

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DE MAMÍFEROS E
PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO REPARO DE DNA

ANDRÉA COELHO DE BARROS

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

Orientador: Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Dra. Agnes Alessandra Sekijima Takeda

**BOTUCATU – SP
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DE MAMÍFEROS E
PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO REPARO DE DNA

ANDRÉA COELHO DE BARROS

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

Orientador: Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Dra. Agnes Alessandra Sekijima Takeda

**BOTUCATU – SP
2015**

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

Barros, Andréa Coelho de.

Estudos estruturais com a Importina- α ; de mamíferos e peptídeos de sequências de localização nuclear (NLS) de proteínas envolvidas no reparo de DNA / Andréa Coelho de Barros. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Coorientador: Agnes Alessandra Sekijima Takeda
Capes: 20901003

1. Cristalografia de raio X. 2. Dano ao DNA. 3. Peptídeos.
4. Biomoléculas.

Palavras-chave: Cristalografia de raios X; Importação nuclear; Importina- α ; PMS2 e MLH1; XPG.

AGRADECIMENTOS

- *Ao meu orientador, o Professor Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes, pela confiança e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.*
- *A minha co-orientadora, a Doutora Agnes Alessandra Sekijima Takeda, sempre presente, pela dedicação e ensinamentos.*
- *Ao pesquisador Adrian Velazquez-Campoy, Universidade de Zaragoza, Espanha e ao doutorando Thiago Revers Dreyer, Universidade Estadual Paulista - UNESP-Botucatu, por não medir esforços para realizar as análises dos meus dados de ITC.*
- *Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, pela cooperação, companheirismo e troca de conhecimentos.*
- *Aos colegas do departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, pela troca de conhecimentos.*
- *Aos amigos, sempre presentes em pensamento e coração.*
- *À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou o presente projeto de pesquisa (proc. 2011/09905-0).*
- *À minha família:*
meus pais, Luíz Antônio de Barros e Leiva Coelho;
meus irmãos, Milton André de Barros e Thiago Renato Coelho de Barros; pelo amor, ensinamentos, confiança, paciência e suporte emocional.

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Danos no DNA, podem ocorrer tanto por agentes genotóxicos endógenos quanto agentes exógenos, que podem promover a instabilidade do genoma e levar diretamente a doenças, como por exemplo, o câncer, alterações neurológicas, imunodeficiências e envelhecimento prematuro. Auxiliando na manutenção da estabilidade, as células apresentam uma série de vias de reparo de DNA, as quais realizam o processo em múltiplas etapas para resolver lesões específicas no DNA e manter a integridade do genoma. A importação nuclear é um pré-requisito para as funções das proteínas de reparo do DNA e dentre os mecanismos responsáveis pela regulação da importação nuclear, a via clássica constituída pelo heterodímero Importina- α/β é um dos principais mecanismos de deslocamento. A Importina- β (Imp β) atua como o transportador enquanto a Importina- α (Imp α) atua como adaptador, reconhecendo as sequências de localização nuclear (NLS) presentes nas proteínas que possuem função no núcleo. Esse trabalho trata especificamente dos estudos estruturais de complexos da Imp α com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA utilizando técnicas de cristalografia e ensaios de afinidade pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A expressão e purificação da Imp α de *Mus musculus* truncada em sua porção N-terminal foi realizada, bem como a co-cristalização da Imp α com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA, correspondentes as sequências MLH1, PMS2, XPG1 e XPG2. Peptídeos mutados em regiões importantes de reconhecimento nuclear para os peptídeos MLH1 e PMS2 também foram selecionados para o desenvolvimento deste projeto. Dados de difração de raios-X foram coletados dos cristais obtidos e processados no intervalo de 2,0-2,8 Å de resolução. Com esses resultados, as estruturas contendo cNLSs MLH1, PMS2, XPG1 e XPG2 foram elucidadas. As proteínas do complexo MutL α , a MLH1 e a PMS2, atuam no reparo de mal-pareamento de bases (MMR), ligaram-se à Imp α de maneira similar ao NLS do antígeno T da SV40, no sítio de ligação principal. Experimentos de ITC corroboram os resultados cristalográficos, que sugerem que ambos NLSs sejam sequências monopartidas clássicas, podendo ser transportadas de maneira independente para o núcleo celular pelo adaptador Imp α . No entanto, os peptídeos mutantes MLH1 K471N, MLH1 R472N, PMS2 K577N e PMS2 R578N não apresentaram afinidade pela Imp α . Essa informação foi confirmada tanto por cristalografia quanto por ITC, o que enfatiza a importância de resíduos básicos ocupando posições P2 e P3 do sítio de ligação principal da Imp α .

Quanto aos possíveis NLSs da proteína XPG, que atua no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER), XPG1 e XPG2, foi observado nas estruturas elucidadas que ambos peptídeos ligaram-se como sequências monopartidas no sítio de ligação principal da Imp α . Experimentos de ITC também confirmam a existência de afinidade entre os peptídeos e a Imp α . A comparação entre as estruturas elucidadas confirmou como essenciais interações específicas nos sítios, ressaltando a importância das interações intermoleculares nesses sítios. Adicionalmente, a análise das interações dos peptídeos com a Imp α na região de ligação secundária (S₂) nas diferentes estruturas deste trabalho possibilitou destacar a ligação de resíduo básico (K/R) na região P3' de várias estruturas. Isso sugere que essa posição possa apresentar um papel muito importante no reconhecimento de peptídeos neste sítio secundário (S₂) de ligação da Imp α .

Palavras-chave: Importina- α , importação nuclear, sequência de localização nuclear (NLS), cristalografia de raios X, proteínas de reparo de DNA.

ABSTRACT

*DNA damage can occur by endogenous and exogenous genotoxic agents, which may promote instability of the genome and directly lead to diseases such as cancer, neurological disorders, immunodeficiencies and even premature aging. Helping in the maintenance of the stability, the cells display a number of DNA repair pathways, which carry out the process in multiple steps to resolve specific DNA damage, and maintain the integrity of the genome. The nuclear import is a pre-requisite for the functions of DNA repair proteins and, among the mechanisms responsible for regulation of nuclear import, the classical pathway constituted by the heterodimer importin- α / β is a major shift mechanisms. Importin- β (Imp β) acts as the carrier while the importin α -(Imp α) acts as an adapter recognizing the nuclear localization sequence (NLS) present in proteins that have function into the nucleus. This work concerns specifically the structural studies of complexes with Imp α and NLSs peptides from proteins related to DNA repair using crystallographic techniques and binding assays by isothermal titration calorimetry technique (ITC). The expression and purification of *Mus musculus* Imp α truncated at its N-terminal portion was performed, as well as co-crystallization with Imp α NLSs peptides of proteins related to DNA repair, the corresponding sequences MLH1, PMS2, XPG1 and XPG2. Peptides mutated in key regions of nuclear recognition for MLH1 and PMS2 peptides were also selected for this project. X-ray diffraction data collected from crystals were obtained and processed in the range of 2.0-2.8 Å resolution. With these results, the structures containing cNLSs MLH1, PMS2, XPG1 and XPG2 were elucidated. The MutLa complex proteins, MLH1 and PMS2, related to the mismatch repair (MMR), bound to the Imp α similarly to the T antigen NLS of SV40 in the major binding site. ITC experiments corroborate the crystallographic results, which suggest that both NLSs are classic monopartite sequences and can be transported independently to the cell nucleus by Imp α adapter. However, the mutant peptides MLH1 K471N, R472N MLH1, PMS2 K577N and R578N PMS2 showed no affinity for Imp α . This information was confirmed by both crystallography and by ITC, which emphasizes the importance of basic residues occupying positions P2 and P3 of the major binding site of Imp α . About the potential NLSs of XPG protein, that acts in DNA repair by nucleotide excision (NER), XPG1 and XPG2, it was observed in the elucidated structures that both peptides bind as monopartite sequences in the major binding site of Imp α . ITC experiments also confirm the existence of affinity between these peptides and Imp α . The comparison between elucidated structures confirmed as essential specific interactions on the sites, highlighting the importance of intermolecular interactions in these sites. Additionally, analysis of interactions of the peptides with Imp α in the minor binding site in the different structures of this study highlight the binding of basic residues (K / R) in the region P3' of various structures. This suggests that this position can play a very important role in the recognition of peptides of this Imp α binding site.*

Keywords: Importin- α , nuclear import, nuclear localization sequences (NLS), X-ray crystallography, DNA repair proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão simplificada da importação nuclear de proteínas. i. Montagem do complexo de importação carga proteica/transportador no citoplasma; ii. Translocação através de complexo poro nuclear; iii. Desligamento do complexo de importação no núcleo e iv. Reciclagem das proteínas transportadoras. As cores indicam: em vermelho, a Importina- β ; em amarelo, a Importina- α ; em azul, a proteína a ser importada; em roxo, a GTPase Ran e em verde, a exportina. (CONTI, *et al.*, 2006). 20

Figura 2 - Visão geral da importação nuclear de proteínas. A montagem do complexo transportador, no citoplasma, inicia com a Imp β (β) ligando-se à Imp α (α). Após a formação do heterodímero, é possível a ligação da proteína a ser importada, via reconhecimento de sua sequência de localização nuclear (NLS). Em seguida, a Imp β ancora o complexo trimérico aos filamentos citoplasmáticos do complexo poro nuclear e ocorre o transporte. No núcleo, o complexo trimérico se desacopla com a ligação da proteína GTPaseRan à Imp β , alterando sua conformação e liberando o IBB da Imp α . Esse domínio então passa a competir com a NLS da proteína importada, promovendo uma diminuição de afinidade da carga, facilitando a liberação da mesma em virtude do mecanismo auto-inibitório. Uma otimização do processo de desacoplamento da proteína transportada ocorre com auxílio da nucleoporina (Nup50) que se liga a Imp α , liberando a proteína transportada. Enquanto a reciclagem da Imp α é dependente de exportina (CAS), a Imp β é reciclada para o citoplasma, por meio da formação do complexo Imp β :GTPaseRan. Em ambos os casos a Ran-GAP citoplasmática dissocia esses dois complexos, liberando as importinas para um novo ciclo (STEWART, 2007). 22

Figura 3 - Diagrama da estrutura do complexo poro nuclear (CPN) e seus principais componentes, as nucleoporinas, ilustrando a natureza sofisticada desta estrutura macromolecular. Figura adaptada (TRAN, *et al.*, 2014). 23

Figura 4 - Conformação em "S" da Imp β nativa. Envelope molecular obtido por experimentos de espalhamento de raios-X à baixo ângulo, realizados por Fukuhara e colaboradores em 2004 (FUKUHARA, *et al.*, 2004). Figura adaptada (CONTI, *et al.*, 2006). 25

Figura 5 - Estrutura da Imp β complexada ao domínio de ligação da Imp β (IBB), presente na Imp α . A proteína Imp β está representada em fitas e colorida progressivamente, de vermelho a amarelo, de sua região C- ao N- terminal. O domínio IBB está representando em verde. Os domínios HEATS, estão numerados de 1 a 19 (CINGOLANI, *et al.*, 1999). 25

Figura 6 - Representação em diagrama de fitas de estruturas cristalográficas de complexos com a Imp β . Os HEATs estão coloridos progressivamente do verde claro ao azul escuro. A. Complexo com o domínio IBB (cinza). B. Complexo com a GTPaseRan (cinza) (CONTI, *et al.*, 2006). 26

Figura 7 - Representação em diagrama de fitas do complexo da Imp β (vermelho) com o domínios FXFG, nucleoporinas FG (roxo), ligada a superfície convexa da Imp β nos HEATS 5-6 (CHOOK, *et al.*, 2001). 27

Figura 8 - Representação em diagramas de fitas da Imp α de *Mus musculus*, destacando os dez motivos ARMs e o domínio IBB. Cada motivo ARM está identificado e representado por uma cor, de azul para vermelho, do N-terminal para o C-terminal da proteína (PDB-1IAL) (KOBE, 1999). 28

Figura 9 - Posições de ligação na Imp α nos sítios secundário (Arm 6-8) e principal (Arm2-4). Os sítios de ligação são formados pelos resíduos de ácido aspártico (D) e o ácido glutâmico (E), identificados em vermelho; pelos resíduos de asparagina (N) e a tirosina (Y), identificados em roxo; pelos resíduos de triptofanos (W), identificados em verde e pelo resíduo de arginina (R), identificado em azul. A cadeia principal de um NLS é indicada em preto e as laterais em azul, sinalizando as posições ocupadas por resíduos básicos, importantes em uma NLS (FONTES, M. R., *et al.*, 2000)... 29

Figura 10 - Método para cristalização: *hanging drop* (gota suspensa). Imagem obtida do catálogo da empresa *Hampton Research*..... 40

Figura 11 - Verificação da indução da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A proteína recombinante apresenta ~55 kDa. São mostradas as frações não induzido e induzido da proteína alvo recombinante e as frações não solúvel e a solúvel dessa proteína após a lise celular, respectivamente. 44

Figura 12 - Cromatograma de purificação da proteína Imp α por afinidade, onde o número 1 corresponde a adsorção de amostra e eluição do material não aderido a coluna, o número 2 correspondem ao pico de lavagem da coluna, após a adsorção de amostra e o número 3 corresponde a alíquota de proteína purificada eluída durante todo o processo. Em azul é mostrado a absorbância de eluição de proteína a 280 nm; Em verde o gradiente de eluição, indicando a porcentagem do tampão de eluição no sistema. 45

Figura 13 - Verificação da purificação por afinidade da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A proteína recombinante apresenta massa molecular de ~55 kDa. São mostradas as frações não induzida e induzida da proteína alvo recombinante e as frações não solúvel e a solúvel após a lise celular. O **Pico 1** corresponde ao pico de adsorção de amostra e eluição do material não aderido a coluna, o **Pico 2** corresponde ao pico de lavagem da coluna antes da eluição e o **Pico 3** corresponde a alíquotas retiradas durante a eluição do pico de proteína recombinante com 100% do tampão de eluição. 46

Figura 14 - Cristal da Imp α nativa obtido na condição: citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mM/L..... 47

Figura 15 - A. Cristais do complexo PMS2 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mM/L. B. Cristais do complexo MLH1 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,625 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L. C. Cristais do complexo XPG1 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L. D. Cristais do complexo XPG2 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,7 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L. 48

Figura 16 - Representação da Imp α obtida nos diferentes complexos, sobrepostos, em diagramas de fitas. Em destaque, em cinza, os motivos Arm. Em azul, Imp α obtida do complexo com o peptídeo PMS2, em rosa, Imp α obtida do complexo com o peptídeo MLH1, roxo Imp α obtida do complexo com o peptídeo XPG1 e em laranja, Imp α obtida do complexo com o peptídeo XPG2. 52

Figura 17 - Representação do complexo Imp α /PMS2NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da PMS2 em *ball and sticks* (azul). Em azul mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$ 53

Figura 18 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da PMS2 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em azul. 53

Figura 19 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS PMS2 com a Imp α no sítio principal de ligação (S_1). O peptídeo PMS2 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em azul claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). 55

Figura 20 - Representação do complexo Imp α /MLH1NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da MLH1 em *ball and sticks* (rosa). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$ 56

Figura 21 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. A. Peptídeo NLS da MLH1 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em rosa. 56

Figura 22 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. A. Peptídeo NLS da MLH1 ligado ao sítio secundário (S_2). A região do peptídeo que se liga no S_2 da Imp α , região de P1'-P4', está indicado em rosa. 58

Figura 23 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeos NLS MLH1 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S_1) e sítio secundário de ligação (S_2). O peptídeo MLH1 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em rosa claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). 59

Figura 24 - Representação do complexo Imp α /XPG1NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da XPG1 em *ball and sticks* (roxo). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$ 60

Figura 25 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. Peptídeo NLS da XPG1 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em roxo. 61

Figura 26 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. Peptídeo NLS da XPG1 ligado ao sítio secundário (S_2). A região do peptídeo que se liga no S_2 da Imp α , região de P1'-P4', está indicado em roxo. 62

Figura 27 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeos NLS XPG1 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S_1) e sítio secundário de ligação (S_2). O peptídeo XPG1 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em roxo. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). 63

Figura 28 - Representação do complexo Imp α /XPG2NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da XPG2 em *ball and sticks* (laranja). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$ 64

Figura 29 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$. Peptídeo NLS da XPG2 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em laranja. 64

Figura 30 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$. Peptídeo NLS da XPG2 ligado ao sítio secundário (S_2). A região do peptídeo que se liga no S_2 da Imp α , região de P1'-P4', está indicado em laranja. 65

Figura 31 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeos NLS XPG2 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S_1) e sítio secundário de ligação (S_2). O peptídeo XPG2 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em laranja claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). 66

Figura 32 - Comparação dos peptídeos NLSs. A. Sobreposição do NLS SV40 (código PDB IQ1T), elucidado previamente, com os elucidados neste trabalho MLH1, XPG1 e XPG2, no sítio secundário (S_2). B. Sobreposição dos NLSs SV40, Ku70 (código PDB 3RZX) e Ku80 (código PDB 3RZ9), elucidados previamente, com os elucidados neste trabalho PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2, no sítio principal (S_1). Os peptídeos estão destacados nas cores verde (SV40), laranja (Ku70), amarelo (Ku80), azul (PMS2), rosa (MLH1), roxo (XPG1) e laranja claro (XPG2) e foram sobrepostos usando a sobreposição dos átomos de C α dos peptídeos da região de P1-P5 e de P1'-P4'. Posições de ligação no sítio principal (P2-P5) e secundários (P1'-P2') são indicados ao longo da cadeia. 67

Figura 33 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /SV40NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da Imp α (30 μ M) com o peptídeo SV40NLS (240 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação, representada pela integração dos calores obtidos normalizados pela molaridade de SV40NLS (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). A figura foi gerada com o programa *Origin* (MicroCal). 68

Figura 34 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /PMS2NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2NLS (240 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação, representada pelos dados integrados (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal). 70

Figura 35 - Termogramas de calorimetria de titulação isotérmica da titulação da Imp α com os peptídeos PMS2 K577N NLS e PMS2 R578N NLS, realizados à 20°C. Os painéis superiores representam os termogramas relativos às titulações da Imp α com os peptídeos mencionados, enquanto os painéis inferiores representam as isotermas de ligação (calor absorvido em cada injeção normalizado pela razão molar das espécies envolvidas). A. Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2 K577N NLS (1500 μ M). B. Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2 R578N NLS (450 μ M). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal). 71

Figura 36 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /MLH1NLS. O painel superior é referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo MLH1NLS (450 μ M) à 20 °C, enquanto o painel inferior mostra a isoterma de ligação (quadrados pretos) e o ajuste preliminar dos dados (linha contínua). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal)..... 72

Figura 37 - Termogramas de calorimetria de titulação isotérmica da titulação da Imp α com os peptídeos MLH1 K471N NLS e MLH1 R472N NLS, realizados à 20°C. Os painéis superiores representam os termogramas relativos às titulações da Imp α com os peptídeos mencionados, enquanto os painéis inferiores representam as isotermas de ligação (calor absorvido em cada injeção normalizado pela razão molar das espécies envolvidas). A. Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo MLH1 K471N NLS (600 μ M). B. Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo MLH1 R472N NLS (600 μ M). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal). 73

Figura 38 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α :XPG1NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo XPG1NLS (300 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação representada pelos calores de reação integrados e normalizados pela molaridade de XPG1 (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). Imagem gerada pelo programa *Origin* (MicroCal). 74

Figura 39 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α :XPG2NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo XPG2NLS (450 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação representada pelos calores de reação integrados e normalizados pela molaridade de XPG2 (quadrados pretos). Imagem gerada pelo programa *Origin* (MicroCal). 76

Figura 40 - Diagrama consenso das interações realizadas entre os resíduos dos peptídeos NLS PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 com a Imp α no sítio principal de ligação (S₁). A cadeia principal é mostrada com uma linha lilás, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta, na colocação azul escura. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. 80

Figura 41 - Diagrama consenso das interações realizadas entre os resíduos dos peptídeos NLSs MLH1 e XPG1 com a Imp α no sítio secundário de ligação (S₂). A cadeia principal é mostrada com uma linha lilás, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta, na colocação azul escura. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos NLS e sítios de ligação da Imp α , sítio principal (S ₁) P1-P5 e sítio secundário (S ₂) P1'-P4'. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.....	31
Tabela 2 - Sequências propostas para seis classes de NLSs dependentes de Imp α (KOSUGI, <i>et al.</i> , 2009).	32
Tabela 3 - Sequências NLSs selecionadas para o desenvolvimento do projeto. Resíduos em vermelho indicam os resíduos mutados.....	36
Tabela 4 - Condições de cristalização dos cristais utilizados em experimentos de difração de raios-X.	48
Tabela 5 - Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X. Os cristais dos complexos Imp α /PMS2NLS, Imp α /MLH1NLS e Imp α /XPG2NLS foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas, SP) e o cristal do complexo Imp α /XPG1NLS foi coletado no <i>National Synchrotron Light Source</i> (NSLS - Upton, NY).	49
Tabela 6 - Estatísticas de refinamento dos complexos Imp α com peptídeos NLS.	51
Tabela 7 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS PMS2.	54
Tabela 8 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS MLH1. Em preto são mostrados os valores referentes ao sítio S ₂ e em azul valores referentes ao sítio S ₁	57
Tabela 9 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS XPG1. Valores em preto referem-se ao sítio secundário de ligação S ₂ e em azul referem-se ao sítio principal de ligação S ₁	60
Tabela 10 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS XPG2. Em preto são mostrados os valores referente ao sítio secundário de ligação S ₂ e em azul os valores referentes ao sítio principal de ligação S ₁	65
Tabela 11 - Comparação após superposição dos átomos Ca dos peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 com outros peptídeos monopartidos elucidados anteriormente.....	67
Tabela 12 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de SV40NLS (240 μ M) em Imp α (30 μ M) à 20 °C. As constantes foram determinadas considerando-se os dois sítios de interação.....	68
Tabela 13 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de PMS2NLS (240 μ M) em Imp α (30 μ M) à 20°C.	69

Tabela 14 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de MLH1NLS (30 μ M) em Imp α (300 μ M) à 20°C, considerando apenas 1 sítio de ligação.	72
Tabela 15 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de XPG1NLS (30 μ M) em Imp α (300 μ M) à 20°C.	74
Tabela 16 - Interações hidrofóbicas entre os diferentes peptídeos NLS e a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁), em azul, e secundário (S ₂), em preto. Em cor vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.	78
Tabela 17 - Contatos polares entre as cadeias principal e lateral dos peptídeos NLSs com a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁), destacados em azul e secundário (S ₂), destacados em preto. Em verde foram destacadas interações comuns aos modelos.	79
Tabela 18 - Peptídeos NLSs monopartidos que se ligaram somente no sítio principal (S ₁) de ligação da Imp α , sítio principal (S ₁) P1-P5 e sítio secundário (S ₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.	84
Tabela 19 - Peptídeos NLSs monopartidos que se ligaram tanto no sítio principal (S ₁), como no secundário de ligação (S ₂) da Imp α , sítio principal (S ₁) P1-P5 e sítio secundário (S ₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.	84
Tabela 20 - Peptídeos NLSs bipartidos e sítios de ligação da Imp α , sítio principal (S ₁) P1-P5 e sítio secundário (S ₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.	88
Tabela 21 - Constantes de dissociação e entalpias obtidas para diferentes peptídeos NLS pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).	90

ABREVIATURAS

AR – Receptor de andrógeno.

Arm – Motivo do tipo armadillo.

BER – Tipo de reparo de DNA por excisão de bases de nucleotídeos.

CAS – Exportina *Cellular apoptosis susceptibility*.

cMyc – Fator de transcrição, cuja mutação ou super expressão frequentemente leva ao câncer.

CN – Versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

cNLS – Sequência de localização nuclear clássicas.

DNAse – Desoxirribonuclease.

DTT – Dithiotreitol.

FEN1 – Endonuclease 1 flap, nuclease multifuncional, atua no repado de DNA na via de reparo por excisão de base.

FC – Filamentos citoplasmáticos.

FG – Nucleoporinas FG, apresentam distintas sequências de aminoácidos de Fenilalanina-Glicina (FG) localizadas difusamente no complexo poro nuclear (NPC).

FN – Filamentos nucleares ou Nucleoporinas FN com repetições de aminoácidos Fenilalanina-Asparagina (FN).

GTP – Guanosina trifosfato.

HEAT- Motivo tipo HEAT (*Huntingtin*, *elongation factor 3*, PR65/*A subunit of protein phosphatase 2A* and the *TOR lipid kinase*).

IBB – Domínio de ligação a importina beta; domínio auto inibidor.

Imp α – Importina- α .

Imp β – Importina- β .

IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo.

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica

Ku70 – Proteína que participa do reparo de DNA.

Ku80 – Proteína que participa do reparo de DNA.

LB – Luria Bertani (meio de cultura).

MMR – Tipo de reparo de DNA por mal-pareamento de bases de nucleotídeos.

MutL α – Heterodímero formado pelas proteínas de reparo de DNA MLH1 e PMS2.

N₁N₂ – Proteína ligadora de histona.

NER – Tipo de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos.

NES – Sequência de exportação nuclear.

NHEJ – Reparo de DNA por junção de terminais não homólogos.

NLS – Sequência de localização nuclear.

NPC – Complexo poro nuclear.

NTF2 – Fator de transporte nuclear 2, recicla o RanGDP de volta para o núcleo.

Nup – Proteína nucleoporina.

Nup50 – Proteína nucleoporina.

P1-P6 – Posições do sítio de ligação principal da importina- α .

P1'-P4' – Posições do sítio de ligação secundário da importina- α .

PLSCR1 – Proteína *Phospholipid scramblase 1*, responsável pela translocação de lipídeos de membrana entre as camadas.

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil.

RanGTP – Guanosina trifosfato Ran

RB – Proteína retinoblastoma.

r.m.s.d. – *root mean square deviation* - desvio da raiz quadrática média

RNAse – Ribonuclease.

S₁ – Sítio de ligação principal.

S₂ – Sítio de ligação secundário.

SV40 – Antígeno T do vírus símio 40.

SV40P – Versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

TCEP – Tris-[2-carboxietil]-fosfina.

TM – Transmembrana

WD – Nucleoporinas WD, essas nucleoporinas apresentam repetições de aminoácidos de Triptofano-Ácido aspártico.

XPG – Endonuclease que atua no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER).

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	14
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PARA O NÚCLEO CELULAR.....	18
1.2. VIA CLÁSSICA DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR.....	19
1.2.2. Importina- β	24
1.2.3. Importina- α	27
1.2.2.1. Sequência de localização nuclear (NLS).....	30
1.2.2.1.1. Sinais clássicos (cNLS).....	30
1.2.2.1.1. Sinais não-clássicos.....	31
1.3. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO REPARO DE DNA	33
1.3.1. Sequências de localização nuclear de proteínas de reparo de DNA.....	34
1.3.1.1. Proteínas MLH1 e PMS2	34
1.3.1.2. Proteína XPG.....	35
2. OBJETIVO	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529).....	38
3.2. CRISTALIZAÇÃO	39
3.3. COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO	40
3.4. ELUCIDAÇÃO E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS	41
3.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS NLS	42
3.6. EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529)	44
4.2. CRISTALIZAÇÃO	47
4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	49
4.4. ELUCIDAÇÃO, MODELAGEM E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS	49
4.5. ESTRUTURA DA Imp α NOS DIFERENTES COMPLEXOS NLSs.....	51
4.7. ESTRUTURA DOS DIFERENTES PEPTÍDEOS NLSs	52
4.7.1. Imp α /PMS2NLS.....	52

4.7.2. Imp α /MLH1NLS.....	55
4.7.3. Imp α /XPG1NLS.....	59
4.7.4. Imp α /XPG2NLS.....	63
4.8. COMPARAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	67
4.9. EXPERIMENTOS DE AFINIDADE: CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC).....	68
4.8.1. SV40NLS	68
4.8.2. PMS2NLS	69
4.8.3. Mutantes PMS2 K577N e PMS2 R578N NLSs	70
4.8.4. MLH1	71
4.8.5. Mutantes MLH1 K471N e MLH1 R472N NLSs	73
4.8.6. XPG1	73
4.8.7. XPG2.....	75
5. DISCUSSÃO.....	77
5.1. INTERAÇÕES COMUNS AOS MODELOS OBTIDOS ENTRE OS PEPTÍDEOS E A Imp α	77
5.2. PEPTÍDEOS PMS2 E MLH1: PORQUE NÃO OCORREU LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO PMS2 NO SÍTIO SECUNDÁRIO?	82
5.3. PORQUE OS MUTANTES PMS2 K577N, PMS2 R578N, MLH1 K471N e MLH1 R472N NLSs NÃO POSSUEM AFINIDADE?	85
5.4. PORQUE OS PEPTÍDEOS XPG1 e XPG2 NÃO SÃO BIPARTIDOS?	86
5.5. COMPARAÇÃO DAS K _d OBTIDAS	89
6. CONCLUSÃO	91
7. REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PARA O NÚCLEO CELULAR

A característica biológica principal de todas as células eucariontes é a presença de um núcleo, uma organela ligada à dupla membrana que encapsula o material genético e separa fisicamente o processo de transcrição, que ocorre no núcleo, da maquinaria de tradução, que ocorre no citoplasma (TRAN, *et al.*, 2014). Essa separação possibilita uma regulação precisa dos processos celulares, tais como a expressão gênica, sinalização celular e ciclo celular pela regulação seletiva do transporte bidirecional entre o núcleo e o citoplasma (LANGE, *et al.*, 2007). Diante dessa compartimentalização, o transporte de macromoléculas entre o citoplasma e o núcleo é essencial para o funcionamento das células (TRAN, *et al.*, 2014) e a intercomunicação ocorre através do complexo poro nuclear (NPC - *Nuclear pore complex*), um conjunto de macromoléculas que fornece um portal seletivo para o movimento de moléculas através da membrana nuclear (SOROKIN, *et al.*, 2007; TRAN, *et al.*, 2014). Com exceção de moléculas pequenas, metabólitos e proteínas com massa molecular inferior ~40kDa/50kDa, o transporte no NPC é dependente de receptor e energia. Dessa maneira é necessário um mecanismo molecular seletivo de transporte que reconheça especificamente a proteína a ser transportada de um compartimento para o outro e requer, na maioria das vezes, receptores de transporte específicos (CINGOLANI, *et al.*, 2000; LANGE, *et al.*, 2007; STEWART, 2007).

Os receptores de transporte nuclear, denominados de Carioferinas ou Importinas (α e β)/Exportinas atuam no transporte bidirecional nos frequentes eventos de transporte nucleocitoplasmáticos em virtude de sua capacidade de interagir com três proteínas distintas: i. a proteína a ser transportada; ii. as nucleoporinas FG, presentes no NPC; iii. a GTPase Ran (TRAN, *et al.*, 2014). Fatores regulatórios atuam na montagem e desmontagem dos complexos transportadores (MOR, *et al.*, 2014). A Importina- β (Imp β) é o mais versátil receptor de transporte conhecido em eucariontes superiores, transporta uma grande variedade de substratos para o núcleo, sozinho ou via adaptadores. Os adaptadores caracterizados até o momento são: i. Importina- α (Imp α), que reconhece as sequências de localização nuclear NLS, presentes nas proteínas que possuem função no núcleo (CINGOLANI, *et al.*, 2000; MOR, *et al.*, 2014); ii. Snuportina 1; iii. RanBP7; iv. XRIP α (CINGOLANI, *et al.*, 2000).

O transporte melhor caracterizado e descrito é o realizado pelo reconhecimento das sequências de localização nuclear (NLS) e dos sinais de exportação nuclear (NES). Proteínas

que contém a NLS são reconhecidas pelo adaptador Imp α e transportadas para o núcleo pela da formação do heterodímero, ligando-se com o receptor de transporte Imp β (TRAN, *et al.*, 2014). Esse transporte é conhecido como via clássica de importação nuclear ou importação nuclear dependente de Importinas, o qual constitui o foco dessa tese.

1.2. VIA CLÁSSICA DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR

Essa via de importação nuclear é a melhor caracterizadas dentre os ciclos de transporte nuclear, com todos seus componentes identificados: i. GTPase Ran (MELCHIOR, *et al.*, 1993; MOORE, *et al.*, 1993; QUIMBY, *et al.*, 2003); ii. a Importina- α (Imp α) (GORLICH, *et al.*, 1994; IMAMOTO, *et al.*, 1995; WEIS, *et al.*, 1995); iii. a Importina- β (Imp β) (ADAM, *et al.*, 1994; CHI, *et al.*, 1995; GORLICH; KOSTKA, *et al.*, 1995; GORLICH; LASKEY, 1995; GORLICH; VOGEL, *et al.*, 1995; IMAMOTO, *et al.*, 1995; RADU, *et al.*, 1995); iv. o NTF2 (MOORE, 1995; PASCHAL, *et al.*, 1995), que está envolvido na importação e exportação da Ran (DE BARROS, 2011).

Essa via funciona basicamente com a Imp β de transportador e a Imp α como adaptador, reconhecendo as proteínas que serão importadas para o núcleo pelas sequências de localização nuclear (NLS). A Imp β liga-se à Imp α , que por sua vez, reconhece uma proteína a ser transportada formando um complexo trimérico Imp β /Imp α /cargaNLS no citoplasma. A partir da formação do trímero, a Imp β interage com proteínas presentes no NPC e atravessa esse complexo para o núcleo celular. No núcleo, o complexo é desfeito e as Imp α e Imp β retornam para o citoplasma para novos ciclos. Portanto, para o melhor entendimento, esse ciclo foi dividido em quatro etapas de ações: i. Montagem do complexo de importação carga proteica/transportador no citoplasma; ii. Translocação através de NPC; iii. Desligamento do complexo de importação no núcleo; iv. Reciclagem das proteínas transportadoras (**Figura 1**).

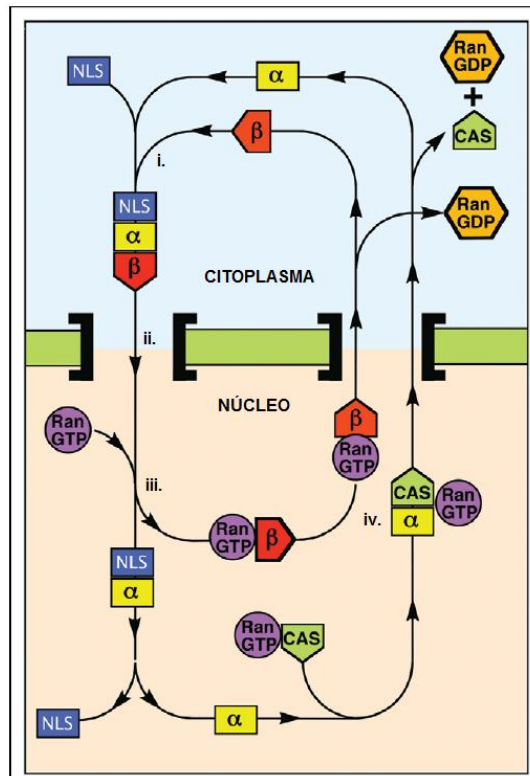


Figura 1 - Visão simplificada da importação nuclear de proteínas. i. Montagem do complexo de importação carga proteica/transportador no citoplasma; ii. Translocação através de complexo poro nuclear; iii. Desligamento do complexo de importação no núcleo e iv. Reciclagem das proteínas transportadoras. As cores indicam: em vermelho, a Importina-β; em amarelo, a Importina-α; em azul, a proteína a ser importada; em roxo, a GTPase Ran e em verde, a exportina. (CONTI, *et al.*, 2006).

A montagem do complexo transportador, no citoplasma, inicia com a Impβ ligando-se à Impα, deslocando o domínio auto-inibitório ou IBB (*Importin beta binding*) (KOBÉ, 1999) do sítio de ligação da Impα. Após a formação do heterodímero (Importina-α/β), é possível a ligação da proteína a ser importada, via reconhecimento do NLS (GORLICH; LASKEY, 1995; IMAMOTO, *et al.*, 1995) (**Figura 2**). Em seguida, a Impβ ancora o complexo trimérico (Impβ/Impα/cargaNLS) aos filamentos citoplasmáticos do NPC, as nucleoporinas, e ocorre o transporte através do poro, em virtude dessas interações (MOORE, *et al.*, 1993; GORLICH, *et al.*, 1996; TRAN, *et al.*, 2014).

No núcleo, o complexo trimérico se desacopla com a ligação da proteína Ran ligada a GTP (GTPase Ran) à Impβ, alterando sua conformação e liberando o IBB da Impα. Esse domínio então passa a competir com a NLS da proteína importada, promovendo uma diminuição de afinidade da carga, facilitando a liberação da mesma em virtude do mecanismo auto-inibitório (KOBÉ, 1999). Uma otimização do processo de desacoplamento da proteína transportada e reciclagem da Impα ocorre com auxílio da nucleoporina (Nup2 em levedura, Nup50 ou Npap60 em vertebrados) (LANGE, *et al.*, 2007), que liga-se a uma das regiões de

ligação do NLS e uma porção C-terminal da Imp α , em virtude de maior afinidade com a mesma. A nucleoporina liga-se à superfície estendida do domínio de repetição Arm da Imp α , incluindo o sítio de ligação secundário de NLS, liberando a proteína transportada e o sítio de ligação (MATSUURA, *et al.*, 2005; DE BARROS, 2011).

Após a proteína importada ser liberada pelo deslocamento do NLS pela nucleoporina, a mesma é deslocada pela ligação com a exportina (Cse1/GTPaseRan em leveduras ou CAS/GTPaseRan em vertebrados) na região C-terminal da Imp α . Dessa forma, ocorre a ligação do domínio IBB com os sítios NLS da Imp α , fato crucial para a formação do complexo de exportação exportina/GTPaseRan/Imp α . É essa a ligação sequencial das Nucleoporinas, seguida por Exportinas que fornece uma regulação molecular poderosa para assegurar que a Imp α será reciclada para o citoplasma, após a liberação da proteína transportada (CINGOLANI, *et al.*, 2002; LEE, *et al.*, 2003; LANGE, *et al.*, 2007). Enquanto a reciclagem da Imp α é dependente de exportina, a Imp β é reciclada para o citoplasma, por meio da formação do complexo Imp β /GTPaseRan. Em ambos os casos a Ran-GAP (Proteína de ativação GTPase Ran) citoplasmática dissocia esses dois complexos, liberando as importinas para um novo ciclo (STEWART, 2006; DE BARROS, 2011) (**Figura 2**).

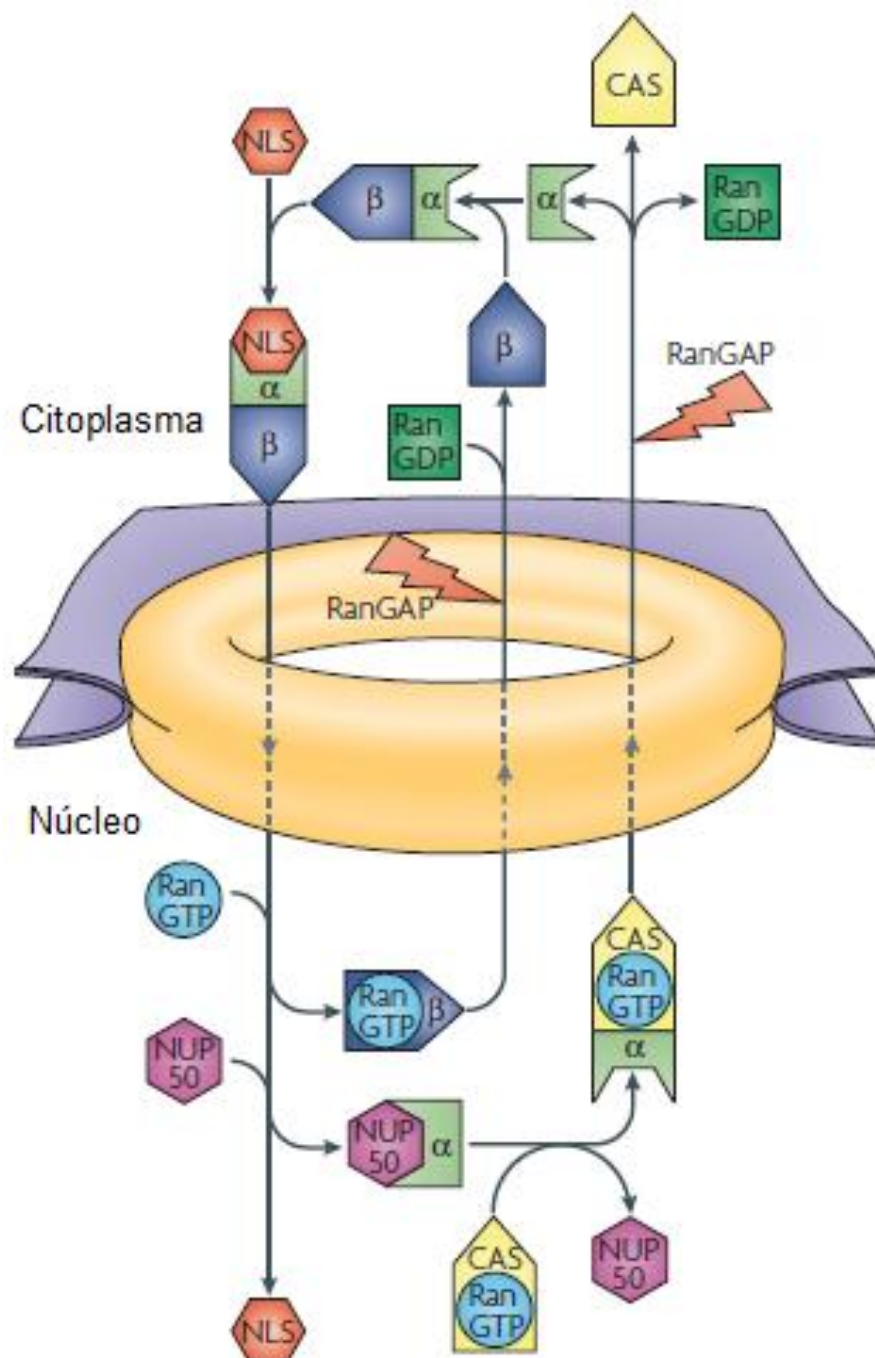


Figura 2 - Visão geral da importação nuclear de proteínas. A montagem do complexo transportador, no citoplasma, inicia com a Imp β (β) ligando-se à Imp α (α). Após a formação do heterodímero, é possível a ligação da proteína a ser importada, via reconhecimento de sua sequência de localização nuclear (NLS). Em seguida, a Imp β ancora o complexo trimérico aos filamentos citoplasmáticos do complexo poro nuclear e ocorre o transporte. No núcleo, o complexo trimérico se desacopla com a ligação da proteína GTPaseRan à Imp β , alterando sua conformação e liberando o IBB da Imp α . Esse domínio então passa a competir com a NLS da proteína importada, promovendo uma diminuição de afinidade da carga, facilitando a liberação da mesma em virtude do mecanismo auto-inibitório. Uma otimização do processo de desacoplamento da proteína transportada ocorre com auxílio da nucleoporina (Nup50) que se liga a Imp α , liberando a proteína transportada. Enquanto a reciclagem da Imp α é dependente de exportina (CAS), a Imp β é reciclada para o citoplasma, por meio da formação do complexo Imp β :GTPaseRan. Em ambos os casos a Ran-GAP citoplasmática dissocia esses dois complexos, liberando as importinas para um novo ciclo (STEWART, 2007).

1.2.1. Complexo poro nuclear (NPC)

Em células eucariontes, o envelope nuclear é composto por uma membrana interna e outra externa, separados pelo espaço perinuclear ou luminal. Distribuídos por esse envelope nuclear, os NPCs estão embutidos pelos pontos de fusão da membrana interna e externa da membrana nuclear, facilitando assim o intercâmbio bidirecional de macromoléculas entre o citoplasma e o núcleo (STEWART, 2007; TRAN, *et al.*, 2014). Os NPCs são compostos por componentes proteicos (~30), denominados nucleoporinas ou Nups, que formam 8 unidades simétricas, quando visto pela superfície da membrana externa, e um eixo duplo de simetria formado por vários componentes quando visto perpendicularmente, pelo plano do envelope nuclear (**Figura 3**).

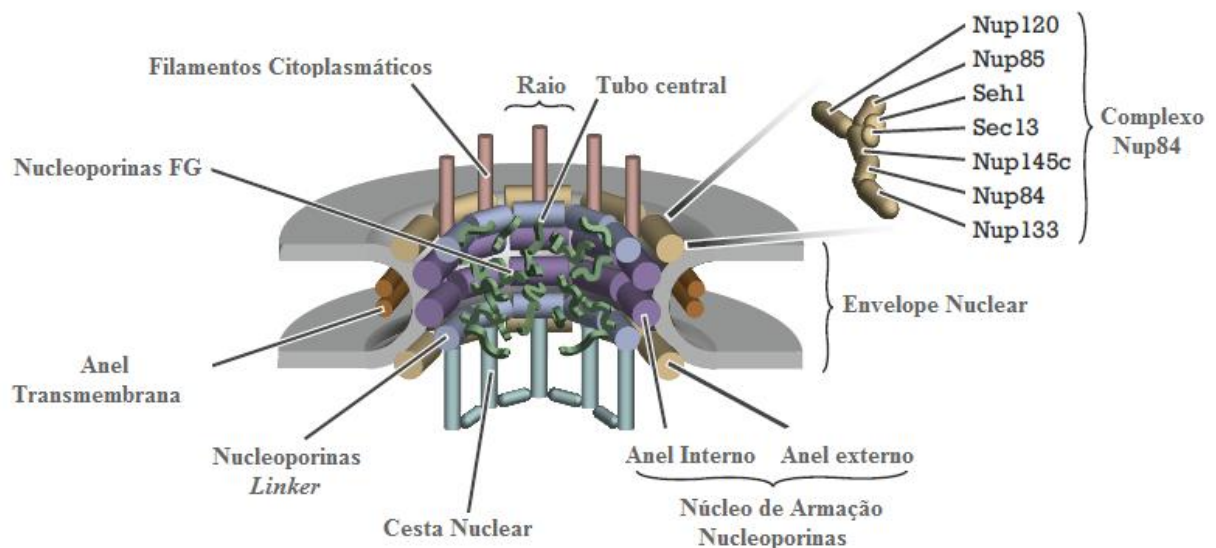


Figura 3 - Diagrama da estrutura do complexo poro nuclear (CPN) e seus principais componentes, as nucleoporinas, ilustrando a natureza sofisticada desta estrutura macromolecular. Figura adaptada (TRAN, *et al.*, 2014).

O NPC é composto por um núcleo central que media o trânsito através do envelope nuclear e possui como componentes periféricos, os filamentos citoplasmáticos e a cesta nuclear. As proteínas que formam os NPCs, as Nups, são responsáveis por ancorar o NPC no envelope nuclear e prover domínios de interação nos eventos de transportes. Esse complexo é formado então por: i. anel transmembrânico que está presente ao lado externo do poro, com a função de estabilização; ii. por proteínas de armação no interior do núcleo do NPC, que formam o anel interno e externo desse canal; iii. pelos filamentos citoplasmáticos e cesta nuclear que servem como locais de ancoragem para eventos de transporte nuclear; iv. pelos domínios FG, das nucleoporinas FG, que ficam salientes no canal aquoso do NPC e servem como sítios de ligação para os receptores de transporte, permitindo assim passagem através do

poro; e v. Pelo complexo Nup84, que é uma subestrutura localizada no exterior da face citoplasmática do NPC e é necessária para adequar a distribuição individual dos NPC no envelope nuclear (TRAN, *et al.*, 2014).

Esses complexos são estruturas bem conservadas em diversos organismos (DEGRASSE, *et al.*, 2009). As estruturas de mamíferos possuem ~125 MDa, seu núcleo central possui 120 nm de diâmetro e o canal central pode chegar a 40 nm de diâmetro. São estruturas plásticas que parecem deformar-se para possibilitar a passagem de partículas grandes, construídos a partir de múltiplas cópias (ROUT; AITCHISON, *et al.*, 2000), em regra, 8, 16 ou 32 cópias de nucleoporinas (ROUT; AITCHISON, 2000; SOROKIN, *et al.*, 2007; STEWART, 2007) e seu número total pode variar de 500-1000 por NPC (ROUT; AITCHISON, 2000; SOROKIN, *et al.*, 2007). As formações denominadas filamentos citoplasmáticos foram sugeridas como as primeiras implementadas para o reconhecimento de complexos de transporte pelas Importinas/Exportinas (ROUT; AITCHISON, 2000; SOROKIN, *et al.*, 2007).

As nucleoporinas podem ser divididas em famílias: i. Nucleoporinas transmembranas (TM), fixam os NPCs na membrana nuclear; ii. Nucleoporinas FG, (DEVOS, *et al.*, 2004) apresentam distintas sequências de Fenilalanina-Glicina (FG) localizadas difusamente no poro. As repetições de nucleoporinas FG possuem curtos núcleos hidrofóbicos contendo resíduos fenilalanina e glicina com sequências como FXFG (em que X é um resíduo pequeno como glicina, alanina ou serina) ou GLFG. Estes núcleos são separados por resíduos hidrofílicos de sequência e comprimento variável e compõem metade da massa do NPC; iii. Nucleoporinas FN com repetições fenilalanina-asparagina (FN); e iv. Nucleoporinas WD, que contêm motivos de repetições de triptofano-ácido aspártico, propulsor WD (DEVOS, *et al.*, 2004; SOROKIN, *et al.*, 2007; STEWART, 2007; DE BARROS, 2011).

1.2.2. Importina- β

A Importina- β (Imp β) possui ~97 kDa, é o transportador responsável pelo transporte do complexo trimérico (Imp β /Imp α /CargaNLS) através do NPC, pela sua interação com as Nucleoporinas. A Imp β é constituída por 19 repetições de motivos HEAT, os quais são compostos por cerca de 40 resíduos, divididos entre duas hélices (A e B) antiparalelas entre si unidas por um loop (CHOOK, *et al.*, 2001; CONTI, *et al.*, 2006). Por espalhamento de raios-X a baixo ângulo de seu estado nativo, é mostrado que sua super-hélice é bastante aberta, com dois arcos que assumem uma conformação em forma de “S”, subdivididas em dois arcos em

forma de “C” (FUKUHARA, *et al.*, 2004; STEWART, 2006), um arco N-terminal (HEATs 1-8) e um arco de C-terminal (HEAT 9-19) (CONTI, *et al.*, 2006; COOK, *et al.*, 2007) (**Figura 4**).



Figura 4 - Conformação em "S" da Impβ nativa. Envelope molecular obtido por experimentos de espalhamento de raios-X à baixo ângulo, realizados por Fukuhara e colaboradores em 2004 (FUKUHARA, *et al.*, 2004). Figura adaptada (CONTI, *et al.*, 2006).

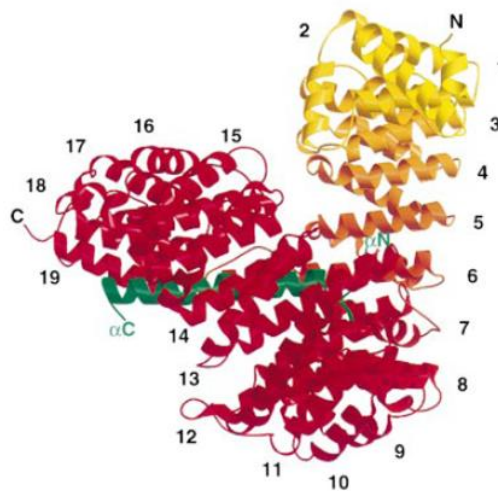


Figura 5 - Estrutura da Impβ complexada ao domínio de ligação da Impβ (IBB), presente na Impα. A proteína Impβ está representada em fitas e colorida progressivamente, de vermelho a amarelo, de sua região C- ao N- terminal. O domínio IBB está representando em verde. Os domínios HEATS, estão numerados de 1 a 19 (CINGOLANI, *et al.*, 1999).

Devido ao motivos HEAT, sua estrutura possui um alto grau de flexibilidade que permite que ela mude de conformação, dependendo se está na sua forma livre ou complexada (Conti *et al.*, 2006). Como exemplos, (**Figura 6**) quando ligada ao domínio IBB da Impα, a Impβ apresenta uma conformação enrolada, em que as extremidades N e C-terminal da proteína encontram-se próximas uma da outra (CINGOLANI, *et al.*, 1999; CONTI, *et al.*,

2006). Nessa estrutura foi possível observar a interação do domínio IBB com resíduos dos motivos HEAT localizados na porção côncava, no arco C-terminal da Imp β (CINGOLANI, *et al.*, 1999; STEWART, 2006; COOK, *et al.*, 2007). Uma pequena parte do domínio IBB fica numa conformação estendida e se liga o HEAT 8, que contém vários resíduos ácidos conservados, conhecido como o loop ácido (CINGOLANI, *et al.*, 1999; STEWART, 2006; COOK, *et al.*, 2007). Já na estrutura do complexo Imp β /GTPaseRan é visível o distanciamento entre as extremidades N- e C- terminal da Imp β . A interação com a proteína Ran ocorre na superfície côncava da Imp β , porém no arco N-terminal (HEATS 1-6) (CHOOK, *et al.*, 1999). Esta mudança conformacional de enrolada para estendida pode estar relacionada com o desacoplamento do complexo trimérico (Imp β /Imp α /CargaNLS) no núcleo celular.

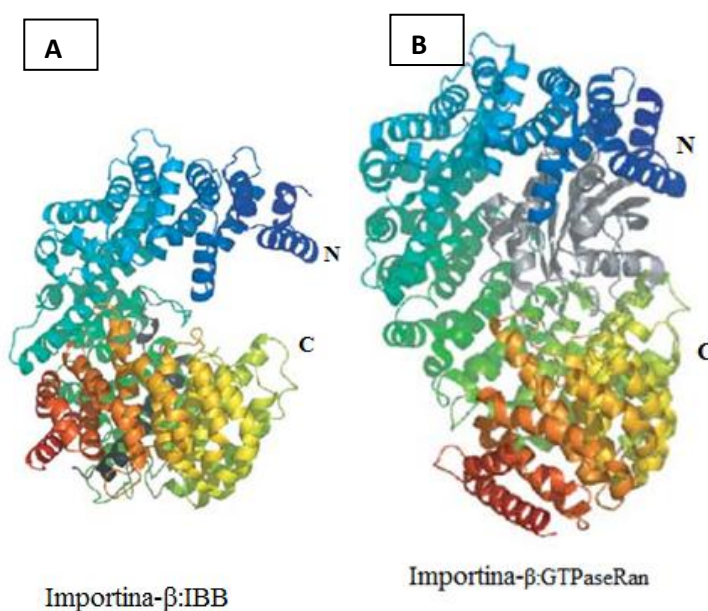


Figura 6 - Representação em diagrama de fitas de estruturas cristalográficas de complexos com a Imp β . Os HEATs estão coloridos progressivamente do verde claro ao azul escuro. **A.** Complexo com o domínio IBB (cinza). **B.** Complexo com a GTPaseRan (cinza) (CONTI, *et al.*, 2006).

A estrutura cristalográfica do complexo Imp β com as repetições FXFG (Imp β /FXFG), presentes no NPC, mostra a ligação entre essa sequência FXFG e a superfície convexa da Imp β nos HEATS 5-6. Essa interação hidrofóbica com o anel aromático da fenilalanina nessa região (mesma que a RanGTP) pode promover a alteração de conformação da Imp β que possibilite a liberação do complexo Imp β /RanGTP no citoplasma, (BAYLISS, *et al.*, 2000) (**Figura 7**).

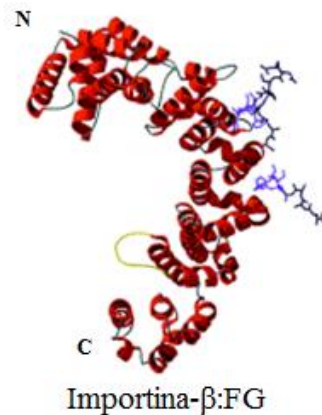


Figura 7 - Representação em diagrama de fitas do complexo da Imp β (vermelho) com o domínios FXFG, nucleoporinas FG (roxo), ligada a superfície convexa da Imp β nos HEATS 5-6 (CHOOK, *et al.*, 2001).

1.2.3. Importina- α

A Imp α possui ~60 kDa e atua como adaptador na via de importação nuclear dependente de importinas, portanto, ela é a responsável pelo reconhecimento da proteína a ser importada para o núcleo.

Com a elucidação da estrutura cristalográfica da Imp α de levedura em 1998 (CONTI, *et al.*, 1998) e posteriormente a de camundongo em 1999 (KOBÉ, 1999), pôde ser demonstrado que a Imp α realiza sua função no transporte nuclear como adaptador de maneira individual, com o auxílio dos seus dois domínios funcionais. Um pequeno domínio N-terminal denominado de ligação a Imp β (IBB- *Imp β binding domain*) ou domínio auto inibitório e o domínio de ligação das sequências de localização nuclear (NLSs) (**Figura 8**) (MOORE, *et al.*, 1993; GORLICH, *et al.*, 1994; GORLICH, *et al.*, 1996).

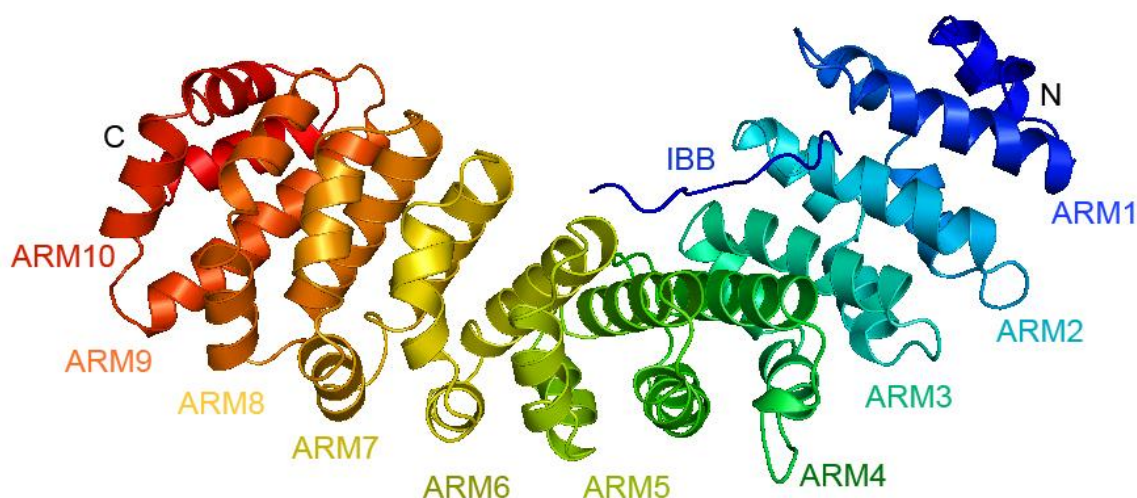


Figura 8 - Representação em diagramas de fitas da Impα de *Mus musculus*, destacando os dez motivos ARMs e o domínio IBB. Cada motivo ARM está identificado e representado por uma cor, de azul para vermelho, do N-terminal para o C-terminal da proteína (PDB-1IAL) (KOBÉ, 1999).

Nessa mesma estrutura, proposta por Kobe, foi demonstrado que o domínio N-terminal de ligação a Impβ contém um conjunto de resíduos básicos em sua sequência (KRR), que se assemelha a uma sequência de localização nuclear (NLS), possuindo assim duas funções: a de ligação com o transportador Impβ e o papel autoinibitório do sítio de ligação da Impα. Portanto, quando essa região de IBB não está ligada a Impβ, ela compete com o sítio de ligação das NLSs, presente na Impα (KOBÉ, 1999; MATSUURA, *et al.*, 2004; LANGE, *et al.*, 2007), tornando-se um mecanismo de regulação desse processo de transporte e uma contribuição também, para a liberação da carga no núcleo celular, após o transporte.

O domínio de ligação da Impα, compreende a maior parte da proteína e é composto por 10 motivos Arm (*armadillo*) (GORLICH, *et al.*, 1994), identificados na **Figura 8**, que contêm os sítios de ligação da sequência de localização nuclear (NLS). Cada motivo Arm possui aproximadamente 40 resíduos distribuídos em 3 hélices-α (H1, H2 e H3) (KOBÉ, 1999; ANDRADE, *et al.*, 2001) apresentando ~30° de rotação entre si, resultando numa molécula alongada e torcida da **Figura 8**. As hélices H3 formam a superfície interna côncava da Impα, na qual, os sítios de ligações NLSs são formados pelos resíduos conservados de triptofanos e asparaginas, cercados por alguns resíduos ácidos (ácido aspártico e glutâmico), conferindo aos sítios características hidrofóbicas e eletrostáticas. Na Impα estão presentes dois sítios importantes de interação NLS, um sítio denominado principal (S₁) entre os Arm 2-4 (P1-P6) e um segundo, denominado secundário (S₂) entre os Arm 6-8 (P1'-P4') (**Figura 9**) (FONTES, *et al.*, 2000).

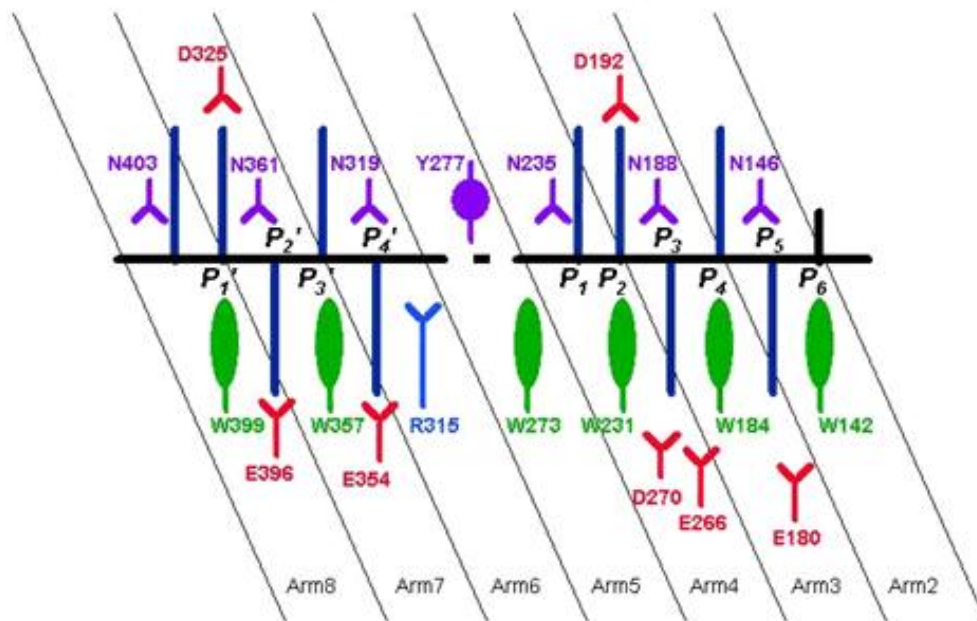


Figura 9 - Posições de ligação na Impα nos sítios secundário (Arm 6-8) e principal (Arm2-4). Os sítios de ligação são formados pelos resíduos de ácido aspártico (D) e o ácido glutâmico (E), identificados em vermelho; pelos resíduos de asparagina (N) e a tirosina (Y), identificados em roxo; pelos resíduos de triptofanos (W), identificados em verde e pelo resíduo de arginina (R), identificado em azul. A cadeia principal de um NLS é indicada em preto e as laterais em azul, sinalizando as posições ocupadas por resíduos básicos, importantes em uma NLS (FONTES, *et al.*, 2000).

A Impα apresenta um elevado grau de conservação na sua estrutura (CONTI, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2000) e mecanismo de reconhecimento. Em leveduras foi encontrada apenas uma isoforma de Impα, enquanto em humanos 7 isoformas já foram descritas. Com base na similaridade de suas sequências, essas proteínas foram agrupadas em três grandes famílias: Famílias Kap-α1, Kap-α2, e Kap-α3 (KOHLER, *et al.*, 1999; PUMROY, *et al.*, 2015). Os membros dessas famílias diferentes têm cerca de 50% de identidade sequencial (KOHLER, *et al.*, 1999; TALCOTT, *et al.*, 2000) e dentro de uma família, a identidade é, no mínimo, 80% (KOHLER, *et al.*, 1999). Goldfarb e colaboradores discutem a possibilidade das famílias Kap-α2 e Kap-α3 surgirem no decorrer da origem e diferenciação de células e tecidos. Visto que, genes relacionados a Impα da família Kap-α1 são encontradas em todos os organismos eucariotos, como animais, plantas e fungos, enquanto que os genes da Impα das famílias Kap-α2 e Kap-α3 estão presentes apenas em animais metazoários (GOLDFARB, *et al.*, 2004).

As isoformas são capazes de mediar a importação de uma ou mais proteínas contendo NLSs (TALCOTT, *et al.*, 2000) e também podem apresentar preferências por diferentes NLSs, bem como diferentes padrões de expressão. Os níveis relativos de expressão de uma determinada isoforma da Impα podem variar entre diferentes tecidos, indicando uma demanda especial de diferentes tipos proteínas específicas para importação em cada tecido (KOHLER,

et al., 1999), o que indica a importância da regulação do mecanismo de importação por essa proteína. Apesar de algumas proteínas se associarem especificamente apenas a uma isoforma da Imp α , outras são capazes de se ligar a diferentes isoformas (JANS, *et al.*, 2000; KNUDSEN, *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Sequência de localização nuclear (NLS)

Para ocorrer o transporte nuclear pela via clássica de importação, proteínas presentes no citoplasma que possuem função no núcleo, são transportadas para o núcleo via transportadores específicos e possuem uma sinalização específica denominada sequência de localização nuclear (NLS - *Nuclear Localization Signal*). A partir dessa sinalização, a Imp α consegue discriminar a proteína que deve ser importada para o núcleo, após a formação do heterodímero Imp β /Imp α .

Conforme mencionado anteriormente, a Imp α possui um sítio de ligação com características hidrofóbicas e eletrostáticas, formada pela presença de resíduos de triptofanos e asparaginas conservados, cercados por resíduos ácidos, na região côncava da Imp α (hélice H3) (CONTI, *et al.*, 2000). Sua ocupação deverá ser efetuada por resíduos com características específicas, acomodando em determinadas posições, denominadas de P1 a P6 nos Arm 2-4, no sítio principal (S₁) e P1' a P5' nos Arm 6-8 no sítio secundário (S₂) (FONTES, *et al.*, 2000) **Tabela 1**. A ocupação de um único sítio ou de ambos, bem como a sequência de aminoácidos que constituem o NLS, definem a nomenclatura utilizada para identificação dos mesmos.

1.2.2.1.1. Sinais clássicos (cNLS)

As sequências de localização nuclear clássicas (cNLSs) são as mais estudadas e caracterizadas até o momento (TRAN, *et al.*, 2014). As cNLSs apresentam um ou dois grupos de aminoácidos básicos em sua sequência, essencialmente lisina (K) e arginina (R) divididas em duas classes: i) As cNLSs monopartidas, que apresentam uma região de aminoácidos básicos e possuem a sequência como sendo consenso, até o momento, de KR/KXR/K, ligando somente em um sítio de ligação da Imp α , no sítio principal (S₁); e ii) As cNLSs bipartidas, que apresentam duas regiões de resíduos básicos separadas por um *linker* que pode variar de 10-12 aminoácidos, apresentando a sequência como sendo consenso, até o momento, de KRX10-12KRXX, essa sequência liga-se aos dois sítios de interação presente na Imp α , sítio

principal (S₁) e secundário (S₂) (CHELSKY, *et al.*, 1989; CHRISTOPHE, *et al.*, 2000; LANGE, *et al.*, 2007).

As ligações entre os peptídeos monopartidos realizadas com o sítio principal de ligação (S₁) são consideradas de alta afinidade (CHANG, *et al.*, 2012) e requerem uma lisina na posição P2, seguida de resíduos básicos nas posições P3 e P5 e é exemplificada pela cNLS do antígeno T do Vírus Símio 40 (SV40), possuindo a sequência ¹²⁶PKKKRKV¹³² (LANFORD, *et al.*, 1984; LANFORD, *et al.*, 1986; FONTES, 2000; FONTES, *et al.*, 2003b). A cNLS bipartida é exemplificada pela cNLS presente na proteína Nucleoplasmina, ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰ (DINGWALL, *et al.*, 1982; FANARA, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2003). As duas cNLSs, a SV40 e a Nucleoplasmina, que exemplificam o consenso de ligação, foram as primeiras a serem elucidadas e desde então são utilizadas como referência para os estudos envolvendo a Impα (CONTI, *et al.*, 1998; KOBE, 1999; FONTES, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2003).

A região conservada dos sítios de ligação criam arcabouços para as cadeias laterais básicas dos cNLSs, que fazem uma série de interações específicas (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes salinas) com resíduos conservados presentes na porção côncava da Impα (**Figura 9**) (CONTI, *et al.*, 1998; CONTI, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2000; STEWART, 2006;2007).

Tabela 1 - Peptídeos NLS e sítios de ligação da Impα, sítio principal (S₁) P1-P5 e sítio secundário (S₂) P1'-P4'. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Impα elucidadas por cristalografia.

Proteínas	S ₂						S ₁					
	P1'	P2'	P3'	P4'	Linker		P1	P2	P3	P4	P5	
SV40							A	A	P	P	K	R
Nucleopl	A	V	K	R	P	A	A	T	K	K	A	G
Consenso	R/	R/	K	K		X ₁₀₋₁₂	K	R/	X	R/		

SV40, Antígeno T do vírus símio 40 (FONTES, *et al.*, 2000); Nucleopl, nucleoplasmina (FONTES, *et al.*, 2000). O consenso é de (CHELSKY, *et al.*, 1989).

1.2.2.1.1. Sinais não-clássicos

Além dos sinais clássicos, foram descritas na literatura proteínas que apresentam NLSs que não seguem o padrão clássico de reconhecimento, sendo então, denominados como não-clássicos. Podem apresentar resíduos positivos e maior hidrofobicidade do que as cNLSs e mesmo assim interagem com a Impα, algumas vezes em regiões diferentes das cNLS (CHEN, *et al.*, 2005).

Estudo realizado por Kosugi e colaboradores sugeriu uma nova nomenclatura para os diferentes tipos de NLSs (Classes 1-6) e identificaram 3 novas classes de NLSs (Classes 3, 4 e 5). As classes 1 e 2 correspondem aos cNLSs monopartidos, as classes 3 e 4 correspondem a NLSs não-canônicos, isto é, sequências que não estão de acordo com o convencional, realizando sua interação preferencialmente com o sítio secundário (S₂) da Imp α , a classe 5 corresponde a NLSs específicos de plantas e os bipartidos (classe 6) correspondem as cNLSs bipartidas (KOSUGI, *et al.*, 2009) (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Sequências propostas para seis classes de NLSs dependentes de Imp α (KOSUGI, *et al.*, 2009).

Classe NLS	Sequência Consenso
Classe 1	KR(K/R)R, K(K/R)RK
Classe 2	(P/R)XXKR(^DE)(K/R)
Classe 3	KRX(W/F/Y)XXAF
Classe 4	(R/P)XXKR(K/R)(^DE)
Classe 5	LGKR(K/R)(W/F/Y)
Bipartido	KRX10-12K(KR)(KR) ou KRX10-12K(KR)X(KR)

(^DE) = Qualquer resíduo, exceto ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu).

Com base nos estudos realizados pelo grupo de Kosugi (KOSUGI, *et al.*, 2009), Chang e colaboradores (CHANG, *et al.*, 2012) realizaram testes cristalográficos utilizando uma Imp α de *Oryza sativa* (arroz) e 2 peptídeos denominados NLS classe 5, específicos para plantas (A89 - VHKT**VLGKR**KYW e A54 - SV**LGKR**KRHPKV (KOSUGI, *et al.*, 2009)). Os resultados foram promissores e demonstraram que esses peptídeos possuem alta afinidade com a Imp α de arroz e se ligaram somente no sítio secundário (S₂) de ligação (CHANG, *et al.*, 2012).

Posteriormente, Chang e seus colaboradores realizaram (CHANG, *et al.*, 2013) experimentos com as NLS não-clássicas. Dessa vez utilizaram 4 NLSs classe 3 (A28 - IGR**KRGYSVAF**, A58 - WAGR**KRTWRDAF**, B6 - SSHR**KRKFSDAF** e B141 - RVQR**KRKWSEAF** (KOSUGI, *et al.*, 2009)) e Imp α de *Mus Musculus*. Os experimentos resultaram em estruturas que confirmaram a ligação desses peptídeos nos sítio secundário de ligação da Imp α com os resíduos KR ligando as posições P1' e P2', respectivamente. Esses resultados indicam que o sítio secundário de ligação da Imp α não funciona somente para ancorar os resíduos básicos presente nas cNLS bipartidas, mas que também podem funcionar como um sítio de ligação principal para algumas proteínas.

1.3. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO REPARO DE DNA

Danos no DNA, podem ocorrer tanto por agentes genotóxicos endógenos quanto agentes exógenos, e que pode promover a instabilidade do genoma e levar diretamente a várias doenças humanas, como por exemplo, o câncer, alterações neurológicas, imunodeficiências e até ao envelhecimento prematuro. Para evitar tais consequências graves, as células desenvolveram uma série de vias de reparo de DNA, as quais realizam o processo em múltiplas etapas para resolver lesões específicas no DNA e manter a integridade do genoma (IYAMA, *et al.*, 2013). Aproximadamente 130 genes que estão diretamente ligados com o processo de reparo de DNA já foram identificados (CHRISTMANN, *et al.*, 2003).

Os mecanismos de reparo de DNA desenvolvidos pelos organismos capazes de corrigir modificações efetuadas no DNA são: i. reparo por excisão de bases (BER); ii. excisão de nucleotídeos (NER); iii. mal-pareamento de bases (MMR) (KNUDSEN, *et al.*, 2009); e iv. reparo por reversão dos danos diretos ou quebra das dupla fitas de DNA (DSB), separado em duas vias principais, recombinação homóloga (HR) e por junção de terminais não homólogos (NHEJ) (CHRISTMANN, *et al.*, 2003). Para que os mecanismos de reparo funcionem de maneira adequada, fica clara a importância da interação entre proteínas responsáveis pela função de reparo. A importação nuclear é então, um pré-requisito para as funções das proteínas de reparo do DNA e também essencial para a localização correta das proteínas responsáveis pelos mecanismos mencionados.

A via clássica de importação nuclear, constituída pelo heterodímero Importina- α/β , é um dos principais mecanismos de deslocamento de proteínas do citoplasma para o núcleo. Estudos revelam que algumas proteínas de reparo parecem interagir somente com isoformas específicas da Imp α , indicando uma regulação adicional do processo de reparo (KNUDSEN, *et al.*, 2009), porém, pouco se sabe a respeito do reconhecimento das sequências de localização nuclear (NLSs) dessas macromoléculas. Proteínas envolvidas em reparo e que não apresentam NLSs podem formar complexos no citoplasma e depois serem transportados através do NPC na forma de heterodímero, um mecanismo conhecido como co-importação nuclear. Esse mecanismo de importação, possivelmente reflete um sistema onde proteínas podem aumentar a sua localização nuclear após a formação do complexo, ao invés de serem individualmente concorrentes para a interação com receptores de importação nuclear (LIU, *et al.*, 2000; KNUDSEN, *et al.*, 2009). A formação de complexos entre as proteínas no citoplasma parece ter um grande efeito sobre sua localização nuclear, no entanto, não está

claro se esse é um mecanismo de emergência ou se é essencial para a regulação de importação ou função dessas proteínas no núcleo (BRIEGER, *et al.*, 2005).

1.3.1. Sequências de localização nuclear de proteínas de reparo de DNA

1.3.1.1. Proteínas MLH1 e PMS2

Durante o processo de replicação do DNA, alguns erros podem escapar da verificação feita pela DNA polimerase. Erros de pareamento, podem ser corrigidos, mesmo que a DNA polimerase não os tenha detectado. Em humanos o complexo MutL α , um heterodímero formado pela interação das proteínas MLH1 e PMS2, atua coordenando o processo de reparo de mal-pareamento de bases (MMR) gerado por erros de replicação, sendo essencial para a manutenção da fidelidade de replicação do DNA (BRIEGER, *et al.*, 2005; LEONG, *et al.*, 2009). Embora os participantes diferentes do reparo de DNA por MMR em humanos tenham sido identificados, a regulação dos passos essenciais do reparo por MMR não é totalmente compreendida. A importação nuclear dessas proteínas pode ser um mecanismo de regulação para esse tipo de reparo de DNA (WU, *et al.*, 2003; BRIEGER, *et al.*, 2005; DE BARROS, 2011).

Assim como outras proteínas envolvidas em reparo, as estruturas da PMS2 e MLH1 foram parcialmente elucidadas (GUARNE, *et al.*, 2001). Foi sugerido que ambas as proteínas apresentam cNLS monopartidos essenciais para seu deslocamento para o núcleo (**Tabela 3**), presentes no C-terminal não elucidado destas proteínas. Mutações em seus cNLS indicam alterações tanto na translocação das subunidades quanto na dimerização. Apesar de dimerização não ser necessária para a formação das interações da cNLS com a Imp α , estudos comprovam que o heterodímero MutL α é importado de forma mais eficiente do que os monômeros MLH1 e PMS2 (LEONG, *et al.*, 2009). Há indícios de que o transporte na forma de complexo otimiza o processo de importação (BRIEGER, *et al.*, 2005). Outros estudos ainda apresentam a idéia de que a dimerização do MLH1 e PMS2 regula a importação do complexo MutL α , o que pode assim representar um novo mecanismo pelo qual as células ativem suas funções no reparo de erros durante a replicação do DNA (WU, *et al.*, 2003; DE BARROS, 2011).

Brieger e colaboradores (BRIEGER, *et al.*, 2005), com auxílio do *PSORT* (NAKAI, *et al.*, 1999), um programa para a predição de sítios de localização cNLSs, identificaram nas

proteínas MLH1 e PMS2 possíveis sequências de localização nuclear clássicas. Para a proteína MLH1, duas possíveis cNLSs monopartidas foram encontradas (cNLS I ⁴⁶⁹PRKRH⁴⁷² e cNLS II ⁴⁹⁶PRRR⁴⁹⁹), enquanto para proteína PMS2, somente uma possível cNLS monopartida foi identificada (cNLS III ⁵⁷⁴PNTKRFK⁵⁸⁰). Experimentos envolvendo mutações nos resíduos básicos dessas sequências (substituição de resíduos básicos por resíduos neutros, asparaginas ou glicinas) e microscopia de imunofluorescência concluíram que a proteína MLH1 possui somente uma cNLS monopartida, sendo a sequência cNLS I ⁴⁶⁹PRKRH⁴⁷² a responsável pela interação com a Imp α e para a proteína PMS2 a sequência cNLS III ⁵⁷⁴PNTKRFK⁵⁸⁰, se confirmou como responsável pela interação com a Imp α . Entretanto, os resultados também mostraram que mesmo com as mutações nas cNLSs, elas não aboliram completamente a presença dessas duas proteínas no núcleo celular, fato esse, que inspirou a utilização não somente dos peptídeos cNLS convencionais da MLH1 e PMS2, como também, alguns peptídeos mutados em regiões estratégicas de reconhecimento pela Imp α (MLH1 - K471 e R472 e PMS2 - K477 e R478), para o desenvolvimento desse projeto (**Tabela 3**).

1.3.1.2. Proteína XPG

A XPG é uma endonuclease que atua no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) (KNUDSEN, *et al.*, 2009). Esse sistema de reparo detecta uma grande diversidade de lesões no DNA e é a principal defesa contra danos ao DNA induzidos por radiação UV (COSTA, *et al.*, 2003). Mutações nos genes que expressam essa endonuclease resultam na síndrome xeroderma pigmentoso (tipo G), que causa extrema sensibilidade à luz solar, resultando em queimaduras solares, mudanças de pigmentação na pele e uma incidência muito elevada de câncer de pele (LEHMANN, *et al.*, 2011).

A proteína XPG tem uma massa molecular deduzida de ~134 kDa, por isso a necessidade de uma região NLS para seu transporte nuclear. Estudos relatam duas possíveis regiões de localização nuclear clássica para esta proteína: i) Uma na região C-terminal (XPG2 - ¹¹⁶⁹KKRRKLRRARGRK¹¹⁸⁶), região evolutivamente conservada entre leveduras e humanos e ii) outra possível sequência (XPG1 - ¹⁰⁵⁷KRGITNTLEESSSLKR¹⁰⁷⁴). Essas sequências podem também estar relacionada com um sinal de retenção nuclear, pois parte dessa proteína fica retida na região perinuclear e após a radiação UV, essa proteína retida migra totalmente para o núcleo, fato visto como uma "possível" regulação do processo reparo de DNA. Estas duas sequências mostram potencial para cNLS bipartidas (**Tabela 3**)

(KNAUF, *et al.*, 1996). A dimerização dessa proteína para a importação nuclear também é relatada como uma possível via, no entanto, faltam informações e estudos recentes a esse respeito.

Tabela 3 - Sequências NLSs selecionadas para o desenvolvimento do projeto. Resíduos em vermelho indicam os resíduos mutados.

Proteína	Vias de reparo de DNA*	NLS
MLH1	MMR	⁴⁶⁶ SSN PR KRHRED ⁴⁷⁶
MLH1 K471N	-	⁴⁶⁶ SSN PR N RHRED ⁴⁷⁶
MLH1 R472N	-	⁴⁶⁶ SSN PR K N HRED ⁴⁷⁶
PMS2	MMR	⁵⁷¹ LATPNT K R F KKEE ⁵⁸³
PMS2 K577N	-	⁵⁷¹ LATPNT N R F KKEE ⁵⁸³
PMS2 R578N	-	⁵⁷¹ LATPNTK N F KKEE ⁵⁸³
XPG1	NER	¹⁰⁵⁴ KTQ K RGITNTLEESS L K R KRLSD ¹⁰⁷⁶
XPG2	NER	¹¹⁶⁶ VFG K KRRKLRRARG R K R KT ¹¹⁸⁶

*(CHRISTMANN, *et al.*, 2003; KNUDSEN, *et al.*, 2007)

2. OBJETIVO

O objetivo é estudar as interações que ocorrem entre a proteína importina- α de mamíferos com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA e algumas possíveis mutações nestas sequências, dentre as quais: MLH1, MLH1 K471N, MLH1 R472N, PMS2, PMS2 K577N, PMS2 R578N, XPG 1 e XPG2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529)

Para a expressão em larga escala da Imp α truncada (70-529), vetores pET-30a (Novagen) contendo a sequência que codifica Imp α de *Mus musculus*, isoforma 2, foram cedidos por nosso colaborador, Prof. Kobe, da Universidade de Queensland, Austrália. A forma truncada é importante para evitar competições entre os peptídeos NLS e o domínio auto-inibitório da proteína. Bactérias *Escherichia coli*, linhagem BL21(DE3), foram transformadas com o vetor e os clones selecionados. A metodologia empregada tem como base o protocolo descrito por Teh e colaboradores (TEH, *et al.*, 1999).

O pré inóculo foi preparado com bactérias inoculadas em 40 mL meio LB (*Luria Bertani*) líquido, contendo o agente de seleção canamicina (1,0 μ g/mL), e em seguida incubadas com agitação constante por 15 horas a temperatura de 37 °C. Posteriormente, cerca de 20 mL desse pré-inóculo foi transferido para 2,0 L de LB contendo 1,0 μ g/mL de canamicina e as bactérias cresceram com agitação constante a temperatura de 37 °C por aproximadamente 3 horas e/ou até atingir Abs 600 nm (Densidade Ótica) de 0,6.

Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL desse meio de cultura foi retirada para controle da indução e ao restante foi adicionado IPTG, 1 mM (*Isopropyl-B-D-Galactoside*), levando à indução da proteína de interesse, com agitação constante à 28 °C. Após 4 horas de indução, as bactérias foram separadas do meio por centrifugação a 4788 xg por 10 minutos à temperatura de 4 °C e em seguida, ressuspensas em 100 mL de tampão (20 mM Hepes pH 7,0 e 500 mM NaCl) para lavagem e centrifugado novamente. A indução foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com uma concentração de 12 %, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para a lise das bactérias, essas foram ressuspensas em 100 mL de tampão (20 mM Hepes pH 7,0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e 5 mM Imidazol) contendo inibidores de proteases (1 μ g/mL Aprotinina, 1 μ g/mL Leupeptina, 1 μ g/mL Pepstatina, 1 mM PMSF e 0,1 mM TCEP), lisozima (1 mg/mL) além de DNase e RNase. Com auxílio do vórtex, a amostra foi homogeneizada a cada 10 minutos e mantida no gelo por uma hora. Após essa etapa, a amostra foi centrifugada a 4788 xg por 30 minutos à temperatura de 4 °C. A parte solúvel foi coletada, esperando-se que parte da proteína recombinante induzida estivesse solúvel. A solubilidade da proteína foi observada por eletroforese em gel de poliacrilamida com uma concentração de 12% (SDS-PAGE).

Para a purificação da proteína recombinante foi realizada a cromatografia líquida por afinidade a Níquel. O extrato solúvel de *E. coli* contendo a proteína recombinante (Imp α) foi purificado utilizando a coluna de afinidade HisTrapTMFF (GE Healthcare), contendo 5,0 mL de resina de Níquel-agarose, a qual foi acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) e submetida a fluxo contínuo de 1,0 mL/min de solução tampão A (20 mM hepes pH 7,0; 1,0 M NaCl e 15 mM imidazol). Posteriormente a amostra foi aplicada com fluxo 0,5 ml/min e pressão controlada, não ultrapassando 0,3 MPa. A coluna foi lavada com tampão A para remover o material que tenha se ligado inespecificamente a coluna. Posteriormente foi realizada a eluição da amostra por meio de gradiente de 15 mM até 150 mM de imidazol pelo tampão B (20 mM hepes pH 7,0; 1,0 M NaCl e 150 mM imidazol). A purificação foi observada por eletroforese (SDS-PAGE) com uma concentração de 12%.

A amostra purificada foi submetida à diálise utilizando a membrana *dialysis tubing* (Sigma) para proteínas de massa molecular superior a 12 kDa, para a troca de tampão B para o tampão C (20 mM Tris HCl pH 8,0, 100mM NaCl), a temperatura de -4 °C. Posteriormente a amostra foi concentrada utilizando o concentrador vivaspin 20, 30 kDa (GE Healthcare) e a centrífuga com rotação de 4000 xg em ciclos de 15 minutos, mantendo a temperatura de -4 °C. A amostra a 18 mg/ml, foi armazenada a temperatura de -20 °C.

3.2. CRISTALIZAÇÃO

Os experimentos de cristalização foram feitos na busca de melhores condições de cristalização, empregando-se a difusão de vapor por gota suspensa (*hanging drop*) (MCPHERSON, 1982) tendo como ponto de partida as condições de cristalização da Imp α nativa (KOBÉ, *et al.*, 2009). Constatada a viabilidade da amostra, experimentos de co-cristalização com peptídeos NLS foram realizadas com base na variação de parâmetros de cristalização os quais resultaram em estruturas com presença de peptídeos NLS (FONTES, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2003; FONTES, *et al.*, 2003a).

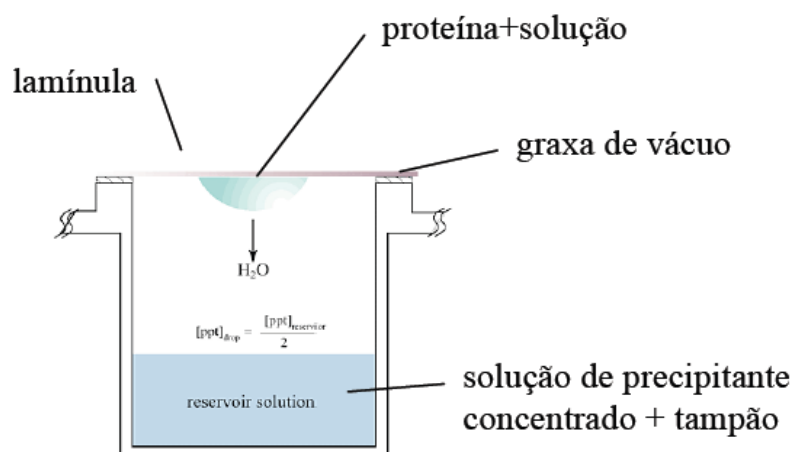


Figura 10 - Método para cristalização: *hanging drop* (gota suspensa). Imagem obtida do catálogo da empresa *Hampton Research*.

Para a obtenção de cristais de Imp α com os peptídeos, a gota foi constituída por 1,0 μ l da solução da proteína recombinante (18 mg/ml de concentração), 0,5 μ l da solução do peptídeo (na qual a concentração de cada peptídeo foi calculada para que a proporção de 8 moléculas de ligante para 1 de proteína recombinante) e mais 0,5 μ l da solução do reservatório contendo citrato de sódio como agente precipitante com variações de 0,5 M, à 0,75 M; 0,1 mM de citrato de sódio pH 6,0 como tampão e 10 mM de DTT (DL-Dithiothreitol) como aditivo. Os experimentos foram armazenados a temperatura de 18 °C. Com base em experimentos preliminares e para a otimização dos cristais de Imp α com o peptídeo XPG1, a proporção utilizada foi de 4 moléculas de ligante para 1 de proteína recombinante.

3.3. COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO

Conjuntos de dados de difração de raios-X dos complexos Imp α com os peptídeos PMS2, MLH1 e XPG2 foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas - SP, Brasil com $\lambda=1,46$ Å, montados em loops de nylon e mantidos em fluxo de nitrogênio gasoso à -173 °C (Oxford Cryosystems®). Em todos os experimentos houve a necessidade de adição de glicerol, a 25 % (v/v), como crioprotetor adicionado às condições da solução-mãe, para evitar perda do cristal por causa do congelamento. Imagens foram coletadas pelo detector MarCCD (MarResearch).

O conjunto de dados de difração de raios-X do complexo Imp α com o peptídeo XPG1 foi coletado no National Synchrotron Light Source (NSLS), no Laboratório Nacional de

Brookhaven (BNL), em Upton - NY, EUA com $\lambda=1,10$ Å. O cristal foi montado em *loop* de nylon, com presença de glicerol, à 25 % (v/v) como crioprotetor adicionado as condições da solução-mãe e mantido em fluxo de nitrogênio gasoso à -173 °C. As imagens foram coletadas pelo detector Pilatus 6M. Os programas DENZO e SCALEPACK do pacote HKL2000 (OTWINOWSKI Z, *et al.*, 1997) foram utilizados para o processamento dos dados coletados.

3.4. ELUCIDAÇÃO E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

Para o presente trabalho, como os cristais obtidos eram isomorfos em relação as estruturas dos complexos de Imp α previamente elucidadas, as estruturas puderam ser resolvida por Síntese de Fourier (MCREE,1993).

Inicialmente os complexos Imp α -PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 foram submetidos a um refinamento de corpo rígido, utilizando-se a coordenada da estrutura de Imp α truncada em sua porção N-terminal co-cristalizada com o peptídeo NLS monopartido SV40CN (antígeno T do vírus símio 40, versão estendida - PDB ID: 1Q1S) (FONTES, *et al.*, 2003a). A seguir, foram efetuados refinamentos de átomos e fatores de temperatura. Ao gerar mapas de densidade eletrônica, os modelos proteicos foram visualizados e confirmados com o programa gráfico "*Coot*" (EMSLEY, *et al.*, 2004), onde foi realizada a modelagem. Na etapa de modelagem, foi efetuado o ajuste manual dos resíduos em relação ao mapa densidade eletrônica (calculado a partir das informações de intensidades e fases das reflexões de difração de raios-X). Essas informações (experimentais) e outras informações estruturais como, distâncias de ligações, ângulos, interações com os átomos da vizinhança são utilizados em programas que minimizam todas estas energias, tais como o "*CCP4*" (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994) e "*Phenix*" (ADAMS, *et al.*, 2002). Os modelos foram novamente avaliados, modelados e novamente submetidos a ciclos de minimização. Esse processo ocorre de maneira alternada, com adição dos peptídeos, moléculas de água e também outros ligantes, até que se chegue a estrutura final, com máxima concordância dos dados experimentais e a estereoquímica. Além do programa "*Phenix*", que já nos fornece dados sobre a qualidade estereoquímica do complexo com o "*Phenix Validation*", o modelo final ainda é submetido a uma validação pelo *PROCHECK* (LASKOWSKI, *et al.*, 1993) e *SFCHECK* (VAGUINE, *et al.*, 1999) presentes no pacote de programas do CCP4 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994).

3.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS NLS

A síntese dos peptídeos, correspondentes aos NLSs: MLH1, MLH1 K471N, MLH1 R472N, PMS2, PMS2 K577N, PMS2 R578N, XPG1 e XPG2 (**Tabela 3**), foram realizadas por empresas especializadas com grau de pureza de 95% à 99%. As empresas foram a *Proteimax* e a *GenOne*. Para a síntese dos peptídeos, foram adicionados resíduos às extremidades dos NLSs, para garantir melhor interação com a Imp α , conforme trabalhos de co-cristalização anteriormente realizados por nosso grupo.

3.6. EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica são realizados por titulação, à temperatura constante, de 2 ou mais compostos, objetivando-se medir a variação de calor relacionada à interação entre as biomoléculas. Em nosso caso, as biomoléculas eram a Imp α e diferentes peptídeos.

O microcalorímetro utilizado é composto basicamente de 2 células, uma de reação e outra de referência, sensor e controlador de temperatura e uma micropipeta automatizada, responsável pela titulação do ligante na biomolécula. O equipamento utiliza o princípio da compensação dinâmica da potência, no qual mede a quantidade de potência ($\mu\text{cal/s}$) necessária para manter as duas células em temperatura constante e iguais. A cada injeção da solução da micropipeta (em nosso caso, os peptídeos), inicia-se a reação de ligação e, dependendo da afinidade de ligação e da concentração dos reagentes, uma determinada quantidade do complexo macromolécula+ligante é formada. A formação do complexo é acompanhada pela liberação ou absorção de calor (reação exotérmica ou endotérmica, respectivamente), que causa uma diferença de temperatura entre as duas células, a qual é prontamente compensada pela potência térmica aplicada, mantendo ambas praticamente à mesma temperatura. Após cada injeção, o sistema entra novamente em equilíbrio, e o sinal registrado é de um padrão de deflexão na forma de um pico. Pelo cálculo da área de cada pico, é obtido o calor associado com a injeção e conforme a macromolécula fica saturada, a quantidade de calor diminui até que apenas o calor de diluição do ligante seja registrado. Pela taxa de variação da troca de calor entre célula e o ambiente, é determinada a taxa de ocorrência da reação e a variação de entalpia da reação (VELAZQUEZ-CAMPOY, *et al.*, 2004; FREYER, *et al.*, 2008).

Anteriormente às titulações, a proteína e os peptídeos foram dialisados a fim de garantir que ambos estavam diluídos com o mesmo tampão (20 mM Tris HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl). Nos experimentos foi utilizado um microcalorímetro iTC₂₀₀ (MicroCal – GE Healthcare Life Sciences) com as seguintes configurações: temperatura de 20°C, agitação de 800 rpm, tempo entre injeções de 240 segundos, primeira injeção com 0,4 μ L e as demais 19 injeções de 2 μ L (duração das injeções de 0,8 e 4 segundos, respectivamente). A concentração da Imp α foi de 30 μ M (determinada espectrofotometricamente) e a concentração dos peptídeos variaram de 240-450 μ M e está descrita nos termogramas de cada titulação.

Para realizar os ajustes dos dados adequadamente, utilizando um modelo de interação que indica dois sítios de ocupação diferentes (1 proteína: 2peptídeos), foi utilizada a metodologia de polinômio de ligação, com o auxílio do pesquisador Adrian Velazquez-Campoy (Universidade de Zaragoza, Espanha) e do doutorando Thiago Revers Dreyer, do nosso grupo de pesquisa. A análise de dados foi realizada em três etapas: i) ajuste da concentração da proteína para garantir que a estequiometria (n) das ligações correspondessem a valores inteiros (n=1 ou n=2); ii) cálculo do calor gerado ou absorvido em cada e normalização deste pela razão molar dos peptídeos pela Imp α ; iii) o ajuste dos dados (constante de dissociação (k_d) e entalpia (ΔH)) foi feito pela metodologia de polinômios de ligação (FREIRE, *et al.*, 2009; VEGA, *et al.*, 2015) utilizando-se algoritmos implementados em ambiente MatLab com a função de Levenberg-Marquardt para minimização dos erros. Os parâmetros de energia livre de Gibbs (ΔG) e variação de entropia (ΔS) foram determinados matematicamente através da constante de dissociação e da entalpia. Os gráficos dos calores de titulação e os termogramas foram confeccionados no programa *Origin*.

Com esta técnica, foram realizados ensaios de afinidade, entre a proteína Imp α e os peptídeos NLSs. O peptídeo SV40 NLS foi utilizado para a padronização dos experimentos de interação da Imp α com os peptídeos NLSs, já que apresenta dados disponíveis na literatura de outro calorímetro (MicroCal VP-ITC), tornando assim um bom padrão em termos comparativos, visto que, a SV40 é uma NLS monopartida (CUTRESS, *et al.*, 2008; FALCES, *et al.*, 2010). Essa padronização é necessária, pois garante confiabilidade na comparação de dados de diferentes amostras, os equipamentos possuem diferenças quanto a sensibilidade e tempo de resposta, além de limitações do volume de amostra de trabalho.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529)

A partir dos clones armazenados a -80°C , experimentos de indução em larga escala foram efetuados para obtenção de amostras em quantidade e qualidade suficientes para procedimentos seguintes. Conforme esperado, constatou-se a indução da proteína recombinante (**Figura 11**). Além disso, após lise celular, verificou-se a Imp α presente tanto na fração solúvel (sobrenadante) quanto insolúvel (pellet) (**Figura 11**), confirmando a presença de Imp α em quantidade suficiente para purificação. Apenas a fração solúvel do extrato total foi utilizada na purificação, para garantir que a Imp α presente na amostra apresentasse integridade estrutural, fator essencial para sucesso na obtenção de dados cristalográficos.

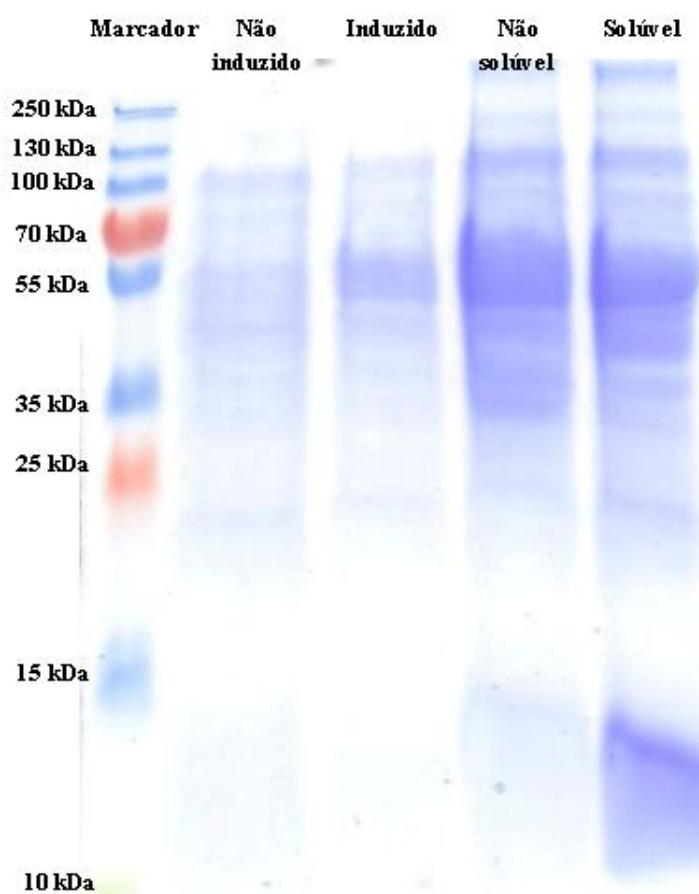


Figura 11 - Verificação da indução da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A proteína recombinante apresenta ~55 kDa. São mostradas as frações não induzido e induzido da proteína alvo recombinante e as frações não solúvel e a solúvel dessa proteína após a lise celular, respectivamente.

A purificação em coluna de afinidade separou a Imp α de outras proteínas presentes na fração solúvel do extrato total de *E. coli*. Nesta purificação, durante a realização da eluição por gradiente de concentração de imidazol, a concentração de imidazol foi mantida constante enquanto a leitura da radiação UV a 280 nm indicava desprendimento de material da coluna com o intuito de remover impurezas que pudessem interferir nos experimentos de co-cristalização. A amostra de Imp α foi eluída da coluna de cromatografia com 100% de tampão B, **Figura 12**.

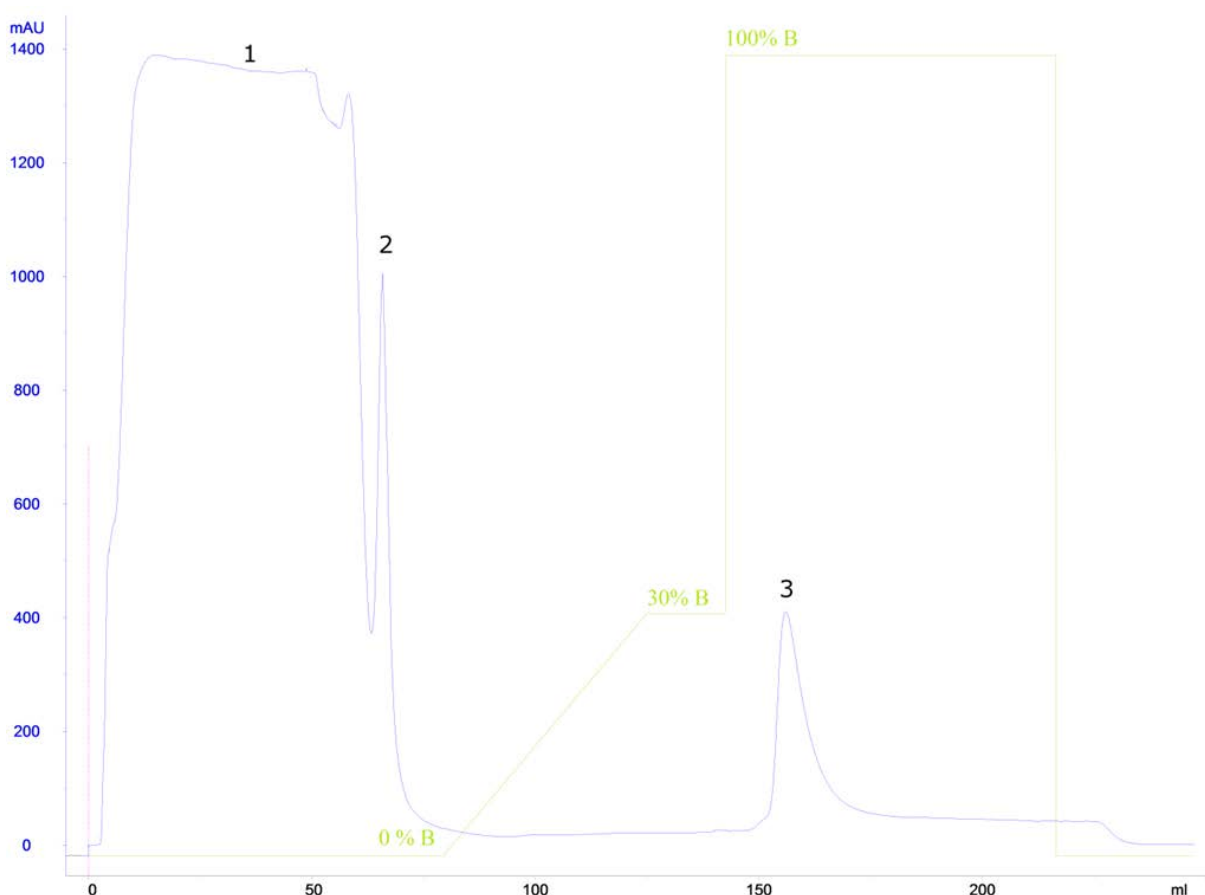


Figura 12 - Cromatograma de purificação da proteína Imp α por afinidade, onde o número 1 corresponde a adsorção de amostra e eluição do material não aderido a coluna, o número 2 correspondem ao pico de lavagem da coluna, após a adsorção de amostra e o número 3 corresponde a alíquota de proteína purificada eluída durante todo o processo. Em azul é mostrado a absorbância de eluição de proteína a 280 nm; Em verde o gradiente de eluição, indicando a porcentagem do tampão de eluição no sistema.

Após a purificação por afinidade em coluna de níquel, a amostra de Imp α passou por uma diálise em tampão Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT (DL-Dithiothreitol), para viabilizar a condição da amostras para futuros experimentos. Frações da purificação foram analisadas em SDS-PAGE a 12% para verificar a pureza das mesmas conforme nos mostra a **Figura 13**. De acordo com o gel (**Figura 13**) e o cromatograma (**Figura 12**), é possível

observar que as proteínas referentes ao metabolismo da *E. coli*, que não possuem afinidade com a coluna de purificação, não aderem a mesma, como observado na região de pico 1 do cromatograma e alíquota "Pico 1" do gel. As proteínas que possuem um mínimo de afinidade pela coluna são eluídas na lavagem da coluna pelo tampão A, pico 2 do cromatograma e alíquota "Pico 2" do gel. A proteína recombinante é eluída com 100% de tampão B, pico 3 do cromatograma e alíquotas "Pico 3" do gel.

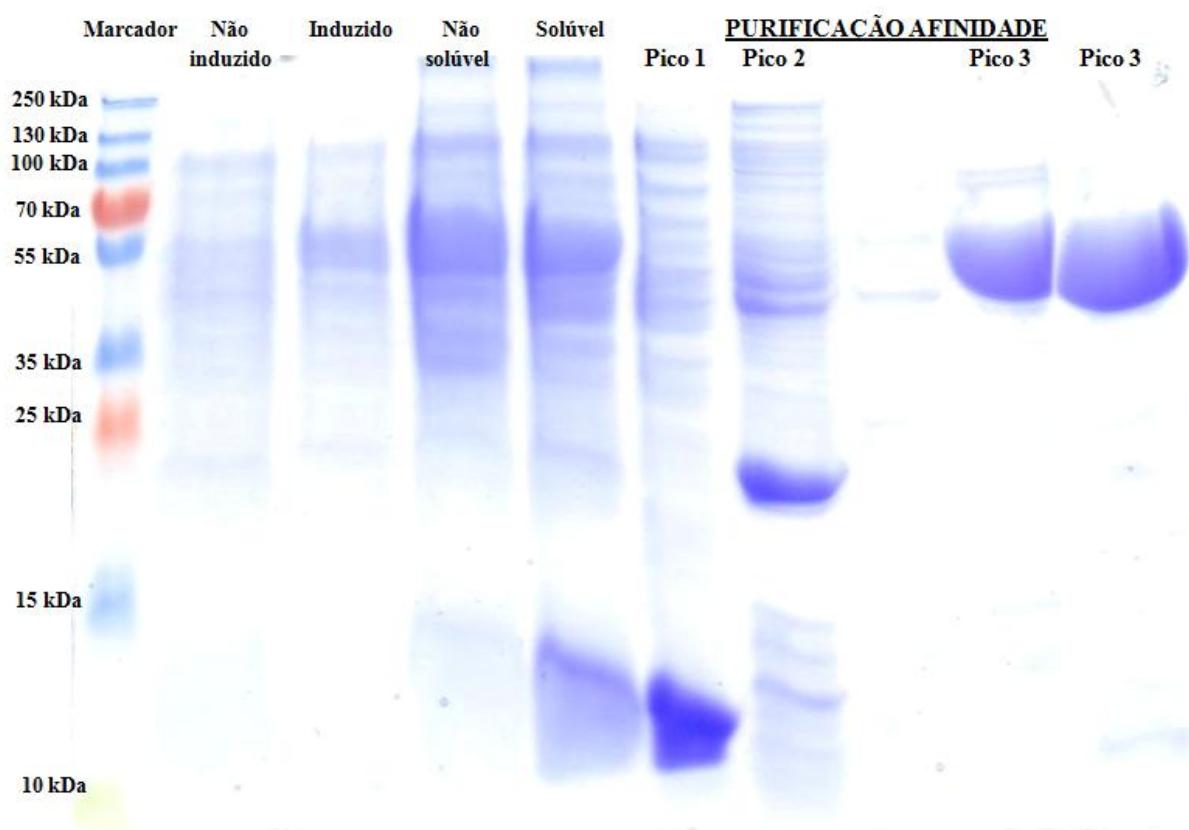


Figura 13 - Verificação da purificação por afinidade da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A proteína recombinante apresenta massa molecular de ~55 kDa. São mostradas as frações não induzida e induzida da proteína alvo recombinante e as frações não solúvel e a solúvel após a lise celular. O **Pico 1** corresponde ao pico de adsorção de amostra e eluição do material não aderido a coluna, o **Pico 2** corresponde ao pico de lavagem da coluna antes da eluição e o **Pico 3** corresponde a alíquotas retiradas durante a eluição do pico de proteína recombinante com 100% do tampão de eluição.

A purificação por afinidade nos permitiu a obtenção de amostras viáveis para a etapa de cristalização de proteínas. O rendimento de proteína recombinante para um litro de indução foi de aproximadamente 300 μ l de proteína com concentração de 18 mg/ml.

4.2. CRISTALIZAÇÃO

A amostra concentrada a 18 mg/ml, foi utilizada nos experimentos de cristalografia. Inicialmente, foram obtidos cristais nativos, visando a confirmação da viabilidade da amostra obtida (**Figura 14**). Para os experimentos de co-cristalização da Imp α e os peptídeos NLSs, foram feitas buscas pelas melhores condições de cristalização com base nas condições descritas por Kobe (KOBÉ, 1999). Peptídeos NLS foram adicionados as gotas nas proporções de 8 moléculas de ligante para 1 molécula da Imp α para os peptídeos PMS2, MLH1 e XPG2 e de 4 moléculas de ligante para 1 molécula da Imp α para o peptídeo XPG1. Essa proporção foi utilizada para este peptídeo devido à alta concentração de precipitado e baixa formação de cristais observada em experimentos anteriores.

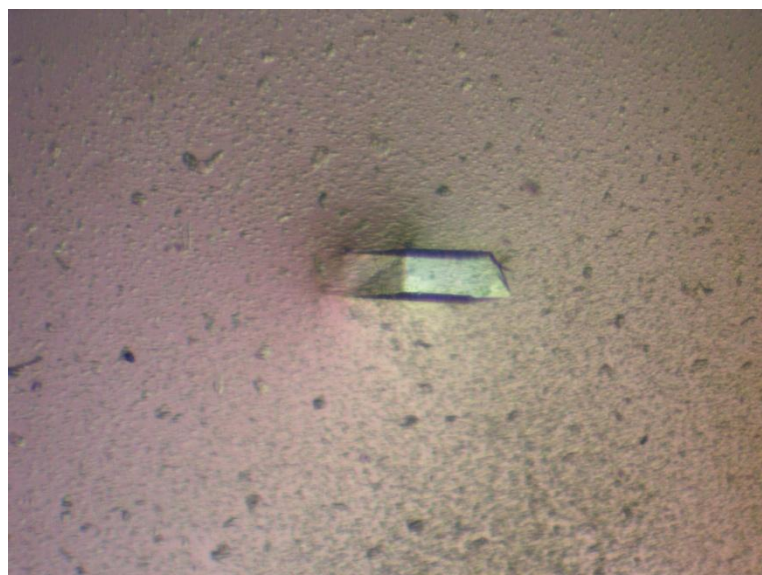


Figura 14 - Cristal da Imp α nativa obtido na condição: citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mM/L.

Os complexos Imp α e os peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 resultaram em cristais convenientes para experimento de difração de raios-X. Os cristais de todos os complexos foram obtidos em condições similares às da Imp α nativa, com variações de: 0,55-0,7 M/L de citrato de sódio, tampão citrato de sódio 0,1 mM/L pH 5,8-6,2 e 10 mM/L de DTT (DL-Dithiothreitol) (**Tabela 4**). O tempo médio para crescimento dos cristais foi de ~15-30 dias. Na **Figura 15** são mostrados cristais dos complexos Imp α /peptídeos NLSs: PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2, respectivamente.

Tabela 4 - Condições de cristalização dos cristais utilizados em experimentos de difração de raios-X.

Imp α /Peptídeo	Concentração - agente precipitante (Citrato de sódio)	Tampão (Citrato de sódio)	DTT
PMS2	0,600 M/L	pH 6,0	10 mM/L
MLH1	0,625 M/L	pH 6,0	10 mM/L
XPG1	0,600 M/L	pH 6,0	10 mM/L
XPG2	0,700 M/L	pH 6,0	10 mM/L

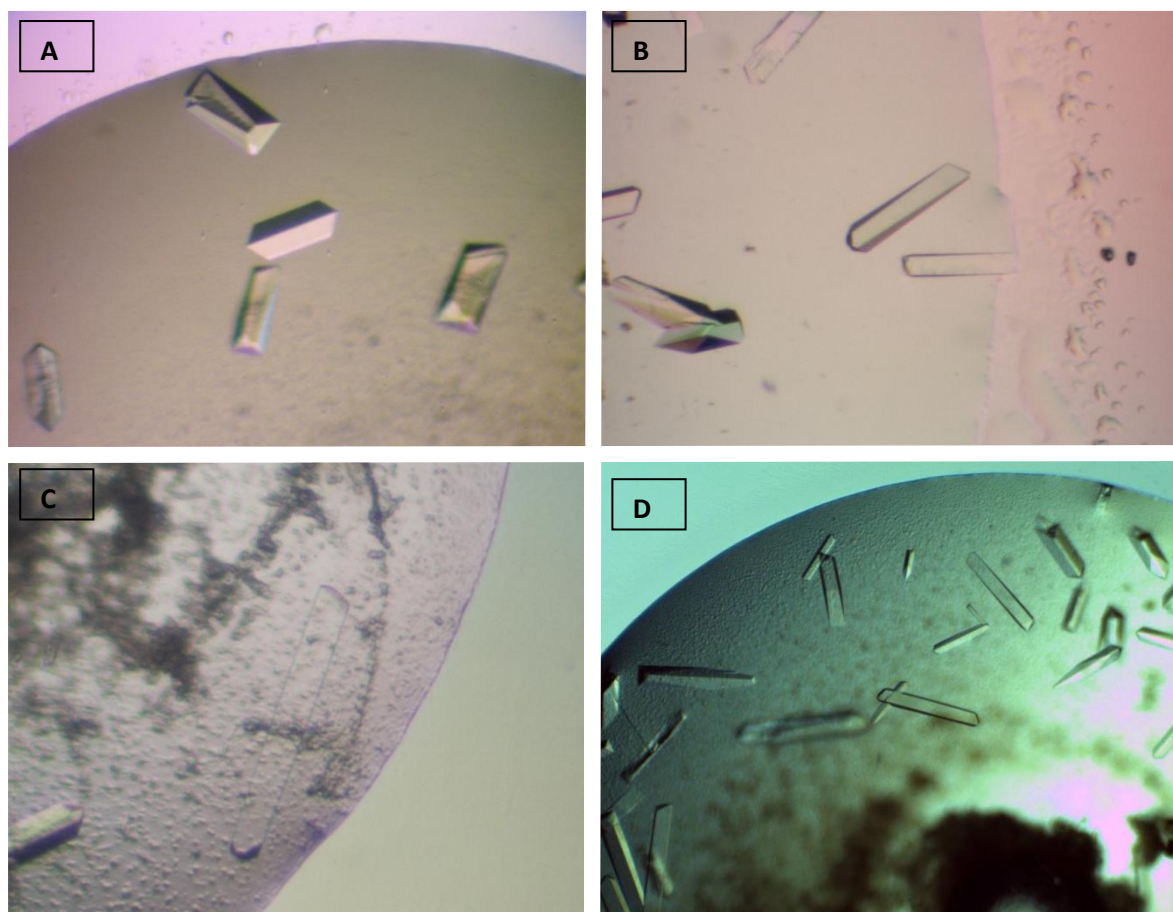


Figura 15 - A. Cristais do complexo PMS2 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mM/L. B. Cristais do complexo MLH1 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,625 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L. C. Cristais do complexo XPG1 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,6 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L. D. Cristais do complexo XPG2 NLS:Imp α ; condição citrato de sódio 0,7 M/L, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mM/L.

Os complexos Imp α com os peptídeos mutados MLH1 K471N, MLH1 R472N, PMS2 K577N e PMS2 R578N não resultaram em cristais. Variações na proporção de Imp α /peptídeos NLS, concentração de agente precipitante, pH e temperatura resultaram na formação de precipitados nos experimentos e não houve progresso na alteração dos parâmetros.

4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Os cristais dos complexos com os peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2:Imp α foram coletados com fluxo de nitrogênio gasoso à -173 °C e na presença de crioprotetor (25% de glicerol).

O processamento foi efetuado com o pacote de programas do "HKL2000" (OTWINOWSKI, *et al.*, 1997). Os cristais obtidos eram isomorfos (grupo espacial P2₁2₁2₁) em relação aos outros complexos peptídeos NLSs:Imp α (FONTES, *et al.*, 2003). Dados obtidos dos complexos com os peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 resultaram em conjuntos de dados processados à 2,1; 2,17; 2,0 e 2,8 Å de resolução respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X. Os cristais dos complexos Imp α /PMS2NLS, Imp α /MLH1NLS e Imp α /XPG2NLS foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas, SP) e o cristal do complexo Imp α /XPG1NLS foi coletado no *National Synchrotron Light Source* (NSLS - Upton, NY).

	Imp α /PMS2NLS	Imp α /MLH1NLS	Imp α /XPG1NLS	Imp α /XPG2NLS
Cela unitária (Å)	a=77,1 b=89,5 c=97,0	a=77,2 b=89,1 c=99,1	a= 78,6 b= 89,5 c= 99,8	a=78,5 b=90,8 c=100,9
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Resolução (Å)	40,0-2,1 (2,18-2,10) ^a	40,0-2,1 (2,25-2,17) ^a	40,0-2,0 (2,07-2,00) ^a	40,0-2,8 (2,88-2,80) ^a
Reflexões únicas	39970	36854	50196	33617
Dados completos (%)	99,7 (98,9) ^a	99,5 (97,9) ^a	99,4 (99,1) ^a	99,3 (100) ^a
R_{merge}^b (%)	6,1 (46,8) ^a	7,4 (61,8) ^a	12,9 (64,1) ^a	13,8 (94,9) ^a
I/σ (I)	18,6 (2,2) ^a	24,1 (2,4) ^a	10,3 (2,1) ^a	6,9 (1,5) ^a
Redundância	2,9 (2,6) ^a	6,4 (5,4) ^a	4,3 (4,0) ^a	4,4 (4,3) ^a

^a Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.

^b $R_{merge} = \sum hkl (\sum i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum hkl, i \langle I_{hkl} \rangle$ onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade cada medida individual da reflexão com índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\% (I)$ (OTWINOWSKI Z, *et al.*, 1997).

4.4. ELUCIDAÇÃO, MODELAGEM E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

As estruturas foram resolvidas por Síntese de Fourier (MCREE,1993) devido ao isomorfismo dos cristais obtidos nesta tese em relação aos complexos de Imp α de *M. musculus* obtidos anteriormente (FONTES, *et al.*, 2000; TAKEDA, *et al.*, 2011; DE BARROS, *et al.*, 2012). Inicialmente os complexos Imp α -PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 foram submetidos a um refinamento de corpo rígido, utilizando-se a coordenada de uma das

estruturas de Imp α truncada em sua porção N-terminal co-cristalizada com o peptídeo NLS monopartido SV40CN (PDB ID: 1Q1S) (FONTES, *et al.*, 2003a). A seguir, foram efetuados refinamentos de átomos e fatores de temperatura. Ao gerar mapas de densidade eletrônica, os modelos proteicos foram visualizados e confirmados no programa gráfico "*Coot*" (EMSLEY, *et al.*, 2004), onde foi realizada a modelagem.

Após o refinamento de corpo rígido, pode-se verificar claramente a presença de densidades eletrônicas correspondentes aos peptídeos. Para os complexos com os peptídeos NLSs MLH1, XPG1 e XPG2 houve o reconhecimento de densidade eletrônica correspondente aos peptídeos NLSs nos sítios principal (S_1) e secundário (S_2) de ligação da Imp α , enquanto para o peptídeo NLS PMS2 houve o reconhecimento de uma densidade eletrônica somente no sítio de ligação principal (S_1). Dessa maneira os peptídeos foram adicionados aos modelos, modelados e refinados levando-se em consideração as densidades eletrônicas. As conformações dos peptídeos MLH1, PMS2, XPG1 e XPG2 NLSs puderam ser modeladas sem ambiguidade.

Os modelos dos complexos dos peptídeosNLS/Imp α tiveram seus refinamentos com fatores R iniciais de 24,8%, 24,7%, 23,0%, 21,6% e R_{free} 26,7%, 28,2%, 24,4%, 25,5% para a MLH1, PMS2, XPG1 e XPG2, respectivamente. Após adição e modelagem dos peptídeos nas respectivas densidades eletrônicas presente nos sítios de ligação da Imp α , ciclos de refinamento de posição e fator de temperatura foram efetuados. Ao término do processo, a qualidade estereoquímica dos modelos foram confirmadas pelos programas *PROCHECK* (LASKOWSKI, *et al.*, 1993), *SFCHECK* (VAGUINE, *et al.*, 1999) presentes no pacote de programas do CCP4 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994) e também realizadas com o próprio programa *Phenix Validation* (ADAMS, *et al.*, 2002). As estatísticas finais de refinamento encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Estatísticas de refinamento dos complexos Imp α com peptídeos NLS.

	Imp α /PMS2NLS	Imp α /MLH1NLS	Imp α /XPG1NLS	Imp α /XPG2NLS
Resolução (Å)	40,0-2,10 (2,18-2,10) ^a	40,0-2,17 (2,25-2,17) ^a	40,0-2,00 (2,07-2,00) ^a	40,0-2,80 (2,88-2,80) ^a
Número de reflexões. F>0	39655	36598	49816	17937
Dados completos (%)	99,7 (98,9) ^a	99,5 (97,9) ^a	99,4 (99,1) ^a	99,3 (100) ^a
R_{cryst}^b (%)	17,9	17,4	16,2	18,7
R_{free}^c (%)	22,5	21,5	19,7	22,8
Número de átomos (não hidrogênios):				
Proteína	3179	3250	3113	3163
Peptídeo	87	164	139	107
H₂O	328	289	185	0
Fator de temperatura médio (Å²)^e	40,4	48,5	52,4	77,0
Gráfico de Ramachandran^d				
Resíduos nas regiões mais favoráveis (não permitidas) (%)	98,8 (0,2)	99,1 (0,2)	97,4 (0,2)	95,3 (1,4)

^a Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.

^b $R_{cryst} = \sum hkl (||F_{obs}hkl| - |F_{calc}hkl||) / \sum |F_{obs}hkl|$, onde $|F_{obs}hkl|$ e $|F_{calc}hkl|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst}, mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas. ^d Calculado com o programa PROCHECK (LASKOWSKI, *et al.*, 1993).

4.5. ESTRUTURA DA Imp α NOS DIFERENTES COMPLEXOS NLSs

Em todos os modelos obtidos da Imp α truncada (70-529), foi encontrada densidade eletrônica dos resíduos 72 ao 496. Os modelos da Imp α nos complexos são essencialmente idênticos em relação à estrutura nativa (**Figuras 16**) (KOBÉ, 1999). O desvio r.m.s. dos C α dos resíduos 72-496 da Imp α nativa (PDB ID 1IAL) comparado com das estruturas com os ligantes são 0,33; 0,35, 0,24Å e 0,30 Å para os modelos contendo peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2, respectivamente. Quando comparado com a estrutura de Imp α depositada com maior resolução (PDB ID 3UL1) (MARFORI, *et al.*, 2012) o desvio r.m.s. dos C α dos resíduos 72-496 são 0,31; 0,29, 0,19 e 0,39 Å. Isso indica que a presença dos peptídeos NLS não promovem alterações conformacionais significativas nas estruturas de Imp α .



Figura 16 - Representação da Imp α obtida nos diferentes complexos, sobrepostos, em diagramas de fitas. Em destaque, em cinza, os motivos Arm. Em azul, Imp α obtida do complexo com o peptídeo PMS2, em rosa, Imp α obtida do complexo com o peptídeo MLH1, roxo Imp α obtida do complexo com o peptídeo XPG1 e em laranja, Imp α obtida do complexo com o peptídeo XPG2.

4.7. ESTRUTURA DOS DIFERENTES PEPTÍDEOS NLSs

4.7.1. Imp α /PMS2NLS

Pela estrutura do complexo com o peptídeo PMS2 (⁵⁷¹LATPNTKR~~FK~~KKEE⁵⁸³), foi possível constatar a presença de densidade eletrônica na região do sítio de ligação principal (S₁), em que resíduos de 574-583 foram modelados com cadeia principal posicionada em configuração antiparalela em relação à Imp α , (**Figuras 17 e 18**). Não foi encontrada uma densidade eletrônica no qual fosse possível modelar átomos no sítio S₂ da Imp α . A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo é de 742,6 Å² (KRISSINEL, *et al.*, 2007).

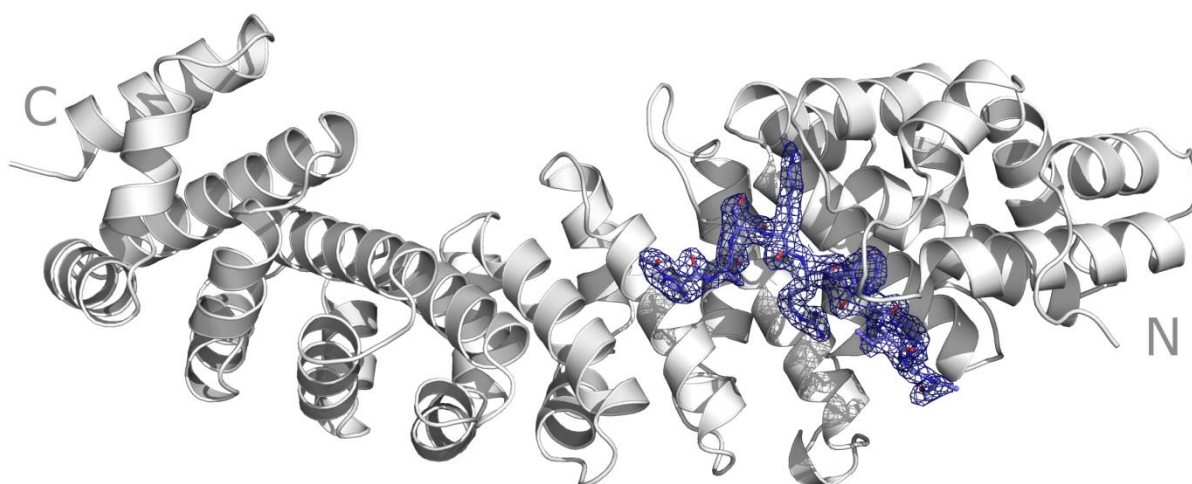


Figura 17 - Representação do complexo Impα/PMS2NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da PMS2 em *ball and sticks* (azul). Em azul mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$.

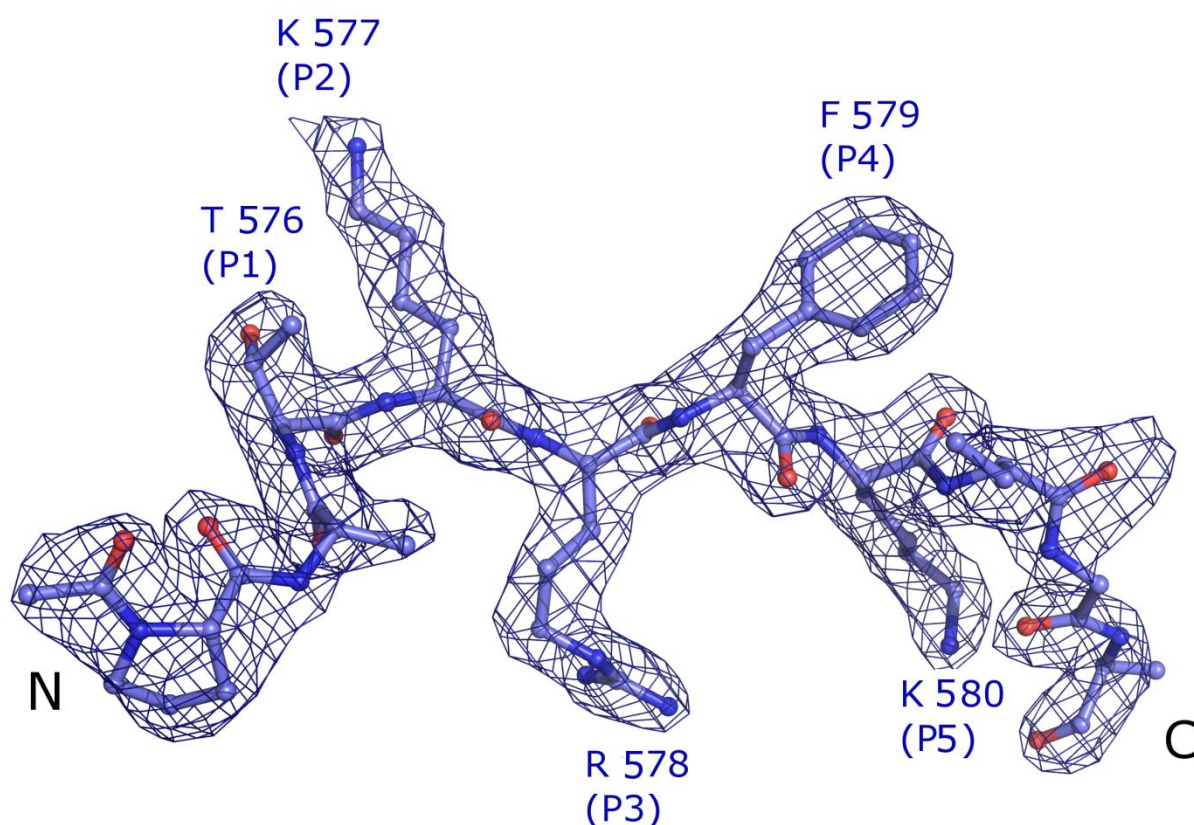


Figura 18 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da PMS2 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Impα, região de P1-P5, está indicado em azul.

O fator de temperatura ao longo da cadeia peptídica reflete as diferenças das interações dos resíduos do peptídeo com a proteína (**Tabela 7**). A média do fator de temperatura do peptídeo NLS PMS2 no sítio de ligação principal da Impα ($44,9 \text{ \AA}^2$) é maior que a média do

fator de temperatura da Imp α (36,9 Å²), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 576-580 do peptídeo, posicionados no sítio principal de ligação da Imp α (posições P₁-P₅), é de 30,7 Å². Os resíduos K⁵⁷⁷ e K⁵⁸⁰ (posições P₂ e P₅) possuem os menores fatores de temperatura (25,5 e 27,9 Å², respectivamente).

Tabela 7 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS PMS2.

Sequência		Fator de temperatura (Å ²)
Sítio Principal (S ₁)	P1	T ⁵⁷³ 68,2
	P2	P ⁵⁷⁴ 65,0
	P3	N ⁵⁷⁵ 75,5
	P4	T ⁵⁷⁶ 38,0
	P5	K ⁵⁷⁷ 25,5
		R ⁵⁷⁸ 30,3
		F ⁵⁷⁹ 31,6
		K ⁵⁸⁰ 27,9
		K ⁵⁸¹ 39,0
		E ⁵⁸² 65,1
		E ⁵⁸³ 59,0

Fator de temperatura calculado com o programa CCP4 (BAILEY, 1994; WINN, *et al.*, 2011).

Pela estrutura cristalina do complexo Imp α /PMS2NLS foi possível identificar que o peptídeo ligou-se no sítio principal de ligação da Imp α com os resíduos de lisina, arginina e lisina nas posições P2, P3 e P5 (KRXXK) respectivamente, de acordo com o consenso NLS monopartido: KR/KXR/K (CHELSKY, *et al.*, 1989) para esse sítio. Foram verificadas interações do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre a proteína e os peptídeos, que são ilustrados na forma de diagrama, na **Figura 19** e nas **Tabelas 16 e 17**, tendo como referência o diagrama gerado pelo programa Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). Todos os resíduos do peptídeo PMS2 realizaram algum tipo de interação com os resíduos da Imp α . As cadeias laterais básicas de P3 e P4 foram acomodadas nos sulcos formados pelos triptofanos 142, 184 e 231, as cargas positivas das cadeias laterais em P2, P3 e P5 realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com os resíduos conservados da Imp α , nessa região.

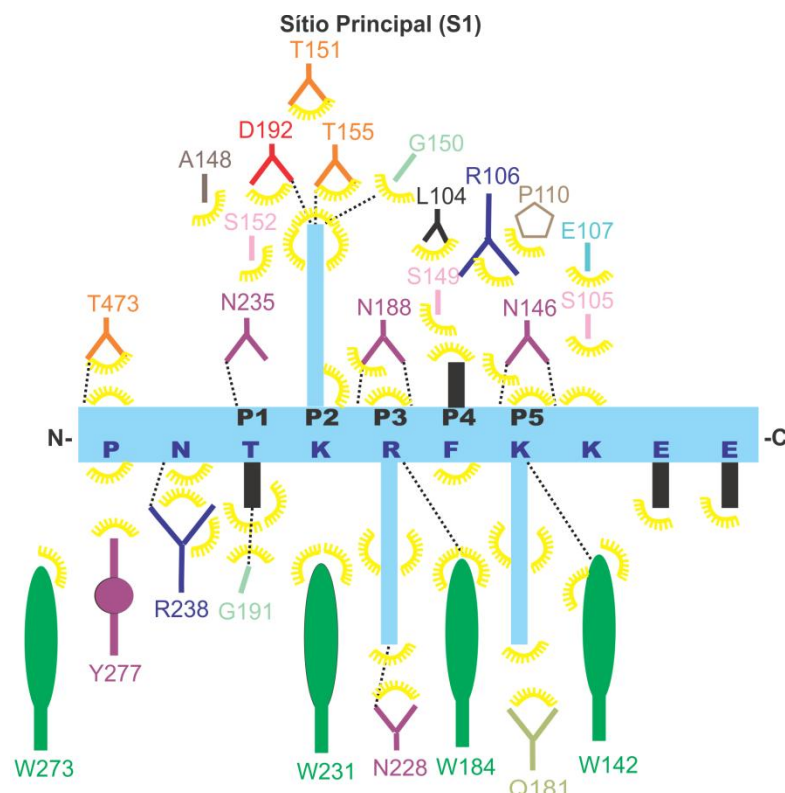


Figura 19 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS PMS2 com a Imp α no sítio principal de ligação (S₁). O peptídeo PMS2 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em azul claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995).

4.7.2. Imp α /MLH1NLS

Pela estrutura do complexo com o peptídeo MLH1 (⁴⁶⁶SSN**PRKR**HRED⁴⁷⁶), foi possível constatar a presença de densidade eletrônica na região do sítio de ligação principal, em que resíduos de 468-475 foram modelados com cadeia principal posicionada em configuração antiparalela em relação à Imp α , (**Figura 20 e 21**). Foi encontrada uma densidade eletrônica significativa no sítio S₂ da Imp α , em que resíduos de 469-474 foram modelados (**Figura 22**). A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo no sítio S₁ foi de 814,1 Å² e no sítio S₂ foi 645,1 Å² (KRISSINEL, *et al.*, 2007).

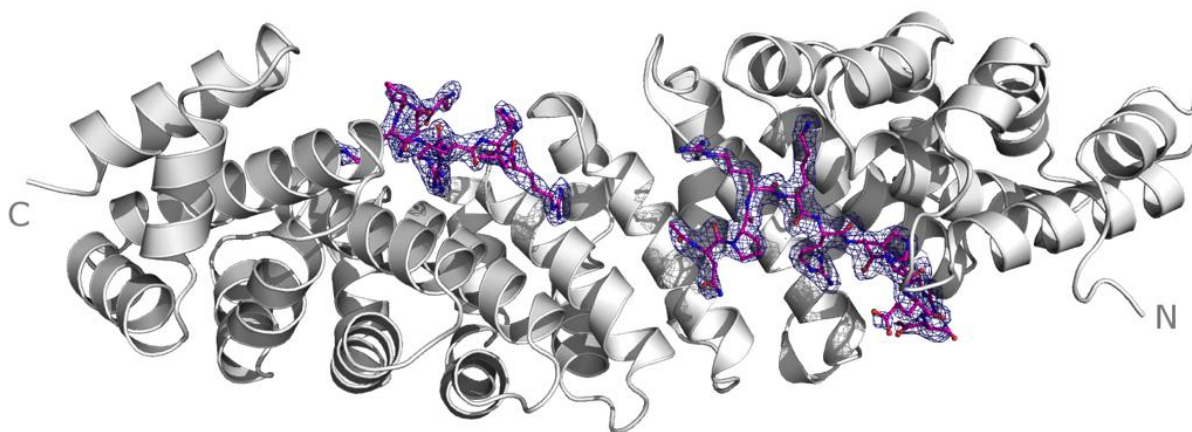


Figura 20 - Representação do complexo Imp α /MLH1NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da MLH1 em *ball and sticks* (rosa). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$.

Para o sítio principal de ligação S_1 , a média do fator de temperatura do peptídeo NLS MLH1 ($43,3 \text{ \AA}^2$) é aproximadamente igual a média do fator de temperatura da Imp α ($43,9 \text{ \AA}^2$), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 470-474 do peptídeo, posicionados nas posições P1-P5 do sítio S_1 da Imp α é $35,4 \text{ \AA}^2$. Os resíduos R471 e K472 (posições P2 e P3) possuem os menores fatores de temperatura ($29,7$ e $30,5 \text{ \AA}^2$, respectivamente) (**Tabela 8**).

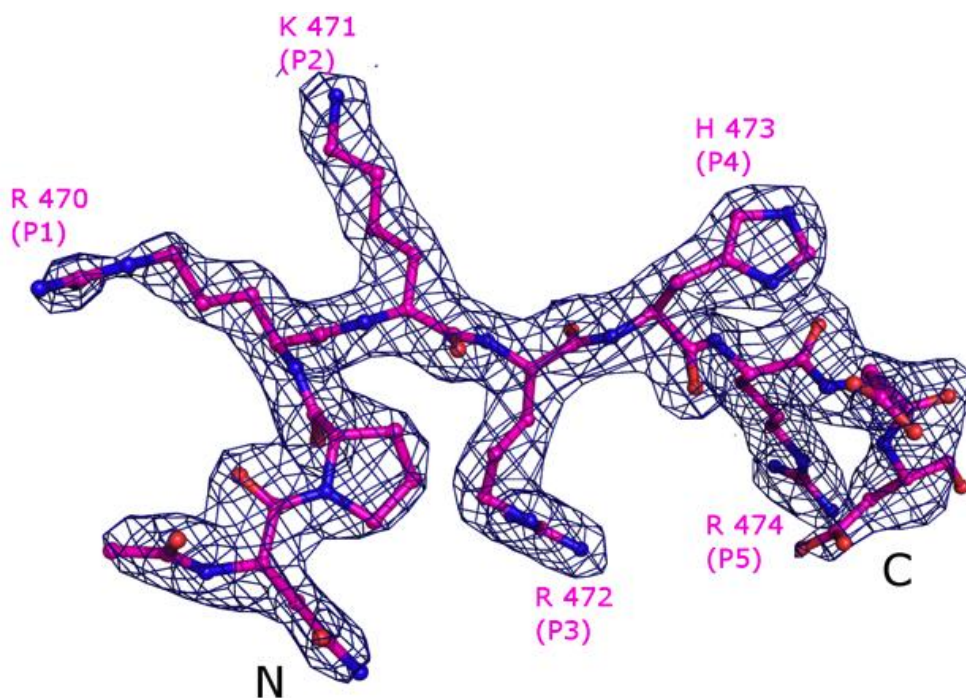


Figura 21 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$. **A.** Peptídeo NLS da MLH1 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em rosa.

Tabela 8 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS MLH1. Em preto são mostrados os valores referentes ao sítio S₂ e em azul valores referentes ao sítio S₁.

		Sequência	Fator de temperatura (Å ²)
		S ⁴⁶⁷	80,7
		N ⁴⁶⁸	74,9
		P ⁴⁶⁹	73,2
		R ⁴⁷⁰	58,0
Sítio Secundário (S₂)	P1'	K ⁴⁷¹	42,6
	P2'	R ⁴⁷²	42,6
	P3'	H ⁴⁷³	63,8
	P4'	R ⁴⁷⁴	50,4
		E ⁴⁷⁵	69,8
		S ⁴⁶⁷	53,7
		N ⁴⁶⁸	57,7
		P ⁴⁶⁹	36,2
Sítio Principal (S₁)	P1	R ⁴⁷⁰	47,9
	P2	K ⁴⁷¹	29,7
	P3	R ⁴⁷²	30,5
	P4	H ⁴⁷³	34,8
	P5	R ⁴⁷⁴	34,0
		E ⁴⁷⁵	58,6
		D ⁴⁷⁶	71,5

Fator de temperatura calculado com o programa CCP4 (BAILEY, 1994; WINN, *et al.*, 2011).

Para o sítio secundário (S₂), a média do fator de temperatura do peptídeo NLS MLH1 (59,2 Å²) é maior que a média do fator de temperatura da Impα (43,3 Å²). A média do fator de temperatura dos resíduos 471-474 do peptídeo posicionados no sítio S₂ da Impα (49,9 Å², posições P1'-P4'), é também maior que a média da proteína. Os resíduos K471 e R472 (posições P1' e P2') apresentam os menores fatores de temperatura (42,6 e 42,6 Å², respectivamente).

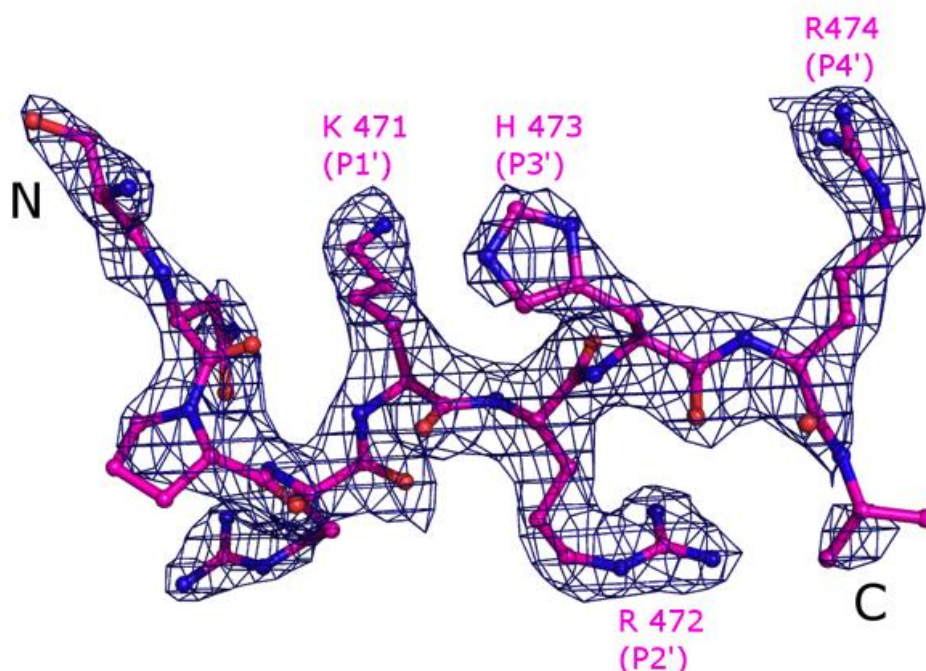


Figura 22 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. **A.** Peptídeo NLS da MLH1 ligado ao sítio secundário (S_2). A região do peptídeo que se liga no S_2 da $\text{Imp}\alpha$, região de P1'-P4', está indicado em rosa.

Pela estrutura cristalina do complexo $\text{Imp}\alpha/\text{MLH1NLS}$ foi possível identificar a ligação do peptídeo no sítio principal de ligação da $\text{Imp}\alpha$ com os resíduos de lisina, arginina e arginina nas posições P2, P3 e P5 (KRXR) respectivamente, de acordo com o consenso NLS monopartido KR/KXR/K para esse sítio. No sítio secundário de ligação da $\text{Imp}\alpha$, o peptídeo se ligou com os resíduos de lisina e arginina nas posições P1' e P2' (KR) respectivamente, também de acordo com o consenso NLS K/RK/R de ligação para esse sítio. As interações do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre a proteína e os peptídeos foram verificadas e são ilustradas na forma de diagrama, na **Figura 23** e nas **Tabelas 16 e 17**, tendo como referência o diagrama gerado pelo programa Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). Similarmente ao peptídeos PMS2, todos os resíduos que foram modelados na densidade eletrônica para o peptídeo MLH1 realizaram algum tipo de interação com os resíduos da $\text{Imp}\alpha$. Para o sítio principal, as cadeias laterais básicas de P3 e P5 foram acomodadas nos sulcos formados pelos triptofanos conservados 142, 184 e 231, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P1, P2, P3, P4 e P5 realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com os resíduos conservados da $\text{Imp}\alpha$ nesta região. Para o sítio secundário, a cadeia lateral básica de arginina (R) em P2' foi acomodada no sulco formado pelos triptofanos conservados 357 e 399, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P0', P1', P2' e P4' realizam interações

hidrofóbicas e contatos polares com cadeias laterais polares dos resíduos conservados da Imp α , nesta região.

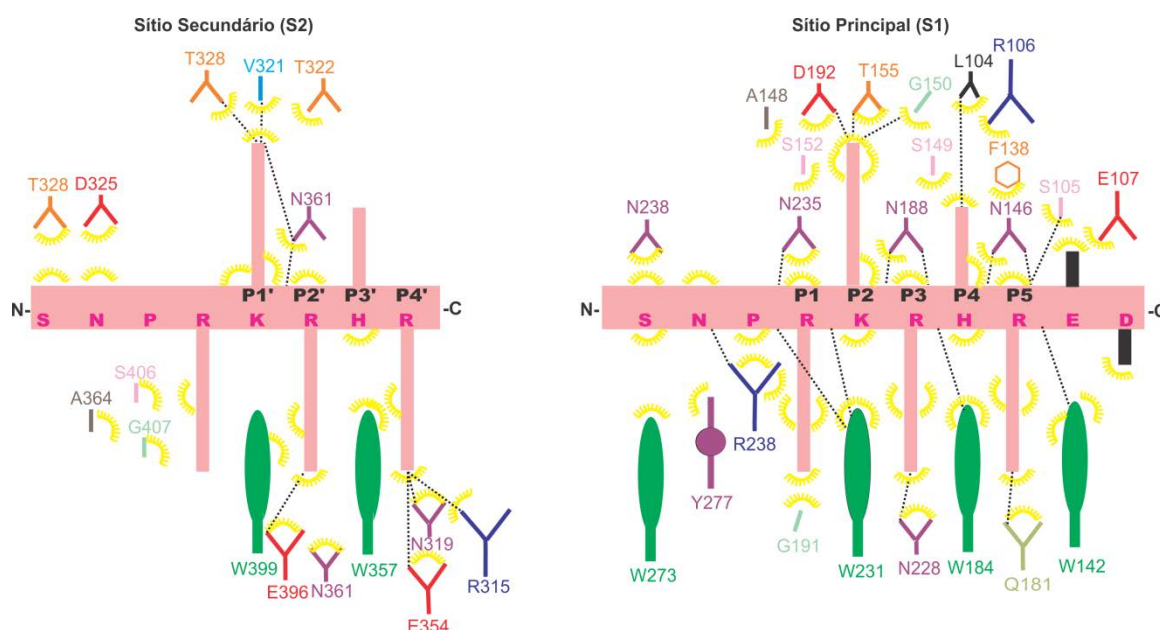


Figura 23 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS MLH1 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S₁) e sítio secundário de ligação (S₂). O peptídeo MLH1 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em rosa claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995).

4.7.3. Imp α /XPG1NLS

No complexo com o peptídeo XPG1 (¹⁰⁵⁴KTQ**K**RGITNTLEESS**LKR**KRLSD¹⁰⁷⁶) foi constatado a presença de densidade eletrônica na região do sítio de ligação principal (S₁), em que resíduos de 1070-1075 foram modelados com cadeia principal posicionada em configuração antiparalela em relação à Imp α (**Figura 24 e 25**). Foi encontrada também uma densidade eletrônica significativa no sítio secundário (S₂) da Imp α , em que resíduos de 1071-1074 foram modelados (**Figura 26**). A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo no sítio (S₁) de ligação é de 775,0 Å² e no sítio (S₂) de ligação é de 570,3 Å² (KRISSINEL, *et al.*, 2007).

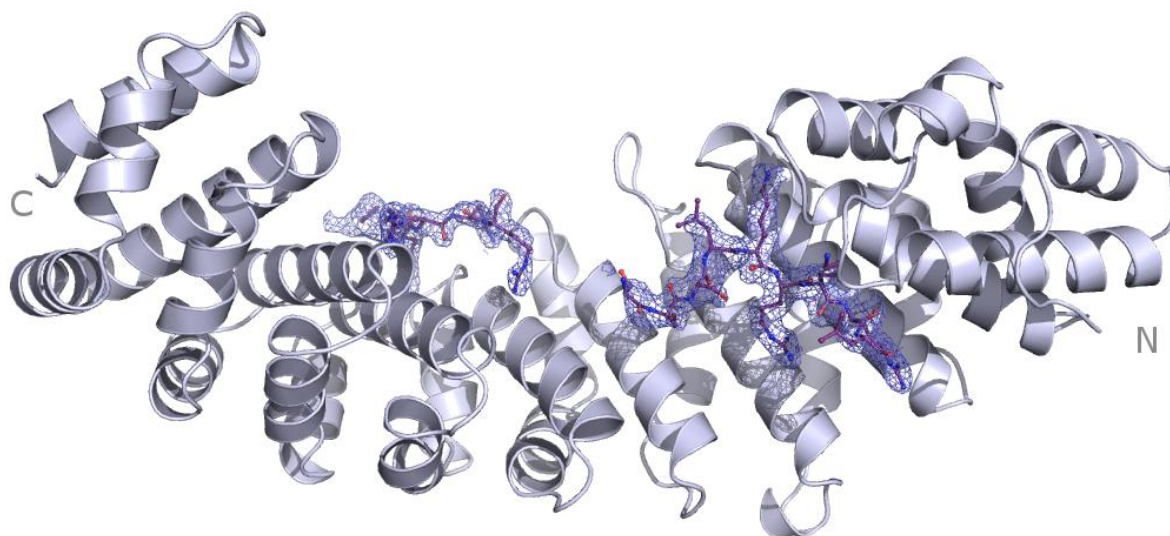


Figura 24 - Representação do complexo Impα/XPG1NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da XPG1 em *ball and sticks* (roxo). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$.

Uma avaliação preliminar das interações dos resíduos dos peptídeos com a Impα foi efetuada a partir da análise do fator de temperatura e encontra-se na **Tabela 9**. Para o sítio S_1 , a média do fator de temperatura do peptídeo NLS XPG1 em relação a Impα ($52,4 \text{ \AA}^2$) é um pouco maior que a média do fator de temperatura da Impα ($53,8 \text{ \AA}^2$), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 1070-1074 do peptídeo, posicionados no sítio S_1 de ligação da Impα (posições P1-P5) é $49,6 \text{ \AA}^2$. Os resíduos K1071 e R1074 (posições P2 e P5) possuem os menores fatores de temperatura ($41,6$ e $46,5 \text{ \AA}^2$, respectivamente).

Tabela 9 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS XPG1. Valores em preto referem-se ao sítio secundário de ligação S_2 e em azul referem-se ao sítio principal de ligação S_1 .

		Sequência	Fator de temperatura (Å ²)
		S ¹⁰⁶⁹	83,1
		L ¹⁰⁷⁰	67,3
Sítio Secundário (S ₂)	P1'	K ¹⁰⁷¹	54,5
	P2'	R ¹⁰⁷²	58,5
	P3'	K ¹⁰⁷³	57,3
	P4'	R ¹⁰⁷⁴	62,3
		S ¹⁰⁶⁹	70,1
Sítio Principal (S ₁)	P1	L ¹⁰⁷⁰	59,9
	P2	K ¹⁰⁷¹	41,6
	P3	R ¹⁰⁷²	47,1
	P4	K ¹⁰⁷³	52,8
	P5	R ¹⁰⁷⁴	46,5
		L ¹⁰⁷⁵	58,5

Fator de temperatura calculado com o programa CCP4 (BAILEY, 1994; WINN, *et al.*, 2011).

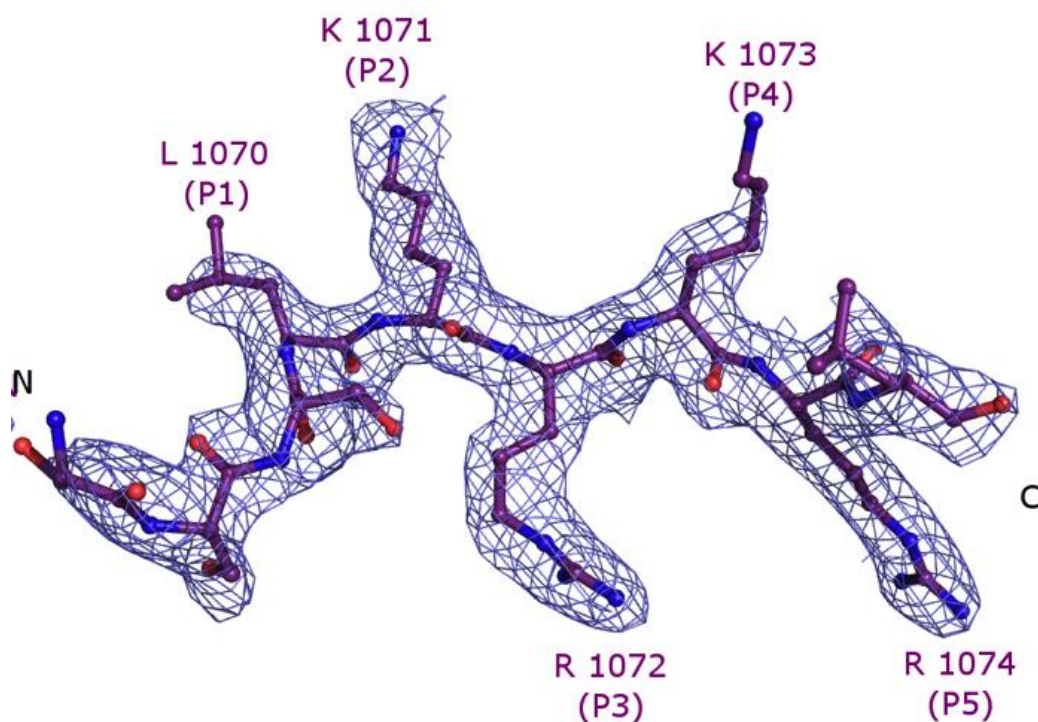


Figura 25 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. Peptídeo NLS da XPG1 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em roxo.

Para o sítio S_2 , a média do fator de temperatura do peptídeo NLS XPG1 em relação a Imp α ($52,4 \text{ \AA}^2$) é maior que a média do fator de temperatura da Imp α ($61,8 \text{ \AA}^2$), e também a média do fator de temperatura dos resíduos 1071-1074, posicionados no sítio S_2 de ligação da Imp α (posições P1'-P4'), é maior, com $58,2 \text{ \AA}^2$.

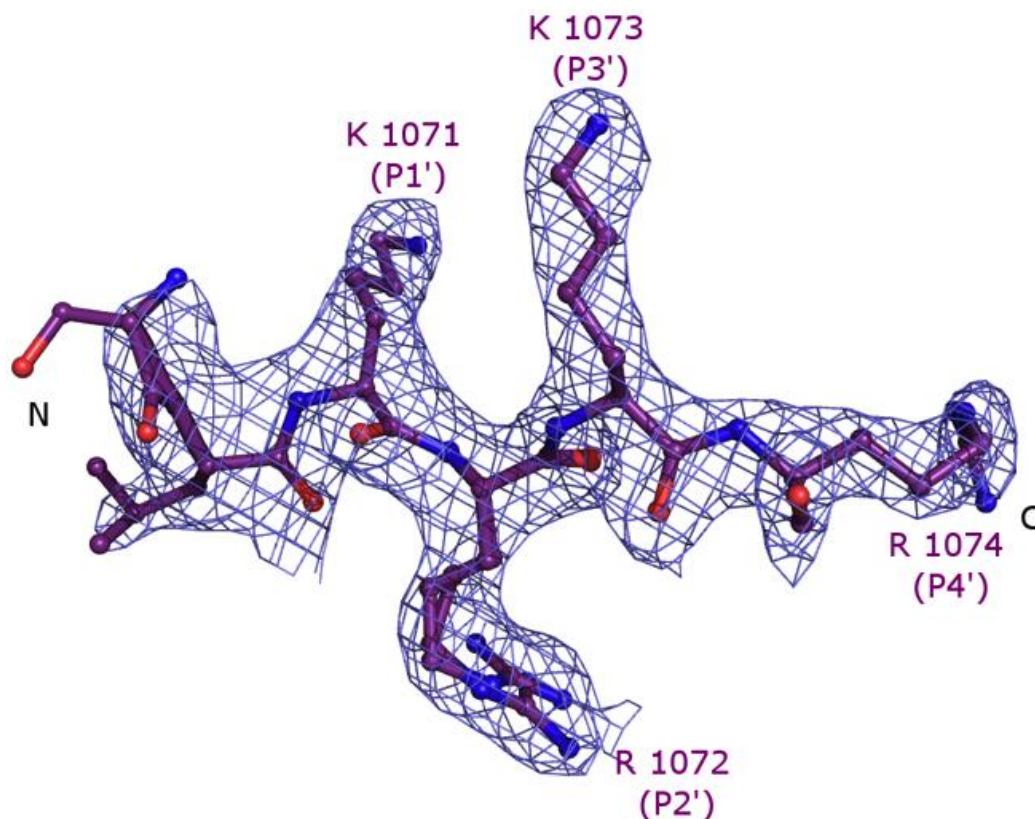


Figura 26 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$. Peptídeo NLS da XPG1 ligado ao sítio secundário (S_2). A região do peptídeo que se liga no S_2 da Imp α , região de P1'-P4', está indicado em roxo.

Pela estrutura cristalina do complexo Imp α /XPG1NLS foi possível identificar a ligação do peptídeo no sítio principal de ligação da Imp α com os resíduos de lisina, arginina e arginina nas posições P2, P3 e P5 (KRXR) respectivamente, de acordo com o consenso NLS monopartido KR/KXR/K para esse sítio. No sítio secundário de ligação da Imp α , o peptídeo se ligou com os resíduos de lisina e arginina nas posições P1' e P2' (KR) respectivamente, também de acordo com o consenso NLS K/RK/R de ligação. As interações do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre a proteína e os peptídeos foram verificadas e são ilustradas na forma de diagrama, na **Figura 27** e nas **Tabelas 16 e 17**, tendo como referência o diagrama gerado pelo programa Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). Igualmente às estruturas anteriores, todos os resíduos do peptídeo XPG1 modelados nas densidades eletrônicas localizadas nos sítios de reconhecimento de NLS, realizaram algum tipo de interação com os resíduos da Imp α . Para o sítio principal, as cadeias laterais básicas de P3 e P5 foram acomodadas nos sulcos formados pelos triptofanos conservados 142, 184 e 231, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P2, P3, P4 e P5 realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com os resíduos conservados da Imp α , nesta região. Para o sítio secundário, a cadeia lateral básica de arginina (R) em P2' foi acomodada no sulco formado pelos triptofanos

conservados 357 e 399, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P1', P2', P3' e P4' realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com cadeias laterais polares dos resíduos conservados da Imp α , nesta região.

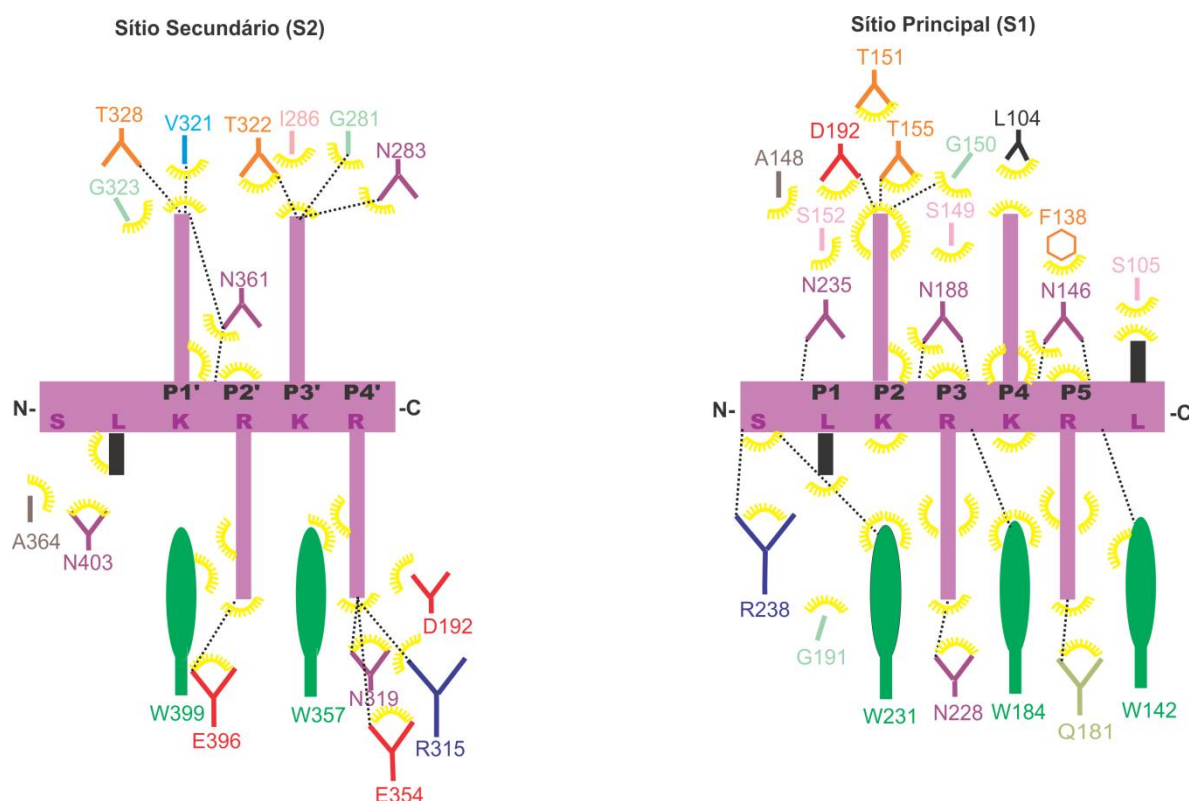


Figura 27 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeos NLS XPG1 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S₁) e sítio secundário de ligação (S₂). O peptídeo XPG1 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em roxo. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995).

4.7.4. Imp α /XPG2NLS

Na estrutura com o peptídeo XPG2 (¹¹⁶⁶VFGKKRRKLRRARGRKRKT¹¹⁸⁴) foi constatado a presença de duas densidades eletrônicas distintas, uma na região do sítio de ligação principal (S₁) e outra no sítio secundário (S₂) (**Figura 28**). Com base na densidade eletrônica obtida, na região do sítio principal da proteína, a modelagem do peptídeo mostra os resíduos de 1168-1176 (GKKRRKLRR), ligados à proteína em configuração antiparalela em relação a Imp α (**Figura 29**). No sítio secundário (S₂) da Imp α , os resíduos de 1162-1166 foram modelados com cadeia principal posicionada em configuração antiparalela em relação à Imp α (**Figura 30**). A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo no sítio (S₁) de ligação é de 666,7 Å² e no sítio (S₂) de ligação é de 530,4 Å² (KRISINEL, *et al.*, 2007).

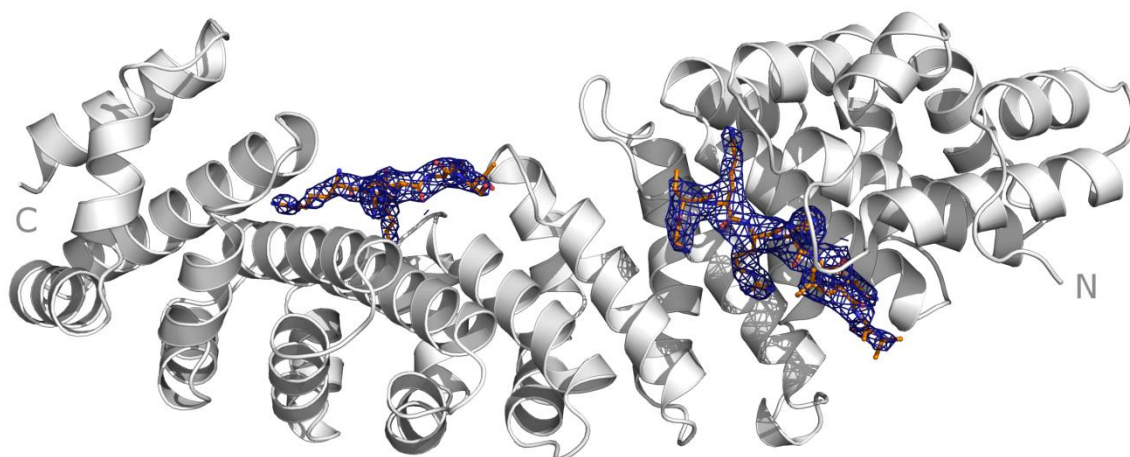


Figura 28 - Representação do complexo Imp α /XPG2NLS, em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da XPG2 em *ball and sticks* (laranja). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$.

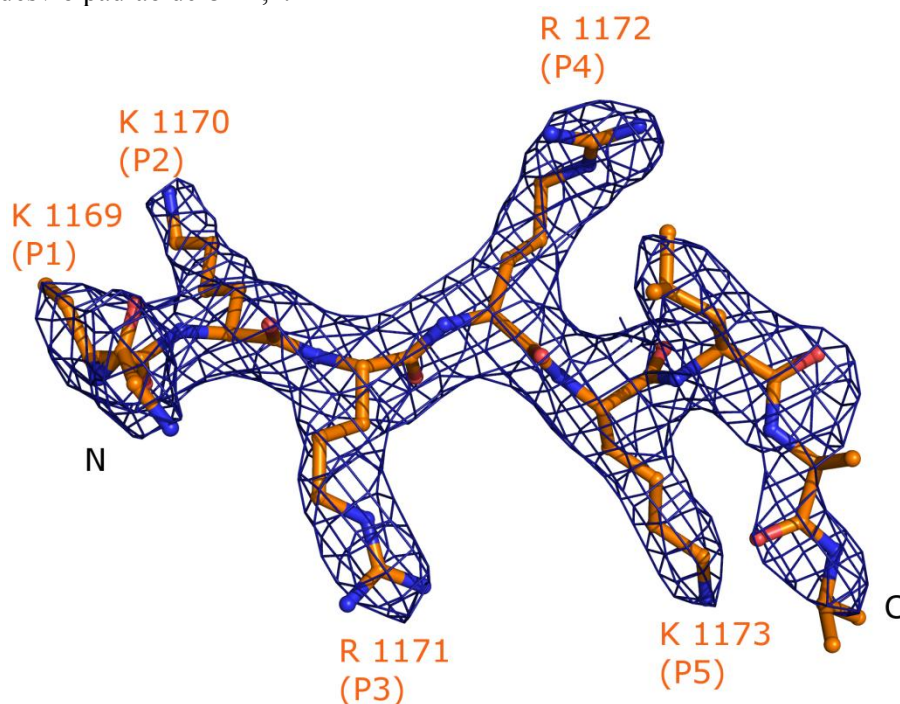


Figura 29 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$. Peptídeo NLS da XPG2 ligado ao sítio principal (S_1). A região do peptídeo que se liga no S_1 da Imp α , região de P1-P5, está indicado em laranja.

Uma avaliação das interações dos resíduos dos peptídeos com a Imp α foi efetuada a partir da análise do fator de temperatura e encontra-se na **Tabela 10**. Para o sítio S_1 , a média do fator de temperatura do peptídeo XPG2 NLS ($84,0 \text{ \AA}^2$) é um pouco maior do que a média dos fatores de temperatura da Imp α ($74,4 \text{ \AA}^2$), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 1169-1173 do peptídeo, posicionados no sítio S_1 de ligação da Imp α (posições P1-P5), é de $69,9 \text{ \AA}^2$. Os resíduos K1174 e K1171 (posições P2 e P5) possuem os menores fatores de temperatura ($64,9$ e $67,8 \text{ \AA}^2$, respectivamente).

Tabela 10 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS XPG2. Em preto são mostrados os valores referente ao sítio secundário de ligação S₂ e em azul os valores referentes ao sítio principal de ligação S₁.

		Sequência	Fator de temperatura (Å ²)
Sítio Secundário (S ₂)	P1' - P4'	R ¹¹⁸²	83,6
		K ¹¹⁸³	71,1
		R ¹¹⁸⁴	76,4
		K ¹¹⁸⁵	79,2
		T ¹¹⁸⁶	94,4
		G ¹¹⁶⁸	86,9
Sítio Principal (S ₁)	P1	K ¹¹⁶⁹	77,0
	P2	K ¹¹⁷⁰	64,9
	P3	R ¹¹⁷¹	68,4
	P4	R ¹¹⁷²	71,7
	P5	K ¹¹⁷³	67,8
		L ¹¹⁷⁴	75,6
		R ¹¹⁷⁵	89,9
		R ¹¹⁷⁶	95,7

Fator de temperatura calculado com o programa CCP4 (BAILEY, 1994; WINN, *et al.*, 2011).

Para o sítio S₂, a média do fator de temperatura do peptídeo XPG2NLS (80,3 Å²) em relação a média do fator de temperatura da Impα (77,3 Å²) é maior, também a média do fator de temperatura dos resíduos 1183-1186, posicionados no sítio S₂ de ligação da Impα (posições P1'-P4'), é maior, com 80,3 Å².

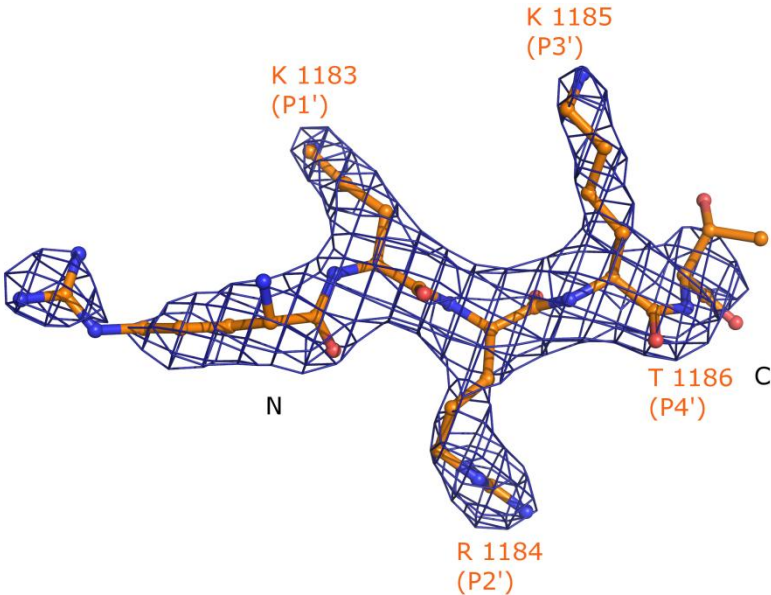


Figura 30 - Mapa de densidade eletrônica 2|F_{obs}|-|F_{calc}|, gerado com desvio padrão de σ=1,2. Peptídeo NLS da XPG2 ligado ao sítio secundário (S₂). A região do peptídeo que se liga no S₂ da Impα, região de P1'-P4', está indicado em laranja.

Pela estrutura cristalina do complexo Impα/XPG2NLS foi possível identificar a ligação do peptídeo no sítio principal de ligação da Impα com configuração antiparalela em

relação a Imp α , com os resíduos de lisina, arginina e lisina nas posições P2, P3 e P5 (KRXX) respectivamente, de acordo com o consenso NLS monopartido KR/KXR/K para esse sítio. No sítio secundário de ligação da Imp α , o peptídeo se ligou com os resíduos de lisina e arginina nas posições P1' e P2' (KR) respectivamente, também de acordo com o consenso NLS K/RK/R de ligação. As interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre a proteína e os peptídeos foram verificadas e são ilustradas na forma de diagrama na **Figura 31** e nas **Tabelas 16 e 17**, tendo como referência o diagrama gerado pelo programa Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995). Assim como em estruturas anteriores, todos os resíduos do peptídeo XPG2 modelados nas densidades eletrônicas realizaram algum tipo de interação com os resíduos da Imp α . Para o sítio principal, as cadeias laterais básicas de P3 e P5 foram acomodadas nos sulcos formados pelos triptofanos conservados 142, 184 e 231, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P2, P3, P4 e P5 realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com os resíduos conservados da Imp α , nesta região. Para o sítio secundário, a cadeia lateral básica de arginina (R) em P2' foi acomodada no sulco formado pelos triptofanos conservados 357 e 399, as cargas positivas das cadeias laterais longas em P0', P1', P2' e P3' realizam interações hidrofóbicas e contatos polares com cadeias laterais polares dos resíduos conservados da Imp α , nesta região.

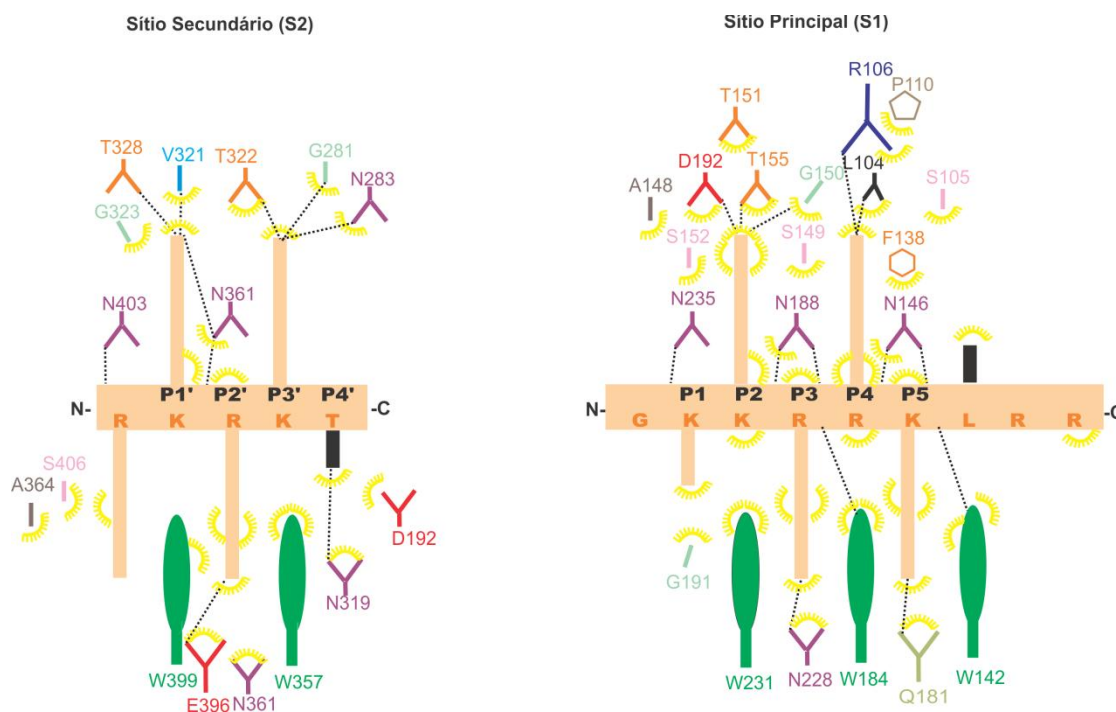


Figura 31 - Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeos NLS XPG2 com a Imp α nos dois sítios de ligação, sítio principal de ligação (S₁) e sítio secundário de ligação (S₂). O peptídeo XPG2 está indicado com a cadeia principal e as cadeias laterais, mostradas perpendiculares, em laranja claro. Tracejado indica contatos polares entre o peptídeo e a Imp α e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela. Figura construída com base no Ligplot (WALLACE, *et al.*, 1995).

4.8. COMPARAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A NLS da proteína SV40 foi a primeira a ser elucidada e desde então é utilizada como referência para os estudos envolvendo NLSs e a Imp α (FONTES, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2003a) e as NLSs das proteínas Ku70 e Ku80, são NLSs elucidadas de proteínas que também atuam no reparo de DNA (TAKEDA, *et al.*, 2011), dessa maneira, selecionadas para esta análise comparativa. Quando comparamos os valores de desvio r.m.s. obtidos da sobreposição dos átomos de C α equivalentes, referentes às regiões do sítio principal S₁ (P1-P5) e secundário S₂ (P1'-P4') dos peptídeos monopartidos resolvidos nesse trabalho, sobrepostos com as estruturas de peptídeos clássicos monopartidos das proteínas SV40, Ku70 e Ku80 elucidados previamente (**Tabela 11**), os resultados indicam pequenos valores de desvio r.m.s. para os peptídeos, tanto para o sítio principal como para o secundário.

Tabela 11 - Comparação após superposição dos átomos Ca dos peptídeos PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 com outros peptídeos monopartidos elucidados anteriormente.

		Desvio r.m.s. (Å)						
		*SV40		*Ku70		*Ku80		
		S ₂	S ₁	S ₂	S ₁	S ₂	S ₁	
Peptídeos	PMS2	Monopartido	-	0,23	-	0,36	-	0,22
	MLH1		0,38	0,18	-	0,29	-	0,21
	XPG1		0,12	0,11	-	0,24	-	0,14
	XPG2		0,53	0,09	-	0,10	-	0,11

*SV40T, código PDB 1Q1T; *Ku70, código PDB 3RZX; *Ku80, código PDB 3RZ9.

Esse resultado indica que a posição da cadeia principal desses peptídeos dentro dos sítios de ligação são semelhantes e confirmam a similaridade de ligação que ocorre entre os peptídeos cNLSs e o sítio de interação principal (S₁) e secundário (S₂) da Imp α (**Figura 32**).

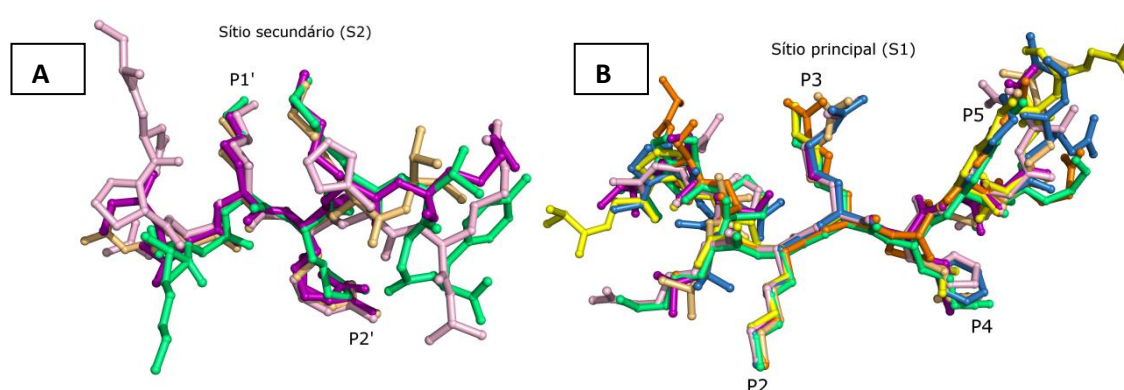


Figura 32 - Comparação dos peptídeos NLSs. **A.** Sobreposição do NLS SV40 (código PDB 1Q1T), elucidado previamente, com os elucidados neste trabalho MLH1, XPG1 e XPG2, no sítio secundário (S₂). **B.** Sobreposição dos NLSs SV40, Ku70 (código PDB 3RZX) e Ku80 (código PDB 3RZ9), elucidados previamente, com os elucidados neste trabalho PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2, no sítio principal (S₁). Os peptídeos estão destacados nas cores verde (SV40), laranja (Ku70), amarelo (Ku80), azul (PMS2), rosa (MLH1), roxo (XPG1) e laranja claro (XPG2) e foram sobrepostos usando a sobreposição dos átomos de C α dos peptídeos da região de P1-P5 e de P1'-P4'. Posições de ligação no sítio principal (P2-P5) e secundários (P1'-P2') são indicados ao longo da cadeia.

4.9. EXPERIMENTOS DE AFINIDADE: CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)

4.8.1. SV40NLS

Os ensaios de afinidade entre a proteína Imp α e o peptídeo SV40NLS, foram realizados em triplicata, com uma razão molar de 1:8 entre proteína (30 μ M) e o peptídeo (240 μ M). A interação entre a Imp α e o peptídeo SV40NLS, conforme demonstrado cristalograficamente por Fontes e colaboradores (FONTES, *et al.*, 2000), ocorreu em ambos sítos, principal (S₁) e secundário (S₂). Por isso, os dados dos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram ajustados para a estequiometria 1:2 (Imp α /SV40NLS). Os termogramas obtidos e os dados ajustados estão apresentados respectivamente na **Tabela 12** e na **Figura 33**.

Tabela 12 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de SV40NLS (240 μ M) em Imp α (30 μ M) à 20 °C. As constantes foram determinadas considerando-se os dois sítos de interação.

	Sítio Principal (S ₁)	Sítio secundário (S ₂)
K _d	0,73 $\pm$ 0,13 μ M	11,98 $\pm$ 2,21 μ M
Δ H	-3,98 $\pm$ 0,08 kcal/mol	-4,80 $\pm$ 0,42 kcal/mol
Δ S	14,5cal/mol/deg	6,16 cal/mol/deg

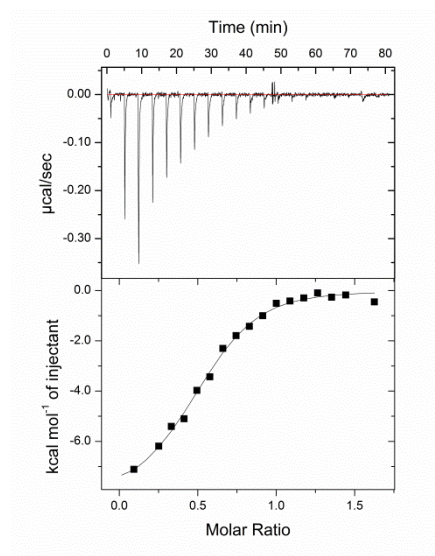


Figura 33 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /SV40NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da Imp α (30 μ M) com o peptídeo SV40NLS (240 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação, representada pela integração dos calores obtidos normalizados pela molaridade de SV40NLS (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). A figura foi gerada com o programa *Origin* (MicroCal).

Os resultados obtidos indicam uma alta afinidade do peptídeo SV40NLS pelo sítio principal da Imp α ($0,73 \pm 0,13 \mu\text{M}$), enquanto a afinidade pelo segundo sítio foi moderada ($11,98 \pm 2,21 \mu\text{M}$). O processo de formação do complexo Imp α /SV40NLS é favorável entalpicamente e entropicamente, pois foram observadas variações de entalpias (ΔH) negativas em ambos os sítios ($-3,98 \pm 0,08$ e $-4,80 \pm 0,42 \text{ kcal/mol}$, S_1 e S_2 respectivamente), indicativo de reação exotérmica (liberação de calor) quando da formação do complexo, como também houve variação de entropia (ΔS) positiva ($14,5$ e $6,16 \text{ cal/mol/deg}$, S_1 e S_2 respectivamente). Esse comportamento é característico de formação de complexos por ligações de hidrogênio, van der Waals e/ou interações eletrostáticas ($\Delta H < 0$), bem como por interações hidrofóbicas ($\Delta S > 0$).

4.8.2. PMS2NLS

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) entre a Imp α e o PMS2NLS foram realizados em triplicata, com uma razão molar de 1:8 (Imp α ($30 \mu\text{M}$):PMS2NLS ($240 \mu\text{M}$)). O perfil calorimétrico das titulações mostrou que a formação do complexo Imp α :PMS2NLS é um processo favorável entalpicamente (entalpia negativa, processo exotérmico), caracterizado por uma estequiometria de 1:1 (**Figura 34**).

A Imp α apresenta dois sítios de ligação (principal e secundário), porém neste caso, o peptídeo PMS2NLS, de acordo com a estrutura cristalográfica obtida, ligou-se à somente um sítio de interação, o principal (S_1). Sendo assim, os dados foram processados considerando um modelo de interação que indica um sítio de ocupação (1:1). O ajuste dos dados à isoterma gerou as constantes cinéticas e termodinâmicas descritas na **Tabela 13**, indicando afinidade moderada-alta ($1,95 \pm 0,20 \mu\text{M}$) e variações de entalpia negativa ($\Delta H = -5,33 \pm 0,15 \text{ kcal/mol}$) e entropia positiva ($\Delta S = 7,94 \text{ cal/mol/deg}$), indicativo de ocorrência de reações de ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, tal como na SV40.

Tabela 13 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de PMS2NLS ($240 \mu\text{M}$) em Imp α ($30 \mu\text{M}$) à 20°C .

Constantes termodinâmicas	Análise 1*
K_d	$1,95 \pm 0,20 \mu\text{M}$
ΔH	$-5,33 \pm 0,15 \text{ kcal/mol}$
ΔS	$7,94 \text{ cal/mol/deg}$

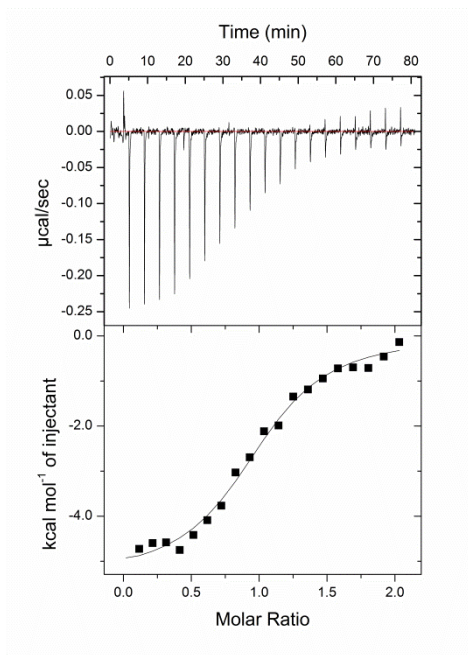


Figura 34 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /PMS2NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2NLS (240 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação, representada pelos dados integrados (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal).

4.8.3. Mutantes PMS2 K577N e PMS2 R578N NLSs

Foram realizados com os peptídeos mutantes PMS2 K577N e PMS2 R578N ensaios de afinidade entre a proteína Imp α , nas razões molar de 1:8, 1:15, 1:25, 1:50 (Imp α :PMS2 K577N) e 1:8, 1:15 (Imp α :PMS2 R578N). Com base nos termogramas obtidos, não foi verificada interação entre a proteína e os peptídeos, sendo que os calores observados nos termogramas são relativos ao calor de diluição dos peptídeos (**Figura 35**).

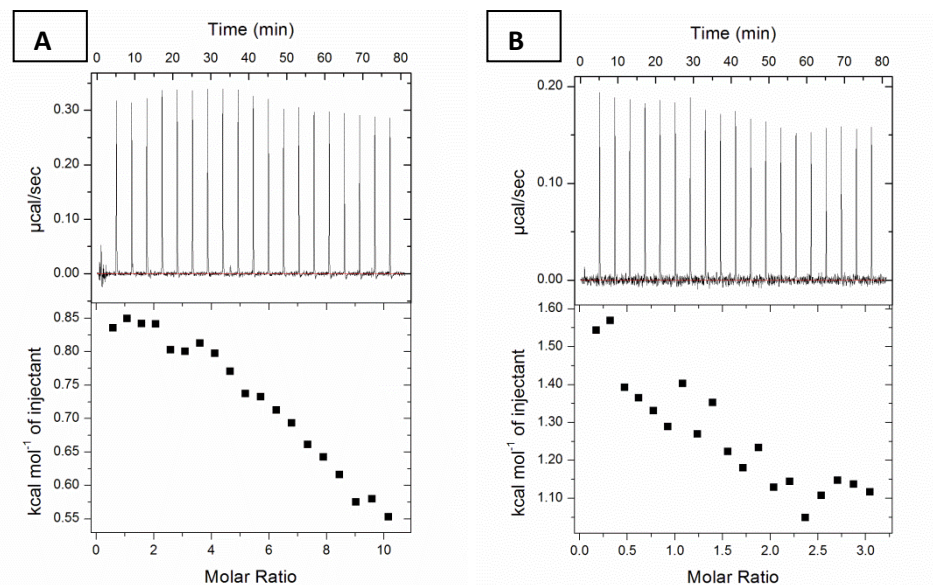


Figura 35 - Termogramas de calorimetria de titulação isotérmica da titulação da Imp α com os peptídeos PMS2 K577N NLS e PMS2 R578N NLS, realizados à 20°C. Os painéis superiores representam os termogramas relativos às titulações da Imp α com os peptídeos mencionados, enquanto os painéis inferiores representam as isothermas de ligação (calor absorvido em cada injeção normalizado pela razão molar das espécies envolvidas). **A.** Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2 K577N NLS (1500 μ M). **B.** Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo PMS2 R578N NLS (450 μ M). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal).

4.8.4. MLH1

Os ensaios de afinidade entre a proteína Imp α e o peptídeo MLH1NLS foram realizados em uma razão molar de 1:15 entre proteína (30 μ M) e o peptídeo (450 μ M). Os dados cristalográficos mostraram que a MLH1NLS apresenta características de uma NLS monopartida que se liga em ambos sítios, principal (S₁) e secundário (S₂). Entretanto, apesar de os dados de calorimetria isotérmica apresentarem um termograma característico de um sistema com 2 sítios com diferentes afinidades e entalpias de ligação (FREYER, *et al.*, 2008), não foi possível fazer, até o presente, o ajuste dos dados adequadamente com a metodologia dos polinômios de ligação, tampouco com os programas disponíveis (*Origin*, *Sedphat* e *Chasm*) (HOUTMAN, *et al.*, 2007; LE, *et al.*, 2013).

Por isso, foi feito apenas um ajuste preliminar que considera apenas um sítio de ligação, sendo as constantes cinéticas e termodinâmicas descritas abaixo (**Tabela 14 e Figura 36**).

Tabela 14 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de MLH1NLS (30 μM) em Imp α (300 μM) à 20°C, considerando apenas 1 sítio de ligação.

Constantes termodinâmicas	Sítio Principal (S ₁)
n	1,42 $\pm$ 0.12
K _d	5.10 $\pm$ 2.23 μM
ΔH	-6,76 $\pm$ 0.81 kcal/mol
ΔS	1.16 cal/mol/deg

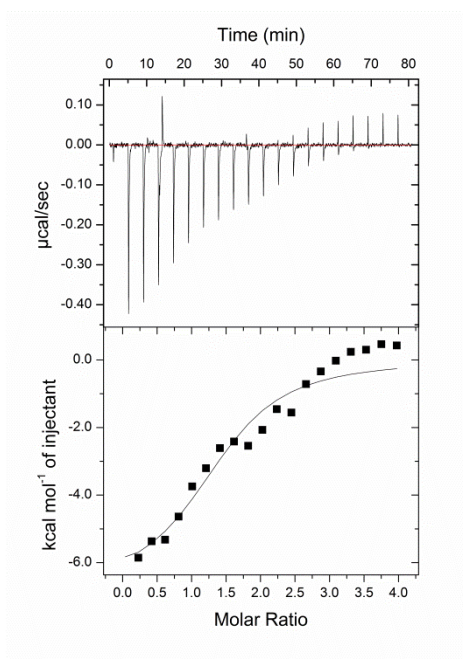


Figura 36 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α /MLH1NLS. O painel superior é referente à titulação da proteína Imp α (30 μM) com o peptídeo MLH1NLS (450 μM) à 20 °C, enquanto o painel inferior mostra a isoterma de ligação (quadrados pretos) e o ajuste preliminar dos dados (linha contínua). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal).

Nota-se pela curva calculada, com base nas constantes termodinâmicas (**Figura 36**), que o ajuste apresentou maiores desvios nas isotermas em relação aos demais experimentos, uma vez que não foi utilizado o modelo matemático que melhor descreve a formação do complexo Imp α /MLH1NLS, segundo os dados estruturais. Entretanto, por estes dados preliminares, nota-se pela análise global que a interação é entálpica e entropicamente favorável (entalpia negativa e entropia positiva) e que o sistema possui afinidade de moderada a alta. Estes dados sugerem a interação entre as moléculas tanto por ligações de hidrogênio quanto por interações hidrofóbicas, como já demonstrado nos dados cristalográficos.

4.8.5. Mutantes MLH1 K471N e MLH1 R472N NLSs

Para os peptídeos mutantes MLH1 K471N e MLH1 R472N, os ensaios de afinidade entre a proteína Imp α e os peptídeos, ambos foram realizados com uma razão molar de 1:20 entre a proteína e o peptídeo, respectivamente. Porém, com base nos termogramas obtidos (**Figura 37**), não foi possível visualizar interação entre a proteína e os peptídeos. Com isso sugerimos que a afinidade inexistente ou está abaixo dos limites considerados aceitos para sistemas com baixa afinidade, sendo os calores observados atribuídos apenas ao calor de diluição dos peptídeos.

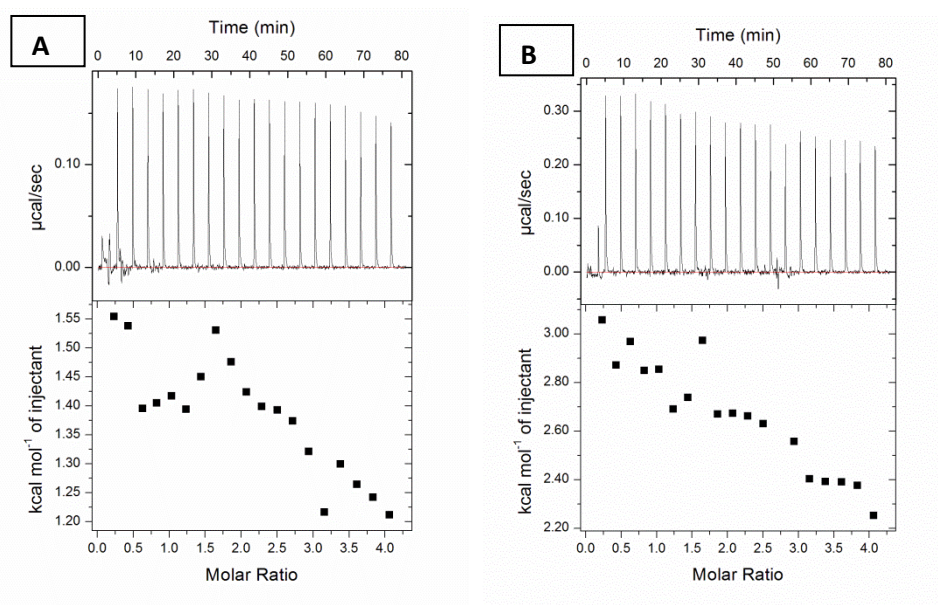


Figura 37 - Termogramas de calorimetria de titulação isotérmica da titulação da Imp α com os peptídeos MLH1 K471N NLS e MLH1 R472N NLS, realizados à 20°C. Os painéis superiores representam os termogramas relativos às titulações da Imp α com os peptídeos mencionados, enquanto os painéis inferiores representam as isothermas de ligação (calor absorvido em cada injeção normalizado pela razão molar das espécies envolvidas). **A.** Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo MLH1 K471N NLS (600 μ M). **B.** Termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo MLH1 R472N NLS (600 μ M). Imagem gerada com o programa *Origin* (MicroCal).

4.8.6. XPG1

Os ensaios de calorimetria entre a proteína Imp α e o peptídeo XPG1NLS foram realizados com uma razão molar de 1:10 (proteína:peptídeo). As titulações foram realizadas em triplicatas e seu termograma está representado na **Figura 38**.

O peptídeo XPG1NLS apresenta características de uma NLS monopartida, e pela estrutura cristalográfica ligou-se em ambos sítios de interação da Imp α , sítios principal (S₁) e secundário (S₂). Por isso, os dados foram analisados considerando-se a estequiometria de 2 ligantes para cada Imp α , sendo obtidas as constantes termodinâmicas e cinéticas descritas na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Dados termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica da titulação de XPG1NLS (30 μ M) em Imp α (300 μ M) à 20°C.

Constantes termodinâmicas	Sítio Principal (S ₁)	Sítio secundário (S ₂)
n	0,62	0,62
K_d	0,46 $\pm$ 0,05 μ M	3,36 $\pm$ 0,5 μ M
ΔH	-3.15 $\pm$ 0.12 kcal/mol	3.79 $\pm$ 0.15 kcal/mol
ΔS	18,25 cal/mol/deg	37,97 cal/mol/deg

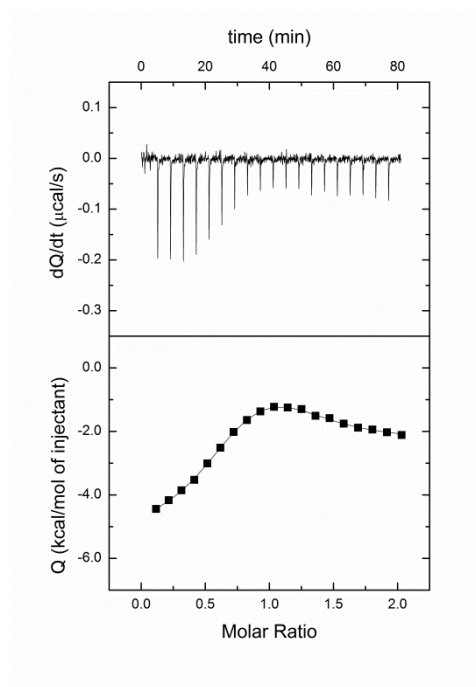


Figura 38 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α :XPG1NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μ M) com o peptídeo XPG1NLS (300 μ M) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação representada pelos calores de reação integrados e normalizados pela molaridade de XPG1 (quadrados pretos) e a isoterma de ajuste dos dados (linha contínua). Imagem gerada pelo programa *Origin* (MicroCal).

A análise dos dados deste peptídeo foi realizada diferentemente das demais apresentadas, pois as concentrações não puderam ser ajustadas para que as estequiometrias de cada sítio fosse de 1:1. Com isso, elas apresentaram valores de 0,62 e foram fixadas nestes valores quando da minimização dos erros dos demais parâmetros. Tal comportamento decorre da imprecisão das concentrações das moléculas titulada ou titulante ou mesmo quando parte

de proteína, em nosso caso a Imp α está degradada ou inativa. Mesmo assim, foi possível determinar as constantes de dissociação (K_d) que mostraram alta afinidade da XPG1 pelo sítio principal e afinidade moderada pelo sítio secundário. A ligação da XPG1 no sítio principal é favorecida entálpica e entropicamente ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$), enquanto no sítio secundário a reação é entálpicamente desfavorável ($\Delta H > 0$) e entropicamente favorável ($\Delta S > 0$). Estes valores nos sugerem que a ligação da XPG1 no sítio principal é favorecida tanto por ligações de hidrogênio, van der Waals e interações eletrostáticas quanto por interações hidrofóbicas, enquanto no sítio secundário as ligações que desempenham papel fundamental são as interações hidrofóbicas.

4.8.7. XPG2

Os ensaios de afinidade entre a proteína Imp α e o peptídeo XPG2NLS, foram realizados em uma razão molar de 1:15 entre proteína (30 μ M) e o peptídeo (450 μ M). De acordo com a estrutura cristalográfica, este peptídeo apresenta características de um peptídeo monopartido com ligação em ambos sítios, principal (S1) e secundário (S2). Entretanto, nos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, os termogramas não apresentam características de sistema com afinidade moderada (**Figura 39**). Sendo necessária, por isso, a realização de novos experimentos com este peptídeo.

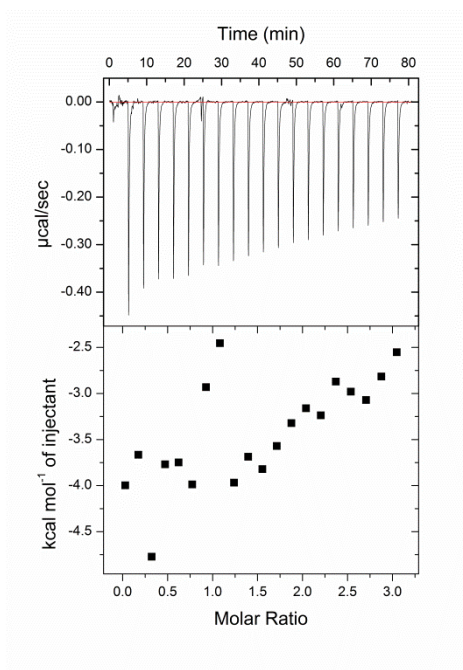


Figura 39 - Termograma de titulação isotérmica do complexo Imp α :XPG2NLS. O painel superior apresenta o termograma referente à titulação da proteína Imp α (30 μM) com o peptídeo XPG2NLS (450 μM) à 20°C. O painel inferior apresenta a isoterma de ligação representada pelos calores de reação integrados e normalizados pela molaridade de XPG2 (quadrados pretos). Imagem gerada pelo programa *Origin* (MicroCal).

5. DISCUSSÃO

5.1. INTERAÇÕES COMUNS AOS MODELOS OBTIDOS ENTRE OS PEPTÍDEOS E A Imp α

Foram verificadas interações do tipo hidrofóbicas e contatos polares nos complexos PMS2NLS:Imp α , MLH1NLS:Imp α , XPG1NLS:Imp α e XPG2NLS:Imp α entre a proteína e os peptídeos, que são mostrados na forma de diagramas nas **Figuras 19, 23, 27 e 31**, tendo como referência o diagrama gerado pelo programa *Ligplot* (WALLACE, *et al.*, 1995).

Buscando características em comum do reconhecimento de NLSs pela Imp α , para o sítio principal, merecem destaque os resíduos da Imp α que apresentaram interações hidrofóbicas com os peptídeos NLSs comuns aos quatro modelos: L¹⁰⁴, S¹⁰⁵, W¹⁴², N¹⁴⁶, A¹⁴⁸, S¹⁴⁹, G¹⁵⁰, T¹⁵⁵, Q¹⁸¹, W¹⁸⁴, N¹⁸⁸, G¹⁹¹, D¹⁹², N²²⁸ e W²³¹ (**Tabela 16**). Em relação aos contatos polares, foram destacados os cinco resíduos da Imp α : W¹⁴², N¹⁴⁶, W¹⁸⁴, N¹⁸⁸ e N²³⁵, que apresentaram ligações com a cadeia principal e os quatro resíduos G¹⁵⁰, T¹⁵⁵, D¹⁹² e N²²⁸ que apresentaram ligações com as cadeias laterais dos resíduos presentes nas sequências dos peptídeos NLSs (**Tabela 16**).

Para o sítio secundário, com exceção do complexo PMS2NLS:Imp α que não realizou interações nesse sítio, os complexos MLH1NLS:Imp α , XPG1NLS:Imp α e XPG2NLS:Imp α apresentaram densidade eletrônica para os peptídeos. Os resíduos presentes na Imp α comuns aos modelos foram N³¹⁹, V³¹², T³²², W³⁵⁷, N³⁶¹, A³⁶⁴, E³⁹⁶, W³⁹⁹, os quais apresentaram interações hidrofóbicas com os peptídeos NLSs (**Tabela 16**). Em relação aos contatos polares, nos resíduos comuns aos modelos, o N³⁶¹ realiza ligação com a cadeia principal e outros cinco resíduos (N³¹⁹, V³²¹, W³²⁸, N³⁶¹ e E³⁹⁶) realizam ligações com as cadeias laterais dos resíduos presentes nas sequências dos peptídeos NLSs (**Tabela 17**).

Esses resíduos descritos fazem parte do arranjo Trp-Asn (W-N) cercados por resíduos ácidos, essenciais para o reconhecimento e ligação dos sítios principal e secundário presentes na Imp α pelas proteínas que serão transportadas para o núcleo pela via clássica de importação nuclear (FONTES, *et al.*, 2000). As informações obtidas confirmam a importância dos resíduos destacados como essenciais para o reconhecimento de NLSs pela Imp α .

Tabela 16 - Interações hidrofóbicas entre os diferentes peptídeos NLS e a Imp α nos sítios de ligação principal (S₁), em azul, e secundário (S₂), em preto. Em cor vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo	PMS2NLS:Imp α	MLH1NLS:Imp α	XPG1NLS:Imp α	XPG2NLS:Imp α
P'3'		S ⁴⁶⁷ :T ³²⁴		
P'2'		N ⁴⁶⁸ :D ³²⁵		
P'1'		N ⁴⁶⁸ :A ³⁶⁴		
P0'		P ⁴⁶⁹	S ¹⁰⁶⁹	
		R ⁴⁷⁰ :A ³⁶⁴	L ¹⁰⁷⁰ :A ³⁶⁴	R ¹¹⁸² :A ³⁶⁴
		R ⁴⁷⁰ :S ⁴⁰⁶	L ¹⁰⁷⁰ :N ⁴⁰³	R ¹¹⁸² :S ⁴⁰⁶
		R ⁴⁷⁰ :G ⁴⁰⁷		
Sítio Secundário (S ₂)	P1'	K ⁴⁷¹ :V ³²¹	K ¹⁰⁷¹ :V ³²¹	K ¹¹⁸³ :V ³²¹
		K ⁴⁷¹ :T ³²²	K ¹⁰⁷¹ :T ³²²	K ¹¹⁸³ :T ³²²
		K ⁴⁷¹ :T ³²⁸	K ¹⁰⁷¹ :G ³²³	K ¹¹⁸³ :G ³²³
		K ⁴⁷¹ :N ³⁶¹	K ¹⁰⁷¹ :N ³⁶¹	K ¹¹⁸³ :N ³⁶¹
	P2'	R ⁴⁷² :N ³⁶¹	R ¹⁰⁷² :N ³⁶¹	R ¹¹⁸⁴ :W ³⁵⁷
		R ⁴⁷² :E ³⁹⁶	R ¹⁰⁷² :E ³⁹⁶	R ¹¹⁸⁴ :N ³⁶¹
		R ⁴⁷² :W ³⁹⁹	R ¹⁰⁷² :W ³⁹⁹	R ¹¹⁸⁴ :E ³⁹⁶
	P3'	H ⁴⁷³ :W ³⁵⁷	K ¹⁰⁷³ :G ²⁸¹	R ¹¹⁸⁴ :W ³⁹⁹
			K ¹⁰⁷³ :N ²⁸³	K ¹¹⁸⁵ :G ²⁸¹
			K ¹⁰⁷³ :I ²⁸⁶	K ¹¹⁸⁵ :N ²⁸³
			K ¹⁰⁷³ :T ³²²	K ¹¹⁸⁵ :T ³²²
	P4'	R ⁴⁷⁴ :R ³¹⁵	R ¹⁰⁷⁴ :D ²⁸⁰	T ¹¹⁸⁶ :D ²⁸⁰
		R ⁴⁷⁴ :N ³¹⁹	R ¹⁰⁷⁴ :R ³¹⁵	
		R ⁴⁷⁴ :E ³⁵⁴	R ¹⁰⁷⁴ :N ³¹⁹	T ¹¹⁸⁶ :N ³¹⁹
		R ⁴⁷⁴ :W ³⁵⁷	R ¹⁰⁷⁴ :E ³⁵⁴	T ¹¹⁸⁶ :W ³⁵⁷
	P'2	S ⁴⁶⁷ :N ²³⁸		
		S ⁴⁶⁷ :W ²⁷³		
		S ⁴⁶⁷ :Y ²⁷⁷		
	P'1	P ⁵⁷⁴ :W ²⁷³		
		P ⁵⁷⁴ :Y ²⁷⁷		
		P ⁵⁷⁴ :T ⁴⁷³		
	P0	N ⁵⁷⁵ :R ²³⁸	P ⁴⁶⁹ :R ²³⁸	S ¹⁰⁶⁹ :R ²³⁸
		T ⁵⁷⁶ :G ¹⁹¹	R ⁴⁷⁰ :G ¹⁹¹	L ¹⁰⁷⁰ :G ¹⁹¹
		T ⁵⁷⁶ :W ²³¹	R ⁴⁷⁰ :W ²³¹	L ¹⁰⁷⁰ :W ²³¹
		T ⁵⁷⁶ :R ²³⁸	R ⁴⁷⁰ :R ²³⁸	L ¹⁰⁷⁰ :R ²³⁸
			R ⁴⁷⁰ :N ²³⁵	
Sítio Principal (S ₁)	P2	K ⁵⁷⁷ :A ¹⁴⁸	K ⁴⁷¹ :A ¹⁴⁸	K ¹⁰⁷¹ :A ¹⁴⁸
		K ⁵⁷⁷ :S ¹⁴⁹	K ⁴⁷¹ :S ¹⁴⁹	K ¹⁰⁷¹ :S ¹⁴⁹
		K ⁵⁷⁷ :G ¹⁵⁰	K ⁴⁷¹ :G ¹⁵⁰	K ¹⁰⁷¹ :G ¹⁵⁰
		K ⁵⁷⁷ :T ¹⁵¹	K ⁴⁷¹ :T ¹⁵¹	K ¹⁰⁷¹ :T ¹⁵¹
		K ⁵⁷⁷ :S ¹⁵²	K ⁴⁷¹ :S ¹⁵²	
		K ⁵⁷⁷ :T ¹⁵⁵	K ⁴⁷¹ :T ¹⁵⁵	K ¹⁰⁷¹ :T ¹⁵⁵
		K ⁵⁷⁷ :N ¹⁸⁸	K ⁴⁷¹ :N ¹⁸⁸	K ¹⁰⁷¹ :N ¹⁸⁸
		K ⁵⁷⁷ :D ¹⁹²	K ⁴⁷¹ :D ¹⁹²	K ¹⁰⁷¹ :D ¹⁹²
	P3	R ⁵⁷⁸ :S ¹⁴⁹	R ⁴⁷² :S ¹⁴⁹	R ¹⁰⁷² :S ¹⁴⁹
		R ⁵⁷⁸ :W ¹⁸⁴	R ⁴⁷² :W ¹⁸⁴	R ¹⁰⁷² :W ¹⁸⁴
		R ⁵⁷⁸ :N ¹⁸⁸	R ⁴⁷² :N ¹⁸⁸	R ¹⁰⁷² :N ¹⁸⁸
		R ⁵⁷⁸ :N ²²⁸	R ⁴⁷² :N ²²⁸	R ¹⁰⁷² :N ²²⁸
		R ⁵⁷⁸ :W ²³¹	R ⁴⁷² :W ²³¹	R ¹⁰⁷² :W ²³¹
	P4	F ⁵⁷⁹ :L ¹⁰⁴	H ⁴⁷³ :L ¹⁰⁴	K ¹⁰⁷³ :L ¹⁰⁴
		F ⁵⁷⁹ :R ¹⁰⁶	H ⁴⁷³ :S ¹⁰⁵	
		F ⁵⁷⁹ :P ¹¹⁰	H ⁴⁷³ :R ¹⁰⁶	
		F ⁵⁷⁹ :N ¹⁴⁶	H ⁴⁷³ :N ¹⁴⁶	K ¹⁰⁷³ :N ¹⁴⁶
		F ⁵⁷⁹ :S ¹⁴⁹	H ⁴⁷³ :S ¹⁴⁹	K ¹⁰⁷³ :S ¹⁴⁹
		F ⁵⁷⁹ :W ¹⁸⁴	H ⁴⁷³ :W ¹⁸⁴	K ¹⁰⁷³ :W ¹⁸⁴
			R ⁴⁷⁴ :F ¹³⁸	R ¹⁰⁷⁴ :F ¹³⁸
		K ⁵⁸⁰ :W ¹⁴²	R ⁴⁷⁴ :W ¹⁴²	R ¹⁰⁷⁴ :W ¹⁴²
		K ⁵⁸⁰ :N ¹⁴⁶	R ⁴⁷⁴ :N ¹⁴⁶	R ¹⁰⁷⁴ :N ¹⁴⁶
		K ⁵⁸⁰ :Q ¹⁸¹	R ⁴⁷⁴ :Q ¹⁸¹	R ¹⁰⁷⁴ :Q ¹⁸¹
		K ⁵⁸⁰ :W ¹⁸⁴	R ⁴⁷⁴ :W ¹⁸⁴	R ¹⁰⁷⁴ :W ¹⁸⁴
	P6	K ⁵⁸¹ :E ¹⁰⁷	E ⁴⁸² :E ¹⁰⁷	L ¹⁰⁷⁵ :S ¹⁰⁵
		K ⁵⁸¹ :S ¹⁰⁵	E ⁴⁸² :S ¹⁰⁵	L ¹⁰⁷⁵ :S ¹⁰⁵
	P7	E ⁵⁸² :W ¹⁴²	D ⁴⁸¹ :W ¹⁴²	
	P8	E ⁵⁸³ :W ¹⁴²		

Tabela 17 - Contatos polares entre as cadeias principal e lateral dos peptídeos NLSs com a Imp α nos sítios de ligação principal (S₁), destacados em azul e secundário (S₂), destacados em preto. Em verde foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo		PMS2NLS:Imp α		MLH1NLS:Imp α		XPG1NLS:Imp α		XPG2NLS:Imp α	
Cadeia do ligante		Principal	Lateral	Principal	Lateral	Principal	Lateral	Principal	Lateral
Sítio Secundário (S ₂)	P0'							K ¹¹⁸² :N ⁴⁰³	
	P1'				K ⁴⁷¹ :V ³²¹ K ⁴⁷¹ :T ³²⁸ K ⁴⁷¹ :N ³⁶¹		K ¹⁰⁷¹ :V ³²¹ K ¹⁰⁷¹ :T ³²⁸ K ¹⁰⁷¹ :N ³⁶¹		K ¹¹⁸³ :V ³²¹ K ¹¹⁸³ :T ³²⁸ K ¹¹⁸³ :N ³⁶¹
	P2'			R ⁴⁷² :W ³⁵⁷ R ⁴⁷² :N ³⁶¹	R ⁴⁷² :E ³⁹⁶	R ¹⁰⁷² :N ³⁶¹	R ¹⁰⁷² :E ³⁹⁶	R ¹¹⁸⁴ :N ³⁶¹	R ¹¹⁸⁴ :E ³⁹⁶
	P3'						K ¹⁰⁷³ :G ²⁸¹ K ¹⁰⁷³ :N ²⁸³ K ¹⁰⁷³ :T ³²²		K ¹¹⁸⁵ :G ²⁸¹ K ¹¹⁸⁵ :N ²⁸³ K ¹¹⁸⁵ :T ³²²
	P4'				R ⁴⁷⁴ :R ³¹⁵ R ⁴⁷⁴ :N ³¹⁹ R ⁴⁷⁴ :E ³⁵⁴		R ¹⁰⁷⁴ :R ³¹⁵ R ¹⁰⁷⁴ :N ³¹⁹ R ¹⁰⁷⁴ :E ³⁵⁴		T ¹¹⁸⁶ :N ³¹⁹
		P ⁵⁷⁴ :T ⁴⁷³	P ⁵⁷⁴ :T ⁴⁷³						
Sítio Principal (S ₁)				N ⁴⁶⁸ :R ²³⁸					
		N ⁵⁷⁵ :R ²³⁸				S ¹⁰⁶⁹ :R ²³⁸ S ¹⁰⁶⁹ :W ²³¹			
	P1	T ⁵⁷⁶ :N ²³⁵		P ⁴⁶⁹ :W ²³¹ R ⁴⁷⁰ :N ²³⁵		L ¹⁰⁷⁰ :N ²³⁵		K ¹¹⁶⁹ :N ²³⁵	
	P2		T ⁵⁷⁶ :G ¹⁹¹ K ⁵⁷⁷ :G ¹⁵⁰ K ⁵⁷⁷ :T ¹⁵⁵ K ⁵⁷⁷ :D ¹⁹²		K ⁴⁷¹ :G ¹⁵⁰ K ⁴⁷¹ :T ¹⁵⁵ K ⁴⁷¹ :D ¹⁹²		K ¹⁰⁷¹ :G ¹⁵⁰ K ¹⁰⁷¹ :T ¹⁵⁵ K ¹⁰⁷¹ :D ¹⁹²		K ¹¹⁷⁴ :G ¹⁵⁰ K ¹¹⁷⁴ :T ¹⁵⁵ K ¹¹⁷⁴ :D ¹⁹²
	P3	R ⁵⁷⁸ :W ¹⁸⁴ R ⁵⁷⁸ :N ¹⁸⁸		R ⁴⁷² :W ¹⁸⁴ R ⁴⁷² :N ¹⁸⁸		R ¹⁰⁷² :W ¹⁸⁴ R ¹⁰⁷² :N ¹⁸⁸		R ¹¹⁷³ :W ¹⁸⁴ R ¹¹⁷³ :N ¹⁸⁸	
	P4		R ⁵⁷⁸ :N ²²⁸		R ⁴⁷² :N ²²⁸		R ¹⁰⁷² :N ²²⁸		R ¹¹⁷³ :N ²²⁸
	P5	K ⁵⁸⁰ :W ¹⁴² K ⁵⁸⁰ :N ¹⁴⁶		R ⁴⁷⁴ :W ¹⁴² R ⁴⁷⁴ :N ¹⁴⁶ R ⁴⁷⁴ :S ¹⁰⁵		R ¹⁰⁷⁴ :W ¹⁴² R ¹⁰⁷⁴ :N ¹⁴⁶		K ¹¹⁷¹ :W ¹⁴² K ¹¹⁷¹ :N ¹⁴⁶	
					R ⁴⁷⁴ :Q ¹⁸¹		K ¹⁰⁷⁴ :Q ¹⁸¹		K ¹¹⁷¹ :Q ¹⁸¹

Os sítios de ligação presentes na Imp α possuem 4 características principais: i) interações polares das cadeias laterais que as asparaginas conservadas realizam com a cadeia principal do peptídeo, determinando a direção a ser seguida; ii) interações hidrofílicas que ocorrem nas cadeias laterais dos triptofanos conservados, que formam os sulcos de ligação na superfície da proteína e que acomoda as cadeias laterais longas dos resíduos básicos; iii) interações que ocorrem nas cadeias laterais básicas das NLSs com as cargas negativas dos resíduos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) que são posicionados estrategicamente nos sulcos de ligação da Imp α e; iv) interações dos resíduos básicos das NLS clássicas com os dipolos presente nas hélices H3 da porção côncava da Imp α (FONTES, *et al.*, 2000).

Com base nessas quatro características essenciais, as posições que são melhor definidas e consistentes entre as estruturas disponíveis são as de P2-P5 no sítio principal e P1'-P2' no sítio secundário da Imp α . Nesse trabalho, os peptídeos NLSs PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 se ligam ao sítio principal de maneira esperada ao consenso (CHELSKY, *et al.*, 1989) pré estabelecido para esse sítio de ligação, como ilustra o diagrama abaixo (**Figura 40**).

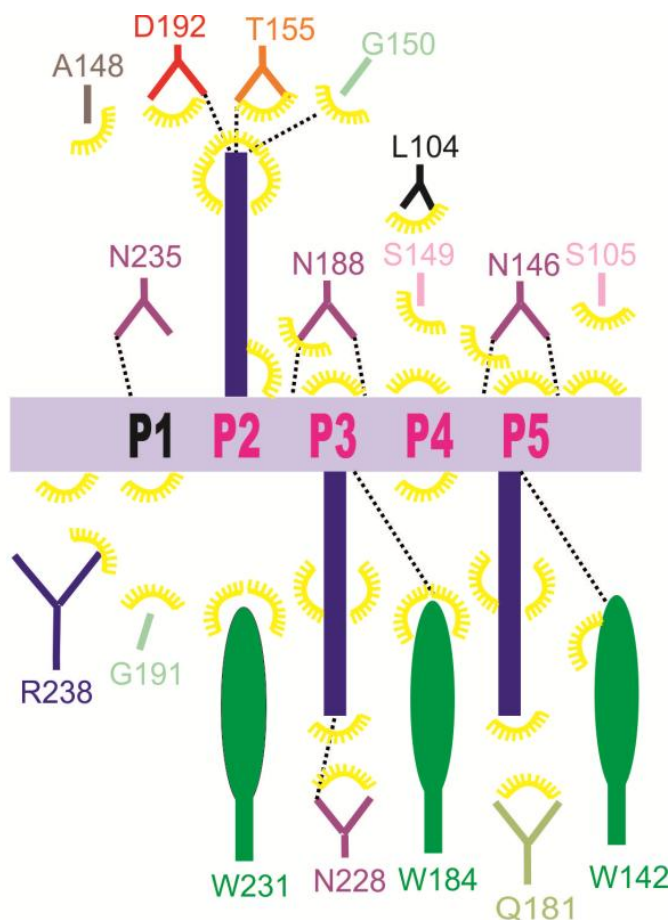


Figura 40 - Diagrama consenso das interações realizadas entre os resíduos dos peptídeos NLS PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2 com a Impα no sítio principal de ligação (S₁). A cadeia principal é mostrada com uma linha lilás, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta, na colocação azul escura. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Impα e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela.

Dessa maneira, notamos para o sítio de ligação principal, que os aminoácidos das sequências NLSs, são ancorados pelos resíduos conservados presentes na Impα, na região desse sítio de ligação. Os triptofanos 142, 184 e 231 criam os sulcos de ligação necessários para as cadeias laterais longas e básicas em P3 e P5. As cargas positivas das cadeias laterais em P2, P3 e P5 realizam interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com os resíduos conservados de asparaginas (N) e com as cargas negativas dos resíduos ácidos (ácido aspártico) presentes na Impα, nessa região. Corroboram para essa informação também os fatores de temperatura obtidos para essa região com os peptídeos, pois a presença de interações hidrofóbicas em todas as posições do sítio S₁ e ligações de hidrogênio com a cadeia lateral em P2 e P3 acarretam em um menor fator de temperatura para essa região e para esses dois resíduos, refletindo a forte interação dos mesmos com a proteína (**Tabelas 7, 8, 9 e 10**).

Da mesma forma, os peptídeos NLSs MLH1, XPG1 e XPG2, se ligam ao sítio secundário de maneira esperada ao consenso (CHELSKY, *et al.*, 1989) pré estabelecido para

esse sítio de ligação, como ilustra o diagrama abaixo (**Figura 41**). Os triptofanos conservados 357 e 399 criam o sulco para ancorar a cadeia lateral longa e positiva da arginina em P2'. As cargas positivas são equilibradas nas regiões P1', P2' e P4' pelas ligações com resíduos com cadeias laterais polares, como asparaginas e treoninas, cercados por resíduos ácidos (ácido glutâmico), conferindo o arranjo com características hidrofóbicas e eletrostáticas necessárias (FONTES, *et al.*, 2000). Assim como observado para o sítio principal, os fatores de temperatura obtidos para o sítio secundário com os peptídeos mostrou que, a presença de interações hidrofóbicas nas posições de P1', P2' e P4' do sítio S₂ e ligações de hidrogênio com a cadeia lateral em P1' e P2' acarretam em um menor fator de temperatura para essa região e para esses dois resíduos, refletindo a interação dos mesmos com a proteína (**Tabelas 7, 8, 9 e 10**).

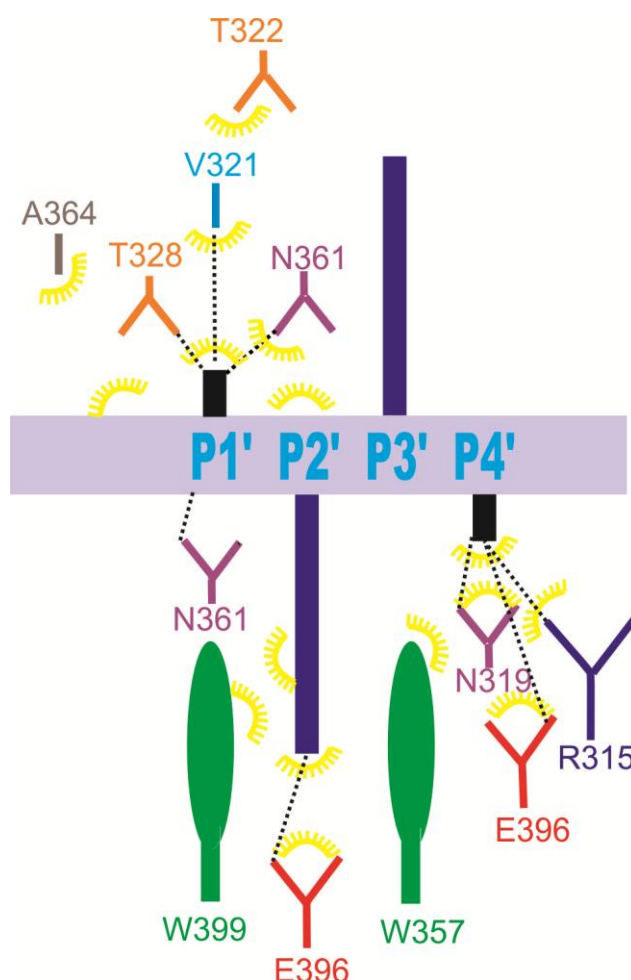


Figura 41 - Diagrama consenso das interações realizadas entre os resíduos dos peptídeos NLSs MLH1 e XPG1 com a Impα no sítio secundário de ligação (S₂). A cadeia principal é mostrada com uma linha lilás, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta, na colocação azul escura. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Impα e ligações hidrofóbicas são indicadas com a coloração amarela.

Esse padrão de ligação dos peptídeos NLSs PMS2, MLH1, XPG1 e XPG2, relacionados as proteínas que atuam no reparo de DNA, elucidados neste trabalho, quando comparados com a sequências NLSs de proteínas que atuam no reparo de DNA já elucidadas, como a Fen1, Ku70 e Ku80, tanto para o sítio principal como para o sítio secundário de ligação mostrou que as ligações e interações condizem com o consenso determinado pela análise de sequências de cNLSs (CHELSKY, *et al.*, 1989; DINGWALL, *et al.*, 1991; FONTES, *et al.*, 2000; TAKEDA, *et al.*, 2011; DE BARROS, *et al.*, 2012).

5.2. PEPTÍDEOS PMS2 E MLH1: PORQUE NÃO OCORREU LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO PMS2 NO SÍTIO SECUNDÁRIO?

Ambas proteínas do complexo MutL α , a PMS2 e a MLH1, apresentam cNLSs. O peptídeo NLS da proteína PMS2 é uma sequência monopartida clássica em que onze resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos ⁵⁷³TPNT**KRFK**KEE⁵⁸³, foram identificados como a região mínima exigida para o transporte ideal dessa proteína para o núcleo (KNUDSEN, *et al.*, 2009). Experimentos de ITC foram realizados, confirmando a afinidade deste peptídeo com constante de dissociação (K_d) de $1,95 \pm 0,20 \mu\text{M}$ para o sítio principal de ligação (S_1). Quando comparamos esse resultado com o resultado obtido pela SV40, para esse mesmo sítio de interação, a K_d obtida foi de $0,73 \pm 0,13 \mu\text{M}$. Os valores de K_d de ambos peptídeos estão na mesma ordem de grandeza, uma vez que há relatos na literatura reportando que os erros experimentais podem chegar a influenciar o K_d por um fator entre 10 e 50 vezes (KASTRITIS, *et al.*, 2011; TIAN, *et al.*, 2012). Todos os experimentos foram realizados de forma a minimizar ao máximo possíveis variações (experimentos à mesma temperatura, com o mesmo tampão e com amostras dializadas antes de seu uso (KASTRITIS, *et al.*, 2013b). Dessa maneira, podemos considerar que o peptídeo PMS2 se liga ao sítio principal da Imp α , com a K_d na mesma ordem de grandeza que a SV40 e que a menor afinidade do peptídeo PMS2 em relação ao SV40 pode estar relacionada com o menor número de resíduos básicos de lisina e arginina (K/R) nas posições P1 e P4.

O peptídeo NLS da proteína MLH1 também comprovou ser uma sequência monopartida clássica, em que dez resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos ⁴⁶⁷SNPR**KRH**RED⁴⁷⁶, foram identificados como a região mínima exigida para o transporte ideal dessa proteína para o núcleo no sítio principal (KNUDSEN, *et al.*, 2009), entretanto, também foram identificados oito resíduos de sua sequência, correspondendo aos resíduos ⁴⁶⁸NPR**KRH**RE⁴⁷⁵, no sítio secundário de ligação da Imp α . Experimentos de ITC também

foram realizados com o peptídeo MLH1, confirmando a ligação deste peptídeo com a Imp α . Pelo termograma obtido, pode-se inferir que houve ligação do peptídeo em ambos sítios (S₁ e S₂) entretanto, na análise dos dados não foi possível determinar as constantes de dissociação de cada sítio separadamente. Com isso, os dados foram analisados preliminarmente com o modelo de ligação considerando apenas um sítio, e foi obtida uma constante de dissociação de $5,10 \pm 2,23 \mu\text{M}$. Esta simplificação da análise dos dados, é muitas vezes utilizadas pois os programas comerciais de análise apresentam poucos modelos de ligação previamente delineados, e consequentemente modelos específicos de ajuste de dados podem ser desenvolvidos pelos usuários (VEGA, *et al.*, 2015). Diversos artigos também vem adotando similar abordagem (MIYATAKE, *et al.*, 2015). Estamos desenvolvendo um modelo para o caso da Imp α com dois sítios de ligação, porém este não funcionou de maneira eficiente para a MLH1.

Ambos peptídeos possuem resíduos básicos em sua sequência (KRXXK/R) de P2 a P5. e comprovaram ser monopartidos, mas porque somente o peptídeo MLH1 ligou-se ao sítio secundário de ligação da Imp α ?

Buscando em literatura peptídeos cNLS monopartidos elucidados com a Imp α de *Mus musculus* (CONTI, *et al.*, 2000; FONTES, *et al.*, 2000; CHEN, *et al.*, 2005; CUTRESS, *et al.*, 2008; YANG, *et al.*, 2010; TAKEDA, *et al.*, 2011) podemos notar que esse fato ocorre com alguns peptídeos. Separamos as sequências que ligaram-se somente no sítio principal e comparamos com os monopartidos que se ligaram em ambos os sítios de interações da Imp α . Notamos que o peptídeo monopartido PMS2 e os demais peptídeos monopartidos elucidados que se ligam exclusivamente no sítio principal da Imp α (**Tabela 18**), com exceção do peptídeo NLS AR, não possuem resíduos básicos ao redor dos resíduos de KR, geralmente na região de P1 e P4, no sítio principal, que teoricamente poderiam se ligar na região de P0' e P3', no sítio secundário. No entanto, peptídeos monopartidos que se ligam nos dois sítios, como é o caso dos peptídeos MLH1, XPG1 e XPG2, possuem resíduos básicos na posição de P4 (**Tabela 19**).

Quando observamos o sítio secundário, a região de P3' possui maior afinidade por resíduos básicos de cadeia longa, pois podem realizar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com no mínimo 3 resíduos (G²⁸¹, N²⁸³ e T³²²) nessa região (**Figuras 27 e 31 e Tabelas 16 e 17**). A região de P4' também é favorável a resíduos básicos de cadeias longas, cadeias essas que podem também realizar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com 3 resíduos (R³¹⁵, N³¹⁹ e E³⁵⁴), (**Figuras 23 e 27 e tabelas 16 e 17**). Neste caso, também é interessante analisarmos a região de P0', cadeias longas e básicas também

realizam interações favoráveis, no caso, interações hidrofóbicas com pelo menos 2 resíduos como visto nas **Figuras 19 e 31 e Tabela 16**.

Tabela 18 - Peptídeos NLSs monopartidos que se ligaram somente no sítio principal (S_1) de ligação da Imp α , sítio principal (S_1) P1-P5 e sítio secundário (S_2) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.

Proteínas	S_1														
	P1 P2 P3 P4 P5														
Ku80															
Ku70															
PLSCR1															
AR															
PMS2															
Consenso															

Ku80, (TAKEDA, A. A. S., *et al.*, 2011); Ku70, (TAKEDA, A. A. S., *et al.*, 2011); PLSCR1, Proteína *Phospholipid scramblase 1* (CHEN, *et al.*, 2005); AR, receptor de andrógeno (CUTRESS, *et al.*, 2008). O consenso é de (CHELSKY, *et al.*, 1989).

Tabela 19 - Peptídeos NLSs monopartidos que se ligaram tanto no sítio principal (S_1), como no secundário de ligação (S_2) da Imp α , sítio principal (S_1) P1-P5 e sítio secundário (S_2) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.

Proteínas	S_2										S_1				
	P0' P1' P2' P3' P4'										P1 P2 P3 P4 P5				
SV40															
c-Myc															
mPet TM															
MLH1															
XPG1															
XPG2															
Consenso															

SV40, Antígeno T do vírus símio 40(FONTES, *et al.*, 2000); c-Myc, proteína proto-oncogene (CONTI, *et al.*, 2000); mPet TM, sequência da biblioteca de peptídeos ideais para Imp α de *Mus musculus* (YANG, *et al.*, 2010). O consenso é de (CHELSKY, *et al.*, 1989).

Entretanto, deve-se ressaltar que *in vivo* as ligações no sítio secundário dos NLSs monopartidos, aqui descritos, não devem ocorrer pelo impedimento estérico causado pela proteína total quando ancorada no sítio de ligação. Dessa maneira, nos experimentos de cristalização, em virtude da disponibilidade do sítio de ligação, quantidade de peptídeo disponível e da presença de resíduos que permitem a interação, esses peptídeos foram encontrados nas estruturas cristalográficas em ambos sítios de ligação de NLS.

5.3. PORQUE OS MUTANTES PMS2 K577N, PMS2 R578N, MLH1 K471N e MLH1 R472N NLSs NÃO POSSUEM AFINIDADE?

Resultados de Brieger e colaboradores (BRIEGER, *et al.*, 2005) demonstraram que os mutantes dos peptídeos PMS2 e MLH1 nas cNLSs, nas regiões de P2 e P3 com a asparagina (N), não aboliram completamente a presença dessas duas proteínas no núcleo celular por microscopia de imunofluorescência. No entanto, o presente trabalho, com as diferentes técnicas utilizadas, indicou que a interação entre estes peptídeos e a proteína Imp α não ocorre. As regiões escolhidas para a mutação dos peptídeos, na região de P2 e P3, são regiões de grande importância para o reconhecimento e ancoramento das sequências NLSs no sítio principal (S₁) da Imp α . A cadeia lateral longa e positiva na região de P2, realiza interações com o dipolo presente nas hélices H3 da Imp α , já a cadeia lateral longa na região de P3, é importante pelo ancoramento dessa NLS entre os triptofanos 184 e 231, e essa região também realiza interações com os resíduos conservados da Imp α que formam esse sítio de interação (FONTES, *et al.*, 2000). Estudos prévios, realizados por Takeda e colaboradores (TAKEDA, *et al.*, 2013), relatam que a Imp α truncada na porção N-terminal apresenta instabilidade estrutural quando não ligada a algum peptídeo/proteína e, usualmente, não cristaliza nestas condições. Fato que pode justificar o ocorrido neste trabalho com a técnica de cristalização. Este resultado é também corroborado com os experimentos de afinidade, pela técnica de ITC, na qual ficou evidente que a afinidade é muito baixa para ser determinada, mesmo utilizando-se as premissas de se fixar a estequiometria, já que os modos de interação dos complexos são conhecidos (TELLINGHUISEN, 2008).

Cabe ressaltar também que mais importante que a determinação das constantes de afinidade dos peptídeos mutados, cabe à este experimento determinar se os resíduos mutados são determinantes na interação Imp α /peptídeo, assim como já demonstrado por Cutress e colaboradores (CUTRESS, *et al.*, 2008) para sistemas compostos por Imp α e receptores de andrógeno (AR). O que parece ser o caso em nosso experimento, pois a substituição dos peptídeos básicos da PMS2 e MLH1 por peptídeos neutros, afetou muito a afinidade entre ambas moléculas, levando os sistemas com afinidade moderada-alta à sistemas com afinidade que não pode ser determinada experimentalmente via calorimetria de titulação isotérmica. Com isso, podemos inferir que os peptídeos mutados na região de são fundamentais na interação dos sistemas em estudo.

5.4. PORQUE OS PEPTÍDEOS XPG1 e XPG2 NÃO SÃO BIPARTIDOS?

A sequência putativa NLS XPG1, presente na proteína XPG, (¹⁰⁵⁴KTQ**KRGITNTLEESSSLKRKRLSD**¹⁰⁷⁶) possui característica bipartida, ou seja, uma região básica (K/RK/R) separada por uma região de *linker* composta por 12 resíduos para o XPG1, separando outra região básica KR/KXR/K. (DINGWALL, *et al.*, 1991; KNAUF, *et al.*, 1996; KNUDSEN, *et al.*, 2009). Apesar dessa característica, neste trabalho o peptídeo NLSs XPG1, foi observado na estrutura cristalográfica como uma NLS monopartida clássica, em que sete resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos ¹⁰⁶⁹**LKRKRLS**¹⁰⁷⁵ realizam a interação no sítio principal. Também foram identificados seis resíduos de sua sequência, correspondendo aos resíduos ¹⁰⁶⁹**LKRKRL**¹⁰⁷⁴, no sítio secundário de ligação da Imp α . Experimentos de ITC foram realizados com o peptídeo XPG1, confirmando a alta afinidade deste peptídeo com a K_d de $0,46 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para o sítio principal de ligação (S₁) e com a K_d de $3,36 \pm 0,5 \mu\text{M}$ para o sítio secundário de ligação (S₂) da Imp α . Também foi verificado que a estequiometria apresentou valores diferentes de 1, o que pode parecer estranho uma vez que é esperado que ocorra interação de 1 peptídeo de XPG1 por sítio. Entretanto tal fato ocorre frequentemente (CUTRESS, *et al.*, 2008; FALCES, *et al.*, 2010) e pode ser decorrente da concentração incorreta da proteína ou ligantes, proteína sem o *folding* correto ou em conformação diferente da ativa. Isso de nenhuma maneira invalida a análise ou mostra que erros experimentais foram cometidos, uma vez que as constantes calculadas (K_d , ΔH e ΔS) são calculadas em função das concentrações corrigidas.

Qual seria a possível explicação para a ligação monopartida da sequência XPG1? O excesso de peptídeo (em solução), pode ter permitido que outro peptídeo XPG1, com 4 resíduos básicos (¹⁰⁷⁰**KRKR**¹⁰⁷³), se ancorasse no sítio secundário com uma interação maior que a apresentada pelo (¹⁰⁵⁷**KR**¹⁰⁵⁸), visto que a região de P3' possui maior afinidade por resíduos básicos de cadeia longa, pois podem realizar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com no mínimo 3 resíduos (G²⁸¹, N²⁸³ e T³²²) nessa região (**Figuras 27 e 31 e Tabelas 16 e 17**). A região de P4' também é favorável a resíduos básicos de cadeias longas, cadeias essas que podem também podem realizar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com 3 resíduos (R³¹⁵, N³¹⁹ e E³⁵⁴) (**Figuras 23 e 27 e Tabelas 16 e 17**). Além da região de P1' e P2', a região P3' com resíduo básico (K/R) parece ter um papel muito importante e pode estar diretamente relacionada a afinidade e ligação de peptídeos neste sítio secundário de ligação, como observado neste trabalho (**Tabelas 18, 19 e 20**), assim como observado nas sequências consenso de NLSs das novas classes 4 e 5 (**Tabela 2**), propostas

por Kosugi e colaboradores (KOSUGI, *et al.*, 2009) que ligam-se somente no sítio secundário de ligação da Imp α .

Quando comparada a sequência NLS XPG1 com as sequências NLSs bipartidas complexadas com Imp α de *Mus musculus* (**Tabela 20**), podemos notar que na sequência NLS XPG1, possui uma região de *linker* com cargas que diferem das apresentadas pelos peptídeos já elucidados, visto que, essa região também deve realizar interações importantes com a Imp α (FONTES, *et al.*, 2000; DE BARROS, *et al.*, 2012). A região de *linker* do peptídeo XPG1 possui mais resíduos polares neutros, aos lados dos sítios de ligação S₁ e S₂, e com apenas dois resíduos ácidos entre eles. Os dados de calorimetria de titulação isotérmica mostraram que a interação do XPG1 com o sítio principal (S₁) possui maior afinidade ($K_d=0,46\pm0,05$ μ M) e é regida por ligações de hidrogênio, interações polares e de van der Waals ($\Delta H<0$), bem como por interações hidrofóbicas ($\Delta S>0$). Já a interação deste com o sítio secundário (S₂) apresenta afinidade 10 vezes menor ($K_d=3,36\pm0,5$ μ M) e é regida principalmente por interações hidrofóbicas ($\Delta H>0$, $\Delta S<0$).

Essa ligação de forma monopartida e não bipartida pode ter ocorrido pelo artefato de ter se trabalhado apenas com peptídeos, no qual é mais favorável ocorrer a ligação com dois peptídeos nos sítios de ligação presentes na Imp α do que a ligação na forma bipartida. *In vivo*, para a proteína inteira, essas duas ligações provavelmente não ocorreriam, seria somente a forma de ligação monopartida ou a forma de ligação bipartida. Contudo, apesar das diferenças observadas na região de *linker* desse peptídeo, não é possível concluir com os experimentos realizados neste trabalho, se a proteína XPG se liga com a região do peptídeo XPG1 como um bipartido ou somente na forma monopartida, como os resultados desse trabalho mostraram.

Tabela 20 - Peptídeos NLSs bipartidos e sítios de ligação da Imp α , sítio principal (S₁) P1-P5 e sítio secundário (S₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.

Proteínas	S ₂										S ₁															
	P1'	P2'	P3'	P4'	Linker						P1	P2	P3	P4	P5											
FEN1	S	S	A	K	R	K	E		P	E	P	K	G	S	T	K	K	K	A	K	T					
NP		A	V	K	R	P	A		A	T	K	K	A	G	Q	A	K	K	K	K	L					
RB			K	R	S	A		E	G	S	N	P	P	K	P	L	K	K	L	R	G					
N1N2		R	K	K	R	K	T		E	E	E	S	P	L	K	D	K	A	K	K	S	K	G			
CBP80		S	R	R	R	H		S	D	E	N	D	G	G	Q	P	H	K	R	R	K	T	S			
mCBP80		M	S	R	R	R	H	S	Y	E	N	D	G	G	Q	P	H	K	R	R	K	T	S			
yCBP80		N	R	K	R	R	G	D	FDEDENYRDFRPR						M	P	K	R	Q	R	I	P				
TPX2			K	R	K	H	...	...						V	K	M	I	K	L							
Prp20			K	R	T	V	ATNGDASGA						H	R	A	K	K	M	S	K						
BIMAX1		P	R	K	R	P	L		E	W	D	E	D	E	E	P	P	R	K	R	K	R	L	W		
BIMAX2		R	R	R	K	R	K	R		E	W	D	D	D	D	D	P	P	K	K	R	R	R	L	D	
XPG1 [*]		K	T	Q	K	R	G	I		T	N	T	L	E	E	S	S	S	L	K	R	K	R	L	S	D
XPG1 ^{**}		S	L	K	R	K	R								S	S	S	L	K	R	K	R	L	S	D	
XPG2 [*]			K	K	R				R	K	L	R	R	A	R	G	R	K	R	K	T					
XPG2 ^{**}			R	K	R	K	T								G	K	K	R	R	K	L	R				
Consenso		R/ R/				X ₁₀₋₁₂											K R/		X R/							
		K K															K K		X K							

FEN1, endonuclease 1 flap, (DE BARROS, *et al.*, 2012); NP, nucleoplasmina, (FONTES, *et al.*, 2000); RB, proteína retinoblastoma, (FONTES, *et al.*, 2003); N1N2, *Xenopus laevis* phosphoprotein N1N2, Proteína ligadora de histona, (FONTES, *et al.*, 2003); CBP80, proteína de ligação cap 80, (DIAS, *et al.*, 2009); mCBP80, proteína de ligação cap 80 de *Mus musculus*, (MARFORI, *et al.*, 2012); yCBP80, proteína de ligação cap 80 de *Saccharomyces cerevisiae*, (MARFORI, *et al.*, 2012); TPX2, proteína alvo para *Xenopus laevis*, (GIESECKE, *et al.*, 2010); Prp20, proteína de regulação Ran de *Saccharomyces cerevisiae*, (ROMAN, *et al.*, 2013); BIMAX1, inibidor de Imp α , sequencia1, (MARFORI, *et al.*, 2012); BIMAX2, inibidor de Imp α , sequencia2, (MARFORI, *et al.*, 2012). O consenso é de (CHELSKY, *et al.*, 1989).

* Modelo de ligação bipartido teórico

** Modelo de ligação obtido neste trabalho

Já a sequência NLS putativa do peptídeo XPG2, presente também na proteína XPG, (¹¹⁶⁶VFGKRRRLRRARGRKRKT¹¹⁸⁶), descrita como possível sequência bipartida, na verdade, não possui características bipartidas de acordo com o consenso KRX10-12KRXXK (DINGWALL, *et al.*, 1991). Essa sequência possui uma região de *linker* com somente 9 resíduos ligando duas as regiões com resíduos básicos, a região básica de ligação no sítio secundário apresenta duas lisinas (KK), quando na verdade, necessitaria de uma lisina e uma arginina nas regiões de P1' e P2' (KR). Além disso, a sequência também apresenta um resíduo de arginina (R) na região de ligação em P2, no sítio principal de ligação, ao invés da lisina (K). Diante desse fato, comparamos o resultado obtido com a sequência NLS XPG2 mais detalhadamente, com base também em sequências NLSs elucidadas, complexadas com Imp α de *Mus musculus*, e de acordo com o consenso pré estabelecido (**Tabela 20**), apesar da alta quantidade de resíduos básicos nesta sequência, essa sequência, na verdade, possui

características de sequência NLS monopartida, com a região de ¹¹⁶⁹**KKRRK**¹¹⁷³ ligando-se de P1 a P5 no sítio principal (S₁). Corroborando com este fato, esse peptídeo NLS XPG2 confirmou ser uma sequência monopartida clássica em que oito resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos ¹¹⁶⁸**GKKRRKLR**¹¹⁷⁶ realizam a interação no sítio principal, também foram identificados cinco resíduos de sua sequência, correspondendo aos resíduos ¹¹⁸²**RKRKT**¹¹⁸⁶, no sítio secundário de ligação da Imp α . Entretanto, na análise dos experimentos de titulação isotérmica foi verificado que a constante de dissociação (K_d) está abaixo do limiar detectado por esta técnica. Por isso, são necessários novos experimentos para verificar se houve algum erro experimental ainda não identificado, uma vez que as mesmas alíquotas purificadas foram utilizadas na cristalografia, e com a obtenção de cristais, podemos inferir que a proteína estava com alta pureza e com *folding* correto. Com isso, novos experimentos de ITC vão ser realizados para verificar se houve algum erro experimental ainda desconhecido.

5.5. COMPARAÇÃO DAS K_d OBTIDAS

Para efetuar uma análise comparativa da afinidade dos peptídeos NLS pela Imp α , uma tabela foi preparada, apresentando as constantes de dissociação (K_d) dos sítios principal e secundário de todos os peptídeos do trabalho (**Tabela 21**). Como o peptídeo SV40 foi utilizado como amostra para a padronização dos experimentos, esta também foi comparada com outras constantes de dissociação encontradas em literatura (CUTRESS, *et al.*, 2008; BERNARDES, *et al.*, 2015). As constantes de dissociação estão na mesma ordem de grandeza para todos os experimentos com peptídeos NLS SV40, independentemente da utilização de diferentes tampões e temperaturas. Houve uma maior diferença principalmente em relação ao sítio secundário da Imp α utilizada em nosso estudo, que apresentou menor afinidade pela SV40, entretanto tais variações encontradas foram menores que as encontradas por outros autores quando da comparação de experimentos de ITC em diferentes condições (WILKINSON, 2004; KASTRITIS, *et al.*, 2013a).

Tabela 21 - Constantes de dissociação e entalpias obtidas para diferentes peptídeos NLS pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

	Sítio principal (S ₁)		Sítio secundário (S ₂)	
	K _d (μM)	ΔH (kcal/mol)	K _d (μM)	ΔH (kcal/mol)
NcImpα/SV40 [*]	1,23±0,22	-2,47±0,06	1,69±0,46	-3,21±0,12
MmImpα/SV40 ^{**}	0,31±0,15	-4,0±1,02	0,98±0,08	-7,8±0,76
MmImpα/SV40 ^{***}	0,73±0,13	-3,98±0,08	11,98±2,21	-4,80±0,42
PMS2	1,95±0,20	-5,33±0,15	-	-
MLH1	5,10±2,23	-6,76±0,81	-	-
XPG1	0,46±0,05	-3,15±0,12	3,36±0,5	3,79±0,15
XPG2	-	-	-	-

^{*}: complexo com Impα de *Neurospora crassa* - NcImpα/SV40, realizado à 10°C em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl com um equipamento iTC₂₀₀ (BERNARDES, *et al.*, 2015);

^{**}: complexo com Impα de *Mus musculus* - MmImpα/SV40, realizado a 10°C em tampão 100 mM HEPES pH7,4, 50 mM NaCl, 4 mM DTT com um equipamento VP-ITC (CUTRESS, *et al.*, 2008); SV40

^{***}: dados desta tese, complexo com Impα de *Mus musculus* - MmImpα/SV40, realizado à 20°C em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl com um equipamento iTC₂₀₀.

Em relação aos demais peptídeos utilizados (PMS2, MLH1, XPG1) as afinidades também se apresentaram na mesma ordem de grandeza. Estes resultados foram encontrados uma vez que os resíduos dos peptídeos que interagem com a Impα são praticamente os mesmos e como foram todos realizados nas mesmas condições, grandes variações não eram esperadas.

Com base nos valores de K_d obtidos, foi possível observar que a afinidade para todos os peptídeos em relação a Impα se mostrou maior para o sítio principal (S₁) de ligação, quando comparada com o valor obtido para o sítio secundário (S₂) de ligação. Informação essa, que corrobora com os resultados estruturais obtidos neste trabalho, comprovando que essas sequências NLSs são monopartidas. Outro dado que pode ser observado é um maior valor de K_d para os peptídeos PMS2 e MLH1 para o sítio S₁ em relação a SV40 e XPG1, o que pode estar relacionado com a ausência de resíduos básicos (K/R) na posição P4.

Ademais, os resultados de ITC foram importantes para comprovar os resíduos responsáveis pela formação dos complexos com a Impα, uma vez que quando da titulação com a PMS2 e MLH1 mutantes, as afinidades entre as moléculas ficaram abaixo do limite de detecção da técnica.

6. CONCLUSÃO

Posições específicas no consenso das cNLSs se confirmaram como essenciais, bem como a importância dos resíduos conservados do arranjo triptofano-asparaginas (W-N), cercados pelos resíduos ácidos, que formam os sítios de ligação da Imp α .

Os peptídeos NLSs MLH1 e PMS2, que atuam coordenando o processo de reparo de mal-pareamento de bases (MMR), ligaram-se na Imp α , no sítio principal de ligação (S₁), mostraram afinidade, confirmando ser sequências monopartidas clássicas, e podem ser transportadas de maneira independente para o núcleo celular pelo adaptador Imp α , sem a necessidade de co-importação com outras proteínas envolvidas no reparo de DNA.

Os peptídeos mutantes MLH1 K471N, MLH1 R472N, PMS2 K577N e PMS2 R578N não apresentaram afinidade pela Imp α . Os resíduos mutados encontram-se nas regiões essenciais para ligação dos NLS no sítio principal e, por não estabelecerem as interações necessárias, tornam-se elementos que dificultam a cristalização da Imp α .

As sequências NLSs XPG1 e XPG 2, presente na proteína XPG, que atua no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) ligaram-se aos sítios S₁ e S₂ como sequências NLS monopartidas e, não bipartidas como descrito na literatura (KNAUF, *et al.*, 1996).

A ausência de resíduos básicos nas posições P0' e P3' parece influenciar na ligação ou não dos peptídeos NLSs no sítio secundário de ligação da Imp α . Além da região de P1' e P2', a região P3' com ligação de resíduo básico (K/R) parece ter um papel muito importante e pode estar ligado diretamente também ao reconhecimento do peptídeos neste sítio secundário (S₂) de ligação da Imp α .

7. REFERÊNCIAS

- ADAM, E. J.; ADAM, S. A. Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. **J Cell Biol**, v. 125, n. 3, p. 547-55, May 1994.
- ADAMS, P. D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 11, p. 1948-54, Nov 2002.
- ANDRADE, M. A. et al. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. **J Mol Biol**, v. 309, n. 1, p. 1-18, May 25 2001.
- BAILEY, S. The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 50, p. 760-763, Sep 1 1994.
- BAYLISS, R.; LITTLEWOOD, T.; STEWART, M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 99-108, Jul 7 2000.
- BERNARDES, N. E. et al. Structure of Importin-alpha from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128687, 2015.
- BRIEGER, A. et al. Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. **Mol Carcinog**, v. 43, n. 1, p. 51-8, May 2005.
- The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, Sep 1 1994.
- CHANG, C. W. et al. Crystal structure of rice importin-alpha and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. **Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 5074-88, Dec 2012.
- CHANG, C. W. et al. Distinctive conformation of minor site-specific nuclear localization signals bound to importin-alpha. **Traffic**, v. 14, n. 11, p. 1144-54, Nov 2013.
- CHELSKY, D.; RALPH, R.; JONAK, G. Sequence Requirements for Synthetic Peptide-Mediated Translocation to the Nucleus. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 6, p. 2487-2492, Jun 1989.
- CHEN, M. H. et al. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10599-606, Mar 18 2005.
- CHI, N. C.; ADAM, E. J.; ADAM, S. A. Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. **J Cell Biol**, v. 130, n. 2, p. 265-74, Jul 1995.
- CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. **Nature**, v. 399, n. 6733, p. 230-7, May 20 1999.
- CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 6, p. 703-15, Dec 2001.
- CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, Nov 15 2003.
- CHRISTOPHE, D.; CHRISTOPHE-HOBERTUS, C.; PICHON, B. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? **Cell Signal**, v. 12, n. 5, p. 337-41, May 2000.

CINGOLANI, G. et al. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 6, p. 1345-53, Dec 2002.

CINGOLANI, G. et al. Nuclear import factors importin alpha and importin beta undergo mutually induced conformational changes upon association. **FEBS Lett**, v. 484, n. 3, p. 291-8, Nov 10 2000.

CINGOLANI, G. et al. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. **Nature**, v. 399, n. 6733, p. 221-9, May 20 1999.

CONTI, E.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. **Structure**, v. 8, n. 3, p. 329-38, Mar 15 2000.

CONTI, E.; MULLER, C. W.; STEWART, M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. **Curr Opin Struct Biol**, v. 16, n. 2, p. 237-44, Apr 2006.

CONTI, E. et al. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 193-204, Jul 24 1998.

COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 647-71, 2007.

COSTA, R. M. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-99, Nov 2003.

CUTRESS, M. L. et al. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 7, p. 957-968, Apr 2008.

DE BARROS, A. C. **ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA-alfa DE MAMÍFEROS E PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS)**. 2011. 91 (MsC). UNESP, Botucatu.

DE BARROS, A. C. et al. Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1). **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 68, p. 743-750, Jul 2012.

DEGRASSE, J. A. et al. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 2119-30, Sep 2009.

DEVOS, D. et al. Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. **PLoS Biol**, v. 2, n. 12, p. e380, Dec 2004.

DIAS, S. M. et al. The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 9, p. 930-7, Sep 2009.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? **Trends Biochem Sci**, v. 16, n. 12, p. 478-81, Dec 1991.

DINGWALL, C.; SHARNICK, S. V.; LASKEY, R. A. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. **Cell**, v. 30, n. 2, p. 449-58, Sep 1982.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.

FALCES, J. et al. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin alpha/beta: insights into a complete import complex. **Biochemistry**, v. 49, n. 45, p. 9756-69, Nov 16 2010.

FANARA, P. et al. Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21218-23, Jul 14 2000.

FONTES, M. R. et al. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. **J Biol Chem**, v. 278, n. 30, p. 27981-7, Jul 25 2003.

FONTES, M. R.; TEH, T.; KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. **J Mol Biol**, v. 297, n. 5, p. 1183-94, Apr 14 2000.

FONTES, M. R. et al. Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. **Biochem J**, v. 375, n. Pt 2, p. 339-49, Oct 15 2003a.

FONTES, M. R. M. et al. Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. **Biochemical Journal**, v. 375, p. 339-349, Oct 15 2003b.

FREIRE, E.; SCHON, A.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials. **Methods Enzymol**, v. 455, p. 127-55, 2009.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. **Methods Cell Biol**, v. 84, p. 79-113, 2008.

FUKUHARA, N. et al. Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. **J Biol Chem**, v. 279, n. 3, p. 2176-81, Jan 16 2004.

GIESECKE, A.; STEWART, M. Novel binding of the mitotic regulator TPX2 (target protein for Xenopus kinesin-like protein 2) to importin-alpha. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17628-35, Jun 4 2010.

GOLDFARB, D. S. et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 505-14, Sep 2004.

GORLICH, D. et al. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. **Curr Biol**, v. 5, n. 4, p. 383-92, Apr 1 1995.

GORLICH, D.; LASKEY, R. A. Roles of importin in nuclear protein import. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 60, p. 695-9, 1995.

GORLICH, D.; MATTAJ, I. W. Nucleocytoplasmic transport. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1513-8, Mar 15 1996.

GORLICH, D. et al. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell**, v. 79, n. 5, p. 767-78, Dec 2 1994.

GORLICH, D. et al. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. **Nature**, v. 377, n. 6546, p. 246-8, Sep 21 1995.

GUARNE, A.; JUNOP, M. S.; YANG, W. Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. **EMBO J**, v. 20, n. 19, p. 5521-31, Oct 1 2001.

HOUTMAN, J. C. et al. Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling. **Protein Sci**, v. 16, n. 1, p. 30-42, Jan 2007.

IMAMOTO, N. et al. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. **J Biol Chem**, v. 270, n. 15, p. 8559-65, Apr 14 1995.

IYAMA, T.; WILSON, D. M., 3RD. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 8, p. 620-36, Aug 2013.

JANS, D. A.; XIAO, C. Y.; LAM, M. H. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? **Bioessays**, v. 22, n. 6, p. 532-44, Jun 2000.

KASTRITIS, P. L.; BONVIN, A. M. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 79, p. 20120835, Feb 2013a.

KASTRITIS, P. L.; BONVIN, A. M. J. J. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 79, Feb 6 2013b.

KASTRITIS, P. L. et al. A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. **Protein Science**, v. 20, n. 3, p. 482-491, Mar 2011.

KNAUF, J. A. et al. Multiple nuclear localization signals in XPG nuclease. **Mutat Res**, v. 363, n. 1, p. 67-75, May 15 1996.

KNUDSEN, N. O. et al. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 6, p. 682-9, Jun 4 2009.

KNUDSEN, N. O. et al. Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1). **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 8, p. 2609-19, 2007.

KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 4, p. 388-97, Apr 1999.

KOBE, B. et al. The many faces of platelet glycoprotein Ibalph--thrombin interaction. **Curr Protein Pept Sci**, v. 10, n. 6, p. 551-8, Dec 2009.

KOHLER, M.; HALLER, H.; HARTMANN, E. Nuclear protein transport pathways. **Exp Nephrol**, v. 7, n. 4, p. 290-4, Jul-Aug 1999.

KOSUGI, S. et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 478-85, Jan 2 2009.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sep 21 2007.

LANFORD, R. E.; BUTEL, J. S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 801-13, Jul 1984.

LANFORD, R. E.; KANDA, P.; KENNEDY, R. C. Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. **Cell**, v. 46, n. 4, p. 575-82, Aug 15 1986.

LANGE, A. et al. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5101-5, Feb 23 2007.

LASKOWSKI, R. A.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J Mol Biol**, v. 231, n. 4, p. 1049-67, Jun 20 1993.

LE, V. H. et al. Modeling complex equilibria in isothermal titration calorimetry experiments: Thermodynamic parameters estimation for a three-binding-site model. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 2, p. 233-241, Mar 15 2013.

LEE, S. J. et al. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1571-5, Nov 28 2003.

LEHMANN, A. R.; MCGIBBON, D.; STEFANINI, M. Xeroderma pigmentosum. **Orphanet J Rare Dis**, v. 6, p. 70, 2011.

LEONG, V. et al. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutLalpha: redundancy is the key. **Mol Carcinog**, v. 48, n. 8, p. 742-50, Aug 2009.

LIU, W. et al. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21429-34, Jul 14 2000.

MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules.**: Malabar: Krieger Publishing Company. 1989. 371 p.

MCREE, D. E. **Practical protein crystallography**: San Diego: Academic Press. 1993

MARFORI, M. et al. Structural Basis of High-Affinity Nuclear Localization Signal Interactions with Importin- α . **Traffic**, v. 13, n. 4, p. 532-548, Apr 2012.

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 872-7, Dec 16 2004.

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Nup50/Np60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. **EMBO J**, v. 24, n. 21, p. 3681-9, Nov 2 2005.

MELCHIOR, F. et al. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. **J Cell Biol**, v. 123, n. 6 Pt 2, p. 1649-59, Dec 1993.

MIYATAKE, H. et al. Crystal Structure of Human Importin- α 1 (Rch1), Revealing a Potential Autoinhibition Mode Involving Homodimerization. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115995, 2015.

MOORE, M. S. Nuclear pores: David and Goliath in nuclear transport. **Curr Biol**, v. 5, n. 12, p. 1339-41, Dec 1 1995.

MOORE, M. S.; BLOBEL, G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature**, v. 365, n. 6447, p. 661-3, Oct 14 1993.

MOR, A.; WHITE, M. A.; FONTOURA, B. M. Nuclear trafficking in health and disease. **Curr Opin Cell Biol**, v. 28, p. 28-35, Jun 2014.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 1, p. 34-6, Jan 1999.

OTWINOWSKI Z; W, M. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol**, v. 276, p. 307-326, 1997.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol**, v. 276, p. 307-326, 1997.

PASCHAL, B. M.; GERACE, L. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. **J Cell Biol**, v. 129, n. 4, p. 925-37, May 1995.

PUMROY, R. A.; CINGOLANI, G. Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. **Biochem J**, v. 466, n. 1, p. 13-28, Feb 15 2015.

QUIMBY, B. B.; DASSO, M. The small GTPase Ran: interpreting the signs. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 338-44, Jun 2003.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1769-73, Feb 28 1995.

ROMAN, N. et al. Structural characterisation of the nuclear import receptor importin α in complex with the bipartite NLS of Prp20. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82038, 2013.

ROUT, M. P.; AITCHISON, J. D. Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. **Essays Biochem**, v. 36, p. 75-88, 2000.

ROUT, M. P. et al. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **J Cell Biol**, v. 148, n. 4, p. 635-51, Feb 21 2000.

SOROKIN, A. V.; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. **Biochemistry (Mosc)**, v. 72, n. 13, p. 1439-57, Dec 2007.

STEWART, M. Structural basis for the nuclear protein import cycle. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 701-4, Nov 2006.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 195-208, Mar 2007.

TAKEDA, A. A. et al. Biophysical characterization of the recombinant importin- α from *Neurospora crassa*. **Protein Pept Lett**, v. 20, n. 1, p. 8-16, Jan 2013.

TAKEDA, A. A. S. et al. Structural Basis of Importin- α -Mediated Nuclear Transport for Ku70 and Ku80. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 2, p. 226-234, Sep 16 2011.

TALCOTT, B.; MOORE, M. S. The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin α 3/Qip. **J Biol Chem**, v. 275, n. 14, p. 10099-104, Apr 7 2000.

TEH, T.; TIGANIS, T.; KOBE, B. Crystallization of importin α , the nuclear-import receptor. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 55, n. Pt 2, p. 561-3, Feb 1999.

TELLINGHUISEN, J. Isothermal titration calorimetry at very low c. **Anal Biochem**, v. 373, n. 2, p. 395-7, Feb 15 2008.

TIAN, F.; LV, Y.; YANG, L. Structure-based prediction of protein-protein binding affinity with consideration of allosteric effect. **Amino Acids**, v. 43, n. 2, p. 531-43, Aug 2012.

TRAN, E. J.; KING, M. C.; CORBETT, A. H. Macromolecular transport between the nucleus and the cytoplasm: Advances in mechanism and emerging links to disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2784-2795, Nov 2014.

VAGUINE, A. A.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 55, p. 191-205, Jan 1999.

VEGA, S.; ABIAN, O.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. A unified framework based on the binding polynomial for characterizing biological systems by isothermal titration calorimetry. **Methods**, v. 76, p. 99-115, Apr 2015.

VELAZQUEZ-CAMPOY, A. et al. Isothermal titration calorimetry. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 17, p. Unit 17 8, Sep 2004.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Ligplot - a Program to Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127-134, Feb 1995.

WEIS, K.; MATTAJ, I. W.; LAMOND, A. I. Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. **Science**, v. 268, n. 5213, p. 1049-53, May 19 1995.

WILKINSON, K. D. Quantitative analysis of protein-protein interactions. **Methods Mol Biol**, v. 261, p. 15-32, 2004.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 67, p. 235-242, Apr 2011.

WU, X.; PLATT, J. L.; CASCALHO, M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 9, p. 3320-8, May 2003.

YANG, S. N. et al. Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin-alpha using oriented peptide library screening. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 19935-46, Jun 25 2010.