua experiência para que eu pudesse amadurecer e crescer. Obrigada por todo o tempo e conhecimento compartilhado. Agradeço também a todos os professores que participaram da banca do exame de qualificação e da banca de defesa de dissertação pela dedicação de tempo e pelas contribuições para esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos, em especial a Tainá, Ivan, Hamine, Ana Júlia, Thiago e Letícia por me ajudarem não só com o desenvolvimento deste projeto, mas também emocionalmente, nos altos e baixos. Obrigada por sempre me ajudarem e sempre estarem presentes quando eu necessitava, seja dentro do laboratório ou fora dele.

A todos os outros não citados, também agradeço por terem feito parte desta jornada e terem agregado novas experiências e histórias em minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

A comunicação entre o núcleo celular e o citoplasma acontece por mecanismos de transporte que permitem a passagem de moléculas por poros presentes no envoltório nuclear. Dentre as vias de transporte entre o núcleo e o citoplasma celular conhecidas, a chamada Via Clássica de Importação Nuclear é a mais bem caracterizada. Nessa via, a proteína Importina- α (Imp α) se liga às proteínas que serão transportadas ao núcleo a partir do reconhecimento de sequências de localização nuclear (NLS). A estrutura da proteína Imp α já foi elucidada e caracterizada em alguns organismos. Atualmente estas proteínas são classificadas em três subfamílias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. As diferenças entre as proteínas Imp α de cada família evidenciam as especificidades destas no reconhecimento de NLSs, dependendo do organismo e função que exercem. Ou seja, uma mesma região da proteína pode apresentar variações na afinidade e no modo de ligação quando interage com Imp α de famílias distintas. A leishmaniose é uma doença presente em diversas regiões do Brasil e no mundo. Novos casos da doença vêm aumentando progressivamente e por isso a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado a busca de novos alvos para desenvolver drogas que eliminem eficazmente o parasita. Estudos prévios realizados por nosso grupo e outros mostraram que algumas proteínas são encontradas exclusivamente em parasitas da família *Trypanosomatidae*, como por exemplo a proteína Rbp38, que está envolvida em diversas atividades no núcleo celular. Desta maneira, o estudo do mecanismo de importação nuclear desta família de parasitas pode representar um importante alvo na busca por novos alvos moleculares no combate à leishmaniose. Assim, este trabalho teve como objetivo avançar no entendimento do transporte de proteínas de leishmania para o interior do núcleo celular. Para tanto, produzimos Imp α recombinantes de *Leishmania major* (LmImp α), *Mus musculus* (MmImp α) e *Homo sapiens* (HsImp α) para obter informações comparativas através de técnicas biofísicas. Utilizamos também técnicas bioinformáticas para obter informações sobre um possível modelo do complexo formado da LmImp α com a NLS da proteína Rbp38.

Palavras-chaves: Importina-alfa, Cromatografia de proteínas, proteína recombinante, *Leishmania major*, Peptídeo NLS.

ABSTRACT

Among the transport pathways, that enable the transport of macromolecules in or out the nucleus through the recognition of specific signaling sequences, the Classical Import Nuclear Pathway is the best characterized. In this way, the Importin- α (Imp α) protein acts on the identification of proteins to be transported to the nucleus by the recognition of nuclear localization sequences (NLS). The structure of the Imp α protein has already been elucidated and characterized in some organisms and is classified into three subfamilies: $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$. The differences between the Imp α proteins of each family show the specificities of these proteins in the recognition of NLSs, depending on the organism and function they carry out. The same peptide may exhibit variations in affinity and binding when interacting with Imp α from different families. Leishmaniasis is a disease present in several regions of Brazil and the world. New cases of the disease have been increasing, so the World Health Organization (WHO) has encouraged researches in order to promote new mechanisms for the development of drugs and methodologies against the parasite. Previous studies performed by our group and others showed that some proteins are found exclusively in *Trypanosomatidae* family, for instance, the Rpb38, who is involved in many cellular nucleus activities. This way, the study of nuclear importation mechanism of this parasite family can represent a major target to find new molecular targets in the combat to the leishmaniasis. This work had the purpose to advance the understanding of the protein transportation of leishmania to the nucleus. For this purpose, we produced Imp α from *Leishmania major* (LmImp α), *Mus musculus* (MmImp α) and *Homo sapiens* (HsImp α), all recombinant to obtain comparative information through biophysical techniques and through bioinformatics techniques, information about a possible model of the complex formed from LmImp α with the Rpb38 protein NLS.

Keywords: Importin-alpha, Protein chromatography, recombinant protein, *Leishmania major*, NLS peptide.

SIGLAS E ABREVIACÕES

Abs- Absorbância

ARM- Armandillo

CAS- Exportina *Cellular apoptosis susceptibility*

CD- Dicroísmo Circular

cNLS- Sequências de Localização Nuclear Clássica

DLS- Espalhamento Dinâmico de Luz

DNase- Desoxirribonuclease

DT- Difusão Translacional

DTN- Doença Tropical Negligenciada

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FEN1- Flap-Endonuclease 1

Gel SDS-PAGE- Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Performance

HsImp α - Importina- α de *Homo sapiens*

IBB- *Importin Beta Binding*

IgG- Imunoglobulina G

Imp α - Importina- α

Imp β - Importina- β

IPTG- Isopropil β - d- tiogalactopiranosídeo

ITC- Calorimetria por Titulação Isotérmica

Kd- Constante de Dissociação

kDNA- DNA de Cinetoplasto

LC- Leishmaniose Cutânea

LMC- Leishmaniose Muco Cutânea

LmImp α - Importina- α de *Leishmania major*

LV- Leishmaniose Visceral

Meio LB- Meio Luria Bertani

MmImp α - Importina- α de *Mus musculus*

MW- Peso Molecular (*Molecular Weight*)

N- Estequiometria

NcImp α - Importina- α de *Neurospora crassa*

NE- Envelope Nuclear

NES- Sinais de Exportação Nuclear

NLS- Sequências de Localização Nuclear

NPC- Complexo Poro Nuclear

NPT- Número de Partículas, Pressão e Temperatura Constantes

NVT- Número de Partículas, Volume e Temperatura Constantes

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS- Organização Pan Americana de Saúde

OsImp α - Importina- α de *Oryza sativa*

Pd- Polidispersidade

PDVL- Fluoreto de Polivinilideno

PI- Ponto Isoelétrico

PMSF- Fluoreto de fenilmetilsufonila

RanGAP- Proteína de Ativação da Ran-GTPase

RanGTP- Guanosina trifosfato Ran

Ran-GTPase- Proteína nuclear associada a Ras, com atividade GTPase

Rbp38- RNA *Binding Protein 38*

Rbp38 NLS- Peptídeo da Rbp38

Rg- Raio de Giro

R_H- Raio Hidrodinâmico

RMSD- Desvio da Raiz Quadrática Média

RMSF- Flutuação da Raíz Quadrática Média

RNase- Ribonuclease

RPA- Proteína de Replicação A

ScImp α - Importina- α de *Saccharomyces cerevisiae*

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

ssDNA- *Single Stranded DNA*

SV40- Antígeno T do Vírus de Símio 40

SV40 NLS- Peptídeo da SV40

TBS- Tampão Tris Salina

TCEP- Cloridrato de tris (carboxietil) fosfina

T_{Melting}- Temperatura de Melting

WHO- *World Health Organization*

ΔG - Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
SIGLAS E ABREVIACÕES	VI
LISTA DE FIGURAS	Erro! Indicador não definido.
LISTA DE TABELAS	Erro! Indicador não definido.
SUMÁRIO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Transporte Intracelular de Macromoléculas.....	1
1.1.1 Complexo Poro Nuclear	2
1.1.2 Importina- β	3
1.1.3 Importina- α	3
1.1.4 Via Clássica de Importação Nuclear	5
1.2 Sequência de Localização Nuclear (NLS)	6
1.2.1 cNLS do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS)	8
1.3 Leishmania e a Leishmaniose	8
1.3.1 Leishmaniose no Brasil e no mundo	9
1.3.2 Ciclo de vida.....	11
1.3.3 Leishmania major.....	12
1.3.4 Proteínas de parasitas do gênero Leishmania e seu transporte nuclear.....	12
1.3.5 Proteína Rbp38.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Clonagem e transformação das Imp α truncadas.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.1 Importina- α de Mus musculus (MmImp α).....	Erro! Indicador não definido.

3.1.2 Importina- α de Homo sapiens (HsImp α)	Erro! Indicador não definido.
3.1.3 Importina- α de Leishmania major (LmImp α)	Erro! Indicador não definido.
3.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes MmImp α e HsImp α	Erro! Indicador não definido.
3.3 Expressão, Indução e Obtenção de amostra da proteína recombinante de LmImp α para purificação.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 Purificação da proteína recombinante de LmImp α pelo método de Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC).....	Erro! Indicador não definido.
3.4.1 HPLC por afinidade	Erro! Indicador não definido.
3.4.2 HPLC por Troca iônica	Erro! Indicador não definido.
3.4.3 HPLC por Exclusão Molecular	Erro! Indicador não definido.
3.5 Concentração da amostra	Erro! Indicador não definido.
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	Erro! Indicador não definido.
3.7 <i>Western blot</i>	Erro! Indicador não definido.
3.8 Síntese dos Peptídeos	Erro! Indicador não definido.
3.8.1 Peptídeo Rbp38 (Rbp38 NLS)	Erro! Indicador não definido.
3.8.2 Peptídeo do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS).....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	Erro! Indicador não definido.
3.10 Dicroísmo Circular (CD).....	Erro! Indicador não definido.
3.11 Espectroscopia de Fluorescência.....	Erro! Indicador não definido.
3.12 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	Erro! Indicador não definido.
3.13 Modelagem, <i>Docking</i> e Dinâmica Molecular	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante MmImp α	Erro! Indicador não definido.
4.2 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante HsImp α	Erro! Indicador não definido.

4.3 Transformação e Expressão da Proteína Recombinante LmImp α	Erro! Indicador não definido.
4.4 Lise Celular	Erro! Indicador não definido.
4.5 Purificação da Proteína Recombinante LmImp α	Erro! Indicador não definido.
4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz	Erro! Indicador não definido.
4.7 Dicroísmo Circular	Erro! Indicador não definido.
4.8 Espectroscopia de Fluorescência.....	Erro! Indicador não definido.
4.9 Calorimetria por Titulação Isotérmica	Erro! Indicador não definido.
4.10 Modelagem, Docking e Dinâmica Molecular	Erro! Indicador não definido.
4.10.1. Modelo teórico da LmImp α	Erro! Indicador não definido.
4.10.2. Docking da LmImp α com a Rbp38 NLS	Erro! Indicador não definido.
4.10.3. Modelo teórico da LmImp α em dímero.	Erro! Indicador não definido.
4.11. Comparação dos dados biofísicos e estruturais da LmImp α com as outras Imp α	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
5.1. LmImp α recombinante fica na porção insolúvel da lise celular	Erro! Indicador não definido.
5.2. LmImp α varia sua forma conforme a variação da temperatura afetando sua ligação com a Rbp38 NLS.....	Erro! Indicador não definido.
5.3. LmImp α possui características distintas das outras Imp α ...	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO	15
7. REFERÊNCIAS	16

7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. [s.l: s.n.].
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Den. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMARE, A. R. F.; BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Current Biology**, [s. l.], p. 357–359, 1994.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 64, 2007.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.
- BERNARDES, N. E.; FUKUDA, C. A.; DA SILVA, T. D.; DE OLIVEIRA, H. C.; DE BARROS, A. C.; DREYER, T. R.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- BERNARDES, N. E.; TAKEDA, A. A. S.; DREYER, T. R.; CUPERTINO, F. B.; VIRGILIO, S.; PANTE, N.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin- α . **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 474, n. 24, p. 4091–4104, 2017. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20170654>>
- BERNARDES, N. E.; TAKEDA, A. A. S.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin- from *Neurospora crassa*. **Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 501–504, 2014.
- BIOVIA DS. **Discovery Studio Modeling Environment**. San Diego: Dassault Systèmes. 2017.
- BRAY, R. S. Leishmania. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], n. 3, 1974.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling.

Journal of Chemical Physics, [s. l.], v. 126, n. 1, 2007.

CHANG, C.-W.; COUÑAGO, R. L. M.; WILLIAMS, S. J.; BODÉN, M.; KOBE, B. Crystal Structure of Rice Importin- and Structural Basis of Its Interaction with Plant-Specific Nuclear Localization Signals. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 5074–5088, 2012.

CHANG, C. W.; COUÑAGO, R. M.; WILLIAMS, S. J.; BODEN, M.; KOBE, B. The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin- α . **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2013.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 703–715, 2001.

CHRISTIE, M.; CHANG, C. W.; RÓNA, G.; SMITH, K. M.; STEWART, A. G.; TAKEDA, A. A. S.; FONTES, M. R. M.; STEWART, M.; VÉRTESSY, B. G.; FORWOOD, J. K.; KOBE, B. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 10, p. 2060–2090, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>>

CIEMNY, M.; KURCINSKI, M.; KAMEL, K.; KOLINSKI, A.; ALAM, N.; SCHUELER-FURMAN, O.; KMIĘCIK, S. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>>

CINGOLANI, G.; PETOSA, C.; WEIS, K.; MÜLLER, C. W. Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . **Nature**, [s. l.], v. 399, n. 6733, p. 221–229, 1999.

CLARK, E. de bernardez; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Inhibition of Aggregation Side Reactions during in Vitro Protein Folding. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 309, 1999.

CONTI, E.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . **Structure**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 329–338, 2000.

CONTI, E.; MÜLLER, C. W.; STEWART, M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 237–244, 2006.

CONTI, E.; UY, M.; LEIGHTON, L.; BLOBEL, G.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of

the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . **Cell**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 193–204, 1998.

COOK, A.; BONO, F.; JINEK, M.; CONTI, E. Structural Biology of Nucleocytoplasmic Transport. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 647–671, 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.76.052705.161529>>

DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Folding-unfolding thermodynamics of a β -heptapeptide from equilibrium simulations. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 269–280, 1999.

DAVIS, L. I. **The nuclear pore complex**. [s.l: s.n.].

DE BARROS, A. C.; TAKEDA, A. A. S.; CHANG, C. W.; KOBE, B.; FONTES, M. R. M. Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1). **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 743–750, 2012.

DIAS, S. M. G.; WILSON, K. F.; ROJAS, K. S.; AMBROSIO, A. L. B.; RICHARD A. CERIONE. The molecular basis for the regulation of the CBC by the importins. **Nature Structural Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 930–937, 2010.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences- a consensus? **TIBS**, [s. l.], v. 16, n. December, p. 478–481, 1991.

FANG, X.-D.; CHEN, T.; TRAN, K.; PARKER, C. S. Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin- α 3. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 128, n. 17, p. 3349–58, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11546751>>

FERNANDES, C. A. H.; PEREZ, A. M.; BARROS, A. C.; DREYER, T. R.; MARCELO, S.; GICELA, E.; MOREA, O.; FONTES, M. R. M.; ISABEL, M.; CANO, N. Dual cellular localization of the *Leishmania amazonensis* Rbp38 (LaRbp38) explains its affinity for telomeric and mitochondrial DNA. **Biochimie**, [s. l.], v. 162, p. 15–25, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.017>>

FONTES, M. R. M.; TEH, T.; KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 297, n. 5, p. 1183–1194, 2000.

GOLDFARB, D. S.; CORBETT, A. H.; MASON, D. A.; HARREMAN, M. T.; ADAM, S. A. Importin α : A multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 505–514, 2004.

GÖRLICH, D. Transport into and out of the cell nucleus. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 2721–2727, 1998.

GÖRLICH, D.; KUTAY, U. Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, [s. l.], 1999.

GREENFIELD, N. J. Analysis of Circular Dichroism Data. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 383, p. 1–12, 2004.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1985.

HUANG, J.; RAUSCHER, S.; NAWROCKI, G.; RAN, T.; FEIG, M.; GROOT, B. L. De; GRUBMÜLLER, H.; JR, A. D. M. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2017.

JAMES, M.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. ScienceDirect GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Elsevier**, [s. l.], v. 2, p. 19–25, 2015.

JERONIMO, S. M. B.; SOUZA, A. de Q.; PEARSON, R. D. Leishmaniasis. In: **Clinical Infectious Diseases**. [s.l: s.n.].

KELLER, S.; VARGAS, C.; ZHAO, H.; PISZCZEK, G.; BRAUTIGAM, C. A.; SCHUCK, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak Shape Analysis. **Anal. Chem.**, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 5066–5073, 2013.

KEMINER, O.; SIEBRASSE, J.-P.; ZERF, K.; PETERS, R. Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 21, p. 11842–11847, 1999. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.21.11842>>

KNUDSEN, N. Ø.; ANDERSEN, S. D.; LÜTZEN, A.; NIELSEN, F. C.; RASMUSSEN, L. J. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. **DNA Repair**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 682–689, 2009.

KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . **Nature Structural Biology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 388–397, 1999.

KÖHLER, M. logy Nuclear Protein Transport Pathways. [s. l.], p. 290–294, 1999.

KOSUGI, S.; HASEBE, M.; MATSUMURA, N.; TAKASHIMA, H.; MIYAMOTO-SATO, E.; TOMITA, M.; YANAGAWA, H. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 1, p. 478–485, 2009.

LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: The application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 791–801, 1996.

LANGE, A.; MILLS, R. E.; LANGE, C. J.; STEWART, M.; DEVINE, S. E.; CORBETT, A. H. Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 8, p. 5101–5105, 2007.

LEE, S. J.; SEKIMOTO, T.; YAMASHITA, E.; NAGOSHI, E.; NAKAGAWA, A.; IMAMOTO, N.; YOSHIMURA, M.; SAKAI, H.; CHONG, K. T.; TSUKIHARA, T.; YONEDA, Y. The Structure of Importin- β Bound to SREBP-2: Nuclear Import of a Transcription Factor. **Science**, [s. l.], v. 302, n. 5650, p. 1571–1575, 2003.

LIRA, C. B. B.; NETO, J. L. S.; GIARDINI, M. A.; WINCK, F. V.; RAMOS, C. H. I.; CANO, M. I. N. LaRbp38: A Leishmania amazonensis protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 358, n. 3, p. 854–860, 2007.

LIU, B.; MOLINA, H.; KALUME, D.; PANDEY, A.; GRIFFITH, J. D.; ENGLUND, P. T. Role of Rbp38 in Replication of Trypanosoma brucei Kinetoplast DNA. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 5382–5393, 2006.

MASON, D. A.; FLEMING, R. j.; GOLDFARB, D. S. Drosophila melanogaster importin α 1 and α 3 can replace importin α 2 during spermatogenesis but not oogenesis. **Genetics**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 157–170, 2002.

MASON, D. A.; STAGE, D. E.; GOLDFARB, D. S. Evolution of the metazoan-specific importin ?? gene family. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 351–365, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. De; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. [s.l: s.n.].

NUSSBAUM, K.; HONEK, J.; C.V.C. CADMUS, C.; EFFERTH, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 15, p. 1594–1617, 2010.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981.

PAVANI, R. S.; FERNANDES, C.; PEREZ, A. M.; VASCONCELOS, E. J. R.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; FONTES, M. R.; CANO, M. I. N. RPA-1 from *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1) structurally differs from other eukaryote RPA-1 and interacts with telomeric DNA via its N-terminal OB-fold domain. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 588, n. 24, p. 4740–4748, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.005>>

PAVANI, R. S.; SILVA, M. S. Da; FERNANDES, C. A. H.; MORINI, F. S.; ARAÚJO, C. B.; FONTES, M. R. de M.; SANT'ANNA, O. A.; MACHADO, C. R.; CANO, M. I.; FRAGOSO, S. P.; ELIAS, M. C. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2016.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Wiley InterScience**, [s. l.], 2004.

PUMROY, R. A.; CINGOLANI, G. Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 466, n. 1, p. 13–28, 2015. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20141186>>

PUMROY, R. A.; KE, S.; HART, D. J.; ZACHARIAE, U.; CINGOLANI, G. Molecular determinants for nuclear import of Influenza A PB2 by importin α isoforms 3 and 7. **Cell**, [s. l.], v. 263, n. 2, p. 219–227, 2017.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. [s.l: s.n.].

SBICEGO, S.; ALFONZO, J. D.; ESTÉVEZ, A. M.; RUBIO, M. A. T.; KANG, X.; TURCK, C. W.; PERIS, M.; SIMPSON, L. Rbp38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 560–568, 2003.

SEKIMOTO, T.; IMAMOTO, N.; NAKAJIMA, K.; HIRANO, T.; YONEDA, Y. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 16, n. 23, p. 7067–7077, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170309/pdf/007067.pdf>>

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], p. 1–10, 2015.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 383p. 318–351.

STEWART, M. Structural basis for the nuclear protein import cycle. **Biochem Soc Trans**, [s. l.], v. 34, n. Pt 5, p. 701–704, 2006.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 195–208, 2007.

STRYER, L. Fluorescence Spectroscopy of Proteins. **American Association for the Advancement of Science**, [s. l.], v. 162, n. 3853, p. 526–533, 2016. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1724906> Accessed:>

TAKEDA, A. a S.; FREITAS, F. Z.; MAGRO, A. J.; BERNARDES, N. E.; FERNANDES, C. a H.; GONÇALVES, R. D.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Biophysical characterization of the recombinant importin- α from Neurospora crassa. **Protein and peptide letters**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 8–16, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789101>>

TEH, T.; TIGANIS, T.; KOBE, B. Crystallization of importin α , the nuclear-import receptor. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 561–563, 1999.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL _ X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

VETTER, I. R.; ARNDT, A.; KUTAY, U.; GÖRLICH, D.; WITTINGHOFER, A. Structural view of the Ran-importin β interaction at 2.3 Å resolution. **Cell**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 635–646, 1999.

WALLACE ET AL. LIGPLOT : a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions Clean up structure. **Protein Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.

WARD, L. D. Measurement of Ligand Binding to Proteins by Fluorescence Spectroscopy. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 48, n. 1910, p. 400–414, 1985.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.

WILLIAMS, C. J.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; PRISANT, M. G.; VIDEAU, L. L.; DEIS, L. N.; VERMA, V.; KEEDY, D. A.; HINTZE, B. J.; CHEN, V. B.; JAIN, S.; LEWIS, S. M.; ARENDALL, W. B.; SNOEYINK, J.; ADAMS, P. D.; LOVELL, S. C.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 293–315, 2018.

WIRTHMUELLER, L.; ROTH, C.; FABRO, G.; CAILLAUD, M. C.; RALLAPALLI, G.; ASAI, S.; SKLENAR, J.; JONES, A. M. E.; WIERMER, M.; JONES, J. D. G.; BANFIELD, M. J. Probing formation of cargo/importin- α transport complexes in plant cells using a pathogen effector. **Plant Journal**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 40–52, 2015.

XUE, L. C.; RODRIGUES, J. P.; KASTRITIS, P. L.; BONVIN, A. M.; VANGONE, A. PRODIGY: A web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 32, n. 23, p. 3676–3678, 2016.

YASHIRODA, Y.; YOSHIDA, M. Nucleo-Cytoplasmic Transport of Proteins as a Target for Therapeutic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 741–748, 2005.