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

NATÁLIA ELISA BERNARDES

# ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA-α DO FUNGO *Neurospora crassa* E PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE FUNGOS

**BOTUCATU – SP**

2018

**Natália Elisa Bernardes**

# ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA-α DO FUNGO *Neurospora crassa* E PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE FUNGOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para Exame Geral de Defesa de Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas - estrutura e função.

Orientador: Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

**BOTUCATU – SP**

2018

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bernardes, Natália Elisa.

Estudos estruturais com a Importina-α do fungo *Neurospora crassa* e peptídeos de sequências de localização nuclear (NLS) de proteínas relacionadas ao metabolismo de fungos / Natália Elisa Bernardes. - Botucatu, 2018

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

1. Cristalografia. 2. *Neurospora crassa*. 3. Peptídeos. 4. Proteínas.

Palavras-chave: Cristalografia; ITC; Importina-α; NLS; *Neurospora crassa*.

*Dedico essa tese aos meus pais, Lincoln e Maria*

# AGRADECIMENTOS

*Essa tese é apenas uma parte de tudo o que foi produzido, aprendido e compartilhado durante a longa jornada da pós-graduação. E o trabalho apresentado aqui não seria possível sem o apoio estrutural, financeiro, pessoal e psicológico de pessoas e instituições. Esse é o espaço que tenho para homenageá-los.*

*Começo agradecendo ao Professor Marcos Fontes por ter sido o idealizador dessa pesquisa e por me permitir fazer parte de seu laboratório por tantos anos; à professora Maria Célia por participar e colaborar com a realização desse trabalho e à professora Nelly Panté pelo suporte durante o período de intercâmbio em seu laboratório.*

*Em seguida, agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Física e Biofísica que forneceram o apoio estrutural para que os experimentos fossem realizados; ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pelo suporte institucional.*

*Á Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Curso Superior (CAPES) pelo suporte técnico e financeiro através do Processo nº 2014/10289-0*

*No âmbito pessoal, algumas pessoas contribuíram para que esse período fosse vivido intensamente: Agradeço imensamente aos meus pais, Lincoln e Maria, minhas irmãs Amália e Carolina, minha tia Márcia por sempre me incentivarem a ser uma mulher independente e persistente e me ajudarem a enfrentar os momentos mais difíceis oferecendo carinho e conforto; ao meu cunhado Rafael por trazer um novo ponto de vista a nossa família. Em especial, agradeço ao meu sobrinho recém-nascido João Lincoln, pois seu nascimento fez com que essa tese fosse escrita em um momento de muita alegria e esperança no futuro.*

*Agradeço aos amigos mais próximos: Cristiane, por estar sempre disposta a dividir as alegrias e angústias, mesmo estando longe; Luana pelas conversas tão variadas e prazerosas; Taíla, por fazer com que o dia-a-dia no departamento seja muito mais agradável; Letícia, por ter sido minha " roommate" por tantos anos; Andrea, por compartilhar a Impα e as aspirações na carreira; Carolina, por fazer de Vancouver uma cidade muito mais acolhedora.*

*Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e do Departamento de Física e Biofísica por compartilhar conhecimento e muitos momentos agradáveis e às alunas de iniciação científica Cíntia e Tainá por aceitarem a minha orientação.*

*Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado David que está me ensinando que calma e gentileza podem mudar o mundo e que sempre me incentiva a melhorar, dizendo: "there is always room for improvement".*

## RESUMO

A comunicação entre o núcleo celular e o citoplasma acontece através de mecanismos de transporte que permitem a passagem de moléculas por poros presentes no envoltório nuclear. Na Via Clássica de Importação Nuclear, a proteína Importina-α (Impα) atua na identificação das proteínas a serem transportadas ao núcleo a partir do reconhecimento de sequências de localização nuclear (NLS). Os primeiros estudos de caracterização estrutural da Impα de *Neurospora crassa* (NcImpα) e a sua estrutura cristalográfica mostraram a presença de regiões que podem estar relacionadas a especificidades da proteína NcImpα no reconhecimento de NLSs de proteínas de fungos. Além disso, foram reconhecidos prováveis NLSs em proteínas reguladoras do metabolismo de carbono e nitrogênio em fungos. O objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar o modo de interação de NLSs de proteínas fúngicas com a NcImpα e verificar possíveis especificidades da proteína NcImpα no reconhecimento de NLSs. Os potenciais peptídeos NLS de proteínas dos fungos filamentosos *N. crassa* e *Aspergillus nidulans* foram submetidos a experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com a proteína NcImpα, para calcular a afinidade entre as moléculas. Dentre os peptídeos testados, as sequências correspondentes ao potenciais NLS dos fatores de transcrição PAC-3, NIT-2, FLB-3, VOSA e VEA, apresentaram elevada afinidade com a NcImpα, conforme indicado pelos valores de $K_d$ obtidos. Quando submetidos a experimentos de importação nuclear,o peptídeo NIT2-NLS foi eficientemente transportado para o interior do núcleo celular. Foram realizados testes de cristalização para a elucidação da estrutura dos complexos Impα/peptídeos NLS. O conjunto de dados do complexo NcImpα/NIT2NLS a 2,50 Å de resolução, permitiu a elucidação da estrutura onde foi possível observar a presença do peptídeo NIT2-NLS nos sítios principal e secundário de NcImpα. Já a estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS mostrou o peptídeo se lihando com maior afinidade apenas ao sítio prinicpal. A comparação das sequências dos peptídeos VEA-NLS e VE1-NLS mostrou que a substituição de um resíduo de lisina por uma leucina e uma lisina por uma arginina nas posições P1’ e P2 é suficiente para reduzir drasticamente a afinidade do peptídeo VE1-NLS pela NcImpα. Por fim, se sugere que o peptídeo VOSA-NLS se liga a NcImpα em uma conformação muito semelhante ao peptídeo NIT2-NLS e as NLSs da proteína FLB3-NLS podem apresentam afinidade a apenas um dos sítios da proteína NcImpα.

## *ABSTRACT*

*The communication between the cell nucleus and the cytoplasm happens through transport mechanisms that allow the passage of molecules through pores present in the nuclear envelope. In the classical nuclear import pathway, the protein Importin-α (Impα) acts in the identification of the proteins to be transported to the nucleus from the recognition of nuclear localization sequences (NLS). The first structural characterization studies of N. crassa Impα (NcImpα) and its crystallographic structure showed the presence of regions that may be related to protein specificities in the recognition of fungal NLSs. In addition, NLSs were recognized in proteins related to fungal metabolism. The objective of this work is to identify NLSs in fungal proteins and observe the specificities of the NcImpα protein. Potential NLS peptides of N. crassa were subjected to isothermal titration calorimetry (ITC) experiments with NcImpα to verify and calculate the affinity of the complexes. Among the peptides tested, the sequences corresponding to the potentials NLS of the transcription factors PAC-3, NIT-2, FLB-3, VOSA and VEA, showed high affinity with NcImpα, as indicated by the $K_d$ values obtained. When subjected to functional experiments with HeLa cells, the peptide NIT2-NLS were efficiently transported into the cell nucleus. Crystallization tests were performed to elucidate the structure of the complexes Impα/NLS peptides. A set of data from the NcImpα/ NIT2NLS complex was collected, with 99.71% completeness at 2.50 resolution, from which the structure was elucidated. It was possible to observe the presence of NIT2NLS peptides in the major and minor binding sites of NcImpα. The structure of the MmImpα/PAC3-NLS complex was also elucidated in order to compare the interaction of the same peptide with different isoforms of the Impα protein. The structure of the MmImpα/PAC3-NLS complex showed the peptide binding with higher affinity to the major binding site. Comparison of the sequences of the VEA-NLS and VE1-NLS peptides showed that the substitution of a lysine residue by a leucine and a lysine by an arginine at positions P1 'and P2 is sufficient to drastically reduce the affinity of the peptide VE1-NLS by NcImpα. Finally, it is suggested that the VOSA-NLS peptide binds to NcImpα in a conformation very similar to the peptide NIT2-NLS and the NLSs of the FLB3-NLS protein exhibits affinity to only one of the NcImpα protein sites.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ARM** – *Armadillo*

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BSA** – Albumina do soro bovino

**CAS -** *Cellular apoptosis susceptibility protein*

**cNLS** – Sequência de localização nuclear clássica

**CY3** – Cianina 3

**DAPI -** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DNA –** Ácido desoxirribonucleico

**DNAse -** Desoxirribonuclease

**EGTA -** Ácido egtazico

**EN –** Envelope nuclear

**FEN1** – Endonuclease 1 flap

**FLB-3 –** (*fluffy low brlC expression)*

**GATA -** Família de fatores de transcrição com domínios contendo zinco

**GFP -** Proteína verde fluorescente

**GTP** – Guanosina trifosfato

**H1, H2 e H3** – Hélices 1, 2 ou 3 do motivo ARM

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

**HeLa -** Linhagem de células do tumor de Henrietta Lacks

**HIV -** Vírus da imunodeficiência humana

**IBB** – Domínio de ligação a Importinaβ (Importin-β binding)

**Impα** – Importina-α

**Impβ** – Importina-β

**IPTG** – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

**ITC** – Calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*)

**Ka** – Constante de associação

**Kap-α1, Kap-α2, Kap-α3** – Carioferinas das famílias α1, α2 e α3

**$K_d$** – Constante de dissociação

**$KNO_3$ -** Nitrato de potássio

**LB -** Luria Bertani (meio de cultura)

**MDa -** Mega daltons

**MES -** Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico

**MmImpα** – Importina-α de *Mus musculus*

**N1N2 -** Proteína ligada a histona

**NcImpα -** Importina-α de *Neurospora crassa*

**NES -** Sequência de exportação nuclear

**NIT-2** – Membro 2 da família nitrilase

**NLS –** Sequência de localização nuclear

**NMR -** Ressonância magnética nuclear

**NPC** – Complexo poro nuclear

**ORF -** *open reading frame*

**PAC-3** – Fator de transcrição pH responsivo

**PB2 -** polymerase basic protein 2

**PBS -** Tampão fosfato-salino

**PDB -** Banco de dados de proteínas/*protein data bank*

**PEG -** Polietilenoglicol

**PFA -** Paraformaldeído

**PID -** número de identificação da proteína

**RanGTP** – Guanosina trifostato complexada a proteína Ran

**RNAse** – Ribonuclease

**rpm** – Rotações por minuto

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

**SV40** – Antígeno T do vírus de símio 40

**VD** - Domímio *velvet*

**VE-1** – Proteína Velvet A em *N. crassa*

**VEA** – proteína Velvet A em *A. nidulan*

**VelB** - Subunidade B do complexo *velvet*

**VM** - Meio Vogel

**VOSA –** Protéina da viabilidade dos esporos A

**XPG -** Proteína de reparode DNA complementando células XP-G

**XRCC1 -** Proteína de reparo de DNA : X-Ray Repair Cross Complementing 1

**yCBP80** – Complexo de proteína de ligação a CAP

# Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrado do Complexo Poro Nuclear (CPN). ..... 19

Figura 2. Esquema simplificado da Via Clássica de Importação Nuclear. ..... 21

Figura 3. Filogênia das Impα. ..... 25

Figura 4. Estrutura cristalográfica da proteína NcImpα. ..... 27

Figura 5. Etapas para identificação e caracterização de NLSs em proteínas. ..... 32

Figura 6. Purificação das proteínas NcImpα e MmImpα por cromatografia de afinidade. ..... 41

Figura 7. Crescimento das cepas Δnit-2 e localização da proteína NIT-2 em diferentes condições de nitrogênio ..... 43

Figura 8. Termogramas e isoterma resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica do complexo NcImpα/NIT2-NLS ..... 45

Figura 9. Ensaio de importação nuclear em células Hela com os complexos BIMAX1-NLS-BSA e NIT2-NLS-BSA. ..... 48

Figura 10. Ensaio de importação nuclear em células Hela com o complexo NIT2-NLS-BSA e o peptideo BIMAX1. ..... 50

Figura 11. Cristal do complexo NcImpα/NIT2-NLS. Cristal obtido na condição: Bicine 0,2 mM, pH 8,5 e polietileno glicol 6000 20 % (p/v). ..... 51

Figura 12. Estrutura cristalográfica da proteína NcImpα complexada ao peptídeo NIT2-NLS. ..... 53

Figura 13. Esquema representando as interações entre o peptídeo NIT2-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína NcImpα. ..... 55

Figura 14. Modelo para o tráfico subcelular da proteína PACC de *A. nidulans* em resposta ao pH do ambiente. ..... 60

Figura 15. Localização subcelular da proteína PAC-3 ..... 61

Figura 16. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos A) NcImpα/PAC3-NLS e B) MmImpα/PAC3-NLS. ..... 63

Figura 17. Cristais do complexo NcImpα/PAC3-NLS ..... 64

Figura 18. Cristais do complexo MmImpα/PAC3-NLS ..... 65

Figura 19. Mapa de densidade eletrônica nos sítios principal e secundário do complexo MmImpα/PAC3-NLS. ..... 68

Figura 20. Estrutura cristalográfica do complexo MmImpα/PAC3-NLS. ..... 69

Figura 21. Esquema representando as interações entre o peptídeo PAC3-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína MmImpα. ..... 72

Figura 22. Sobreposição de NLSs bipartidas que interagem com a proteína Impα. ..... 74

Figura 23. Sobreposição dos peptídeos SV40-NLS, NIT2-NLS e PAC3-NLS que interagem com a proteína Impα. As NLSs foram obtidas a partir das estruturas dos complexos NcImpα/SV40-NLS (PDB ID: 4RXH) e NcImpα/NIT2-NLS (PDB ID: 5VQ1). ..... 75

Figura 24. Sobreposição da estrutura NcImpα com as estruturas das proteínas MmImpα, OsImpα e HsImpα. ..... 77

Figura 25. Resíduos que dificultam a ligação de NLSs ao sítio secundário de MmImpα. ..... 79

Figura 26. Diagrama esquemático da função dos reguladores *velvet* no desenvolvimento de *A. nidulans*. ..... 82

Figura 27. Identificação dos domínios das proteínas da família velvet. ..... 82

Figura 28. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) NcImpα/FLB3a-NLS; B) NcImpα/FLB3b-NLS. ..... 85

Figura 29. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) NcImpα/VEA-NLS; B) NcImpα/VE1-NLS; C) NcImpα/VOSA-NLS. ..... 87

Figura 30. Ensaios de importação nuclear em células Hela com os complexos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA. ..... 90

# Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências consenso das seis classes de NLSs Impα- dependentes. ..... 29

Tabela 2. Fatores de transcrição relacionados ao crescimento de fungos filamentosos. ..... 30

Tabela 3. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína NIT-2. ..... 44

Tabela 4. Constantes termodinâmicas obtidas pelas análises por ITC do complexo NcImpα/NIT2-NLS. .. 46

Tabela 5. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura cristalográfica do complexo NcImpα/NIT2-NLS. ..... 52

Tabela 6. Valores de B-factor dos resíduos dos peptídeos NIT2-NLS ligados aos sítios principal e secundário da proteína NcImpα. ..... 54

Tabela 7. Interação de NLSs monopartidos e NLS-like com a proteína Impα ..... 57

Tabela 8. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína PAC-3. ..... 62

Tabela 9. Constantes termodinâmicas obtidas a partir das medidas de ITC dos complexos NcImpα/PAC3-NLS e MmImpα/PAC3-NLS. ..... 63

Tabela 10. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS. ..... 66

Tabela 11. Valores de *B-factor* dos resíduos do peptídeo PAC3-NLS ligado aos sítios principal e secundário da proteína NcImpα. ..... 70

Tabela 12. Prováveis NLSs identificados na sequência das proteínas FLB3, VEA e VOSA . ..... 84

Tabela 13. Constantes termodinâmicas obtidas a partir dos experimentos de ITC dos complexos NcImpα/FLB3a-NLS, NcImpα/FLB3b-NLS, NcImpα/VEA-NLS, NcImpα/VOSA-NLS. ..... 88

Tabela 14. Sugestão da ligação dos peptídeos VEA-NLS, VE1-NLS e VOSA-NLS aos sítios da proteína Impα. ..... 91

Tabela 15. Sugestão da ligação dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS aos sítios da proteína Impα. ..... 93

**SUMÁRIO**

**Apresentação da Tese ..... 17**

**1 Introdução: Função e especificidades da proteína Importina-α e NLSs no processo de importação nuclear. ..... 18**

1.1 Transporte intracelular de macromoléculas. ..... 18

1.2 A proteína Impα ..... 22

1.3 Isoformas e especificidades da Impα em diferentes organismos ..... 23

1.4 Importina-α do fungo *N. crassa.* ..... 26

1.5 Sequências de Localização Nuclear ..... 28

1.6 Potenciais peptídeos NLSs presentes em proteínas relacionadas ao metabolismo de fungos filamentosos ..... 29

**2 Objetivos ..... 31**

**3 Material e Métodos: Identificação e caracterização de NLSs ..... 32**

3.1 Clonagem das proteínas MmImpα e NcImpα recombinantes. ..... 34

3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes ..... 35

3.3 Predição e síntese de potenciais NLSs. ..... 36

3.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) ..... 36

3.5 Ensaios de Importação nuclear em células HeLa permeabilizadas com digitonina ..... 37

3.6 Cristalização ..... 38

3.7 Coleta e processamento de dados de difração de raios X. ..... 39

**4 Produção das proteínas MmImpα e NcImpα recombinantes. ..... 40**

4.1 Resultados ..... 40

4.2 Conclusão ..... 41

**5 Transporte nucleocitoplasmático do fator de transcrição NIT-2 pela NcImpα. 42**

5.1 Resultados ..... 44
5.1.1 Identificação de potenciais NLSs na proteína NIT-2. ..... 44
5.1.2 Afinidade da proteína NcImpα pelo peptídeo NIT2-NLS ..... 45
5.1.3 Transporte do peptídeo NIT2-NLS ao interior do núcleo de células HeLa permeabilizadas. 46
5.1.4 Ensaios de competição entre os peptídeos NIT2-NLS-BSA e BIMAX1-NLS-BSA. ..... 48
5.1.5 Estrutura cristalográfica do complexo NcImpα/NIT2-NLS. ..... 50
5.2 Discussão ..... 56
5.3 Conclusão ..... 58
**6 Importação nuclear do fator de transcrição PAC-3. ..... 59**
6.1 Resultados ..... 61
6.1.1 Identificação de potenciais sequências NLS na proteína PAC-3. ..... 61
6.1.2 Afinidade do peptídeo PAC3-NLS com as proteínas NcImpα e MmImpα ..... 62
6.1.3 Estrutura cristalográfica do complexo Impα/PAC3-NLS ..... 64
6.2 Discussão ..... 72
6.2.1 A proteína PAC-3 é transportada para o núcleo celular a partir do reconhecimento de uma NLS bipartida não-clássica. ..... 72
6.2.2 Diferenças entre as estruturas NcImpα e MmImpα ..... 74
6.3 Conclusão ..... 79
**7 Potenciais NLSs dos fatores de transcrição FLB-3, VEA e VOSA. ..... 80**
7.1 Resultados ..... 83
7.1.1 Identificação de potenciais peptídeos NLSs nas sequências das proteínas FLB-3, VEA e VOSA. 83
7.1.2 Afinidade dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS, VE1-NLS, VEA-NLS e VOSA-NLS com a proteína NcImpα ..... 84
7.1.3 Ensaios de Importação nuclear com os peptídeos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA ..... 88

7.2 Discussão ..... 90

7.2.1 A substituição de uma lisina por uma leucina no peptídeo VE1-NLS impede a ligação a NcImpα 90

7.2.2 O peptídeo VOSA-NLS deve se ligar a proteína Impα em uma conformação monopartida similar a NIT2-NLS. ..... 91

7.2.3 As sequências NLSs encontradas na proteína FLB-3 interagem com apenas um dos sítios da proteína NcImpα. ..... 92

7.3 Conclusão ..... 93

**8 Conclusões finais ..... 94**

**9 Referências Bibliográficas ..... 95**

**APÊNDICE A ..... 105**

**Nuclear Import Assay Tutorial ..... 105**

**APÊNDICE B ..... 110**

**APÊNDICE C ..... 127**

**APÊNDICE D ..... 150**

# Apresentação da Tese

Essa Tese foi divida em 9 capítulos. Os capítulos 5, 6, 7 e 8 descrevem os resultados obtidos e contam com uma introdução sobre cada fator de trascrição analisado e com alguns resultados já disponíveis na literatura. O conteúdo da tese está distribuído da seguinte forma:

**Capítulo 1:** Introdução do mecanismo e das moléculas que participam do transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas, destacando as especificidades da proteína Impα nesse processo.

**Capítulo 2:** Objetivos desse trabalho

**Capítulo 3:** Material e métodos, com a descrição de todas as técnicas utilizadas para a obtenção dos resultados apresentados nos capítulos posteriores.

**Capítulo 4:** Descrição da obtenção das proteínas Impα recombinantes.

**Capítulo 5:** Descrição da interação do NLS do fator de transcrição NIT2 com a proteína Impα de *Neurospora crassa*. No ínicio deste capítulo há uma breve introdução com as funções desse fator de transcrição e alguns resultados preliminares descritos na literatura.

**Capítulo 6:** Nesse capítulo são apresentados os resultados e conclusões obtidas a partir das análises da interação do fator de transcrição PAC-3 com a Impα. O capítulo se inicia com uma breve introdução do fator de transcrição PAC-3 e resultados preliminares descritos na literatura.

**Capítulo 7:** Análises da interação dos fatores de transcrição VEA, VOSA, FLB-3 com NcImpα. A introdução desse caapítulo descreve as funções desses fatores de transcrição nos fungos *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*.

**Capítulo 8:** Conclusões gerais a partir de todos os resultados obtidos.

**Capítulo 9:** Referências bibliográficas.

# 1 Introdução: Função e especificidades da proteína Importina-α e NLSs no processo de importação nuclear.

## 1.1 Transporte intracelular de macromoléculas.

O envoltório nuclear é a estrutura responsável por separar as atividades do núcleo e citoplasma (Chook e Blobel, 1999; Conti e Izaurralde, 2001; Cook *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007). No entanto, processos celulares como expressão gênica, progressão do ciclo celular e tradução exigem que moléculas transitem entre os compartimentos para que atuem em suas respectivas vias de sinalização. Esse trânsito de moléculas entre o núcleo celular e o citoplasma acontece através de mecanismos de transporte que viabilizam a passagem de proteínas pelo envoltório nuclear (Lange *et al.*, 2007; Stewart, 2007).

No envoltório nuclear, estão presentes os Complexos Poro Nucleares (Figura 1; NPCs), que são grandes estruturas, com cerca de 125 MDa, formadas por uma rede de proteínas conhecidas como nucleoporinas e que atravessam a bicamada lipídica que forma o envoltório nuclear (Sorokin *et al.*, 2007). Portanto, para entrar ou sair do núcleo, as partículas devem atravessar essas estruturas. Existem diferentes vias para a passagem de partículas pelo NPC: íons e pequenas proteínas neutras de até 9 nm atravessam por difusão passiva (Gorlich e Kutay, 1999; Keminer e Peters, 1999; Lange *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2009), partículas pequenas, com 20 a 60 kDa, são transportadas com o auxílio de nucleoporinas ou filtradas por meio de nucleoporinas seletivas (Gorlich, 1998). Entretanto, grande parte das macromoléculas necessita de um mecanismo de transporte mediado por proteínas transportadoras que reconhecem sequências de sinalização específicas e viabilizam a passagem de proteínas pelo NPC (Breeuwer e Goldfarb, 1990).

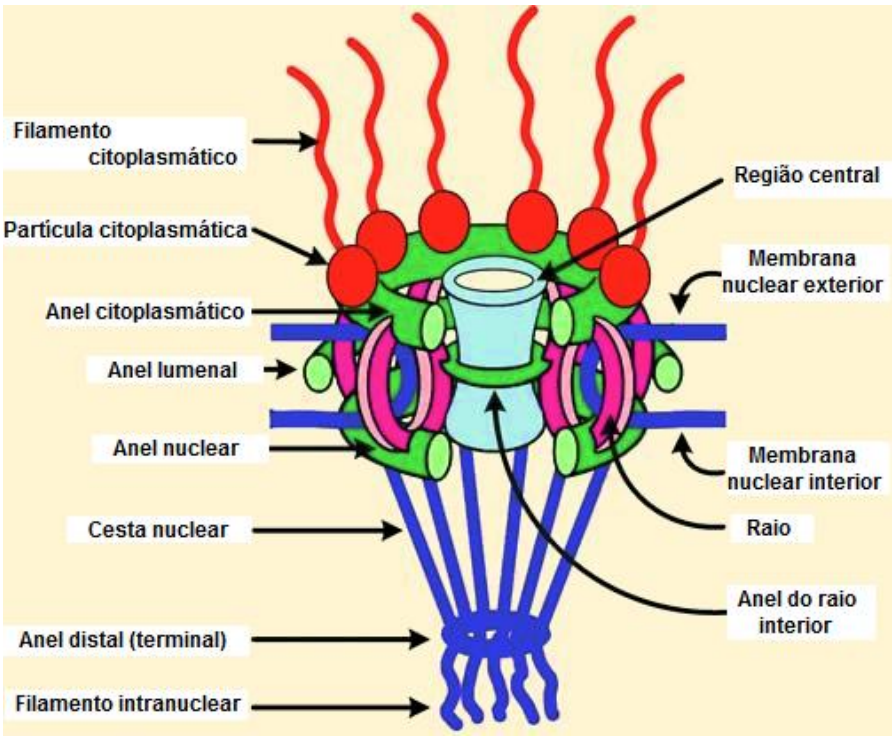



**Figura 1. Esquema ilustrado do Complexo Poro Nuclear (CPN).** Em verde, os anéis formados pelas proteínas nucleoporinas, ancorados no envelope nuclear (azul). Os filamentos das nucleoporinas voltados ao citoplasma são mostrados em vermelho e os filamentos voltados ao nucleoplasma, formando a "cesta nuclear", em azul. As unidades simétricas chamadas raios (rosa), sustentam a estrutura e formam o canal central (azul claro) (adaptado de Sorokin *et. al*., 2007).

Dentre as vias de transporte conhecidas que viabilizam o transporte de macromoléculas para dentro ou fora do núcleo através do reconhecimento de sequências de sinalização específicas, a chamada Via Clássica de Importação Nuclear é a mais bem caracterizada. Nesse processo, como ilustrado na Figura 2, proteínas pertencentes ao grupo das carioferinas, conhecidas como Importinas, são responsáveis por reconhecer e importar moléculas para o núcleo. A proteína Importina-α (Impα) atua no reconhecimento da molécula a ser transportada e apresenta uma região de ligação com a Importina-β (Impβ), denominada domínio IBB (Kobe, 1999) Na Impα, a região formada por repetições de hélices-α, denominas repetições em *armadillo* (ARMs), compreende os sítios de ligação da proteína que permitem a ligação das sequências de localização nuclear (NLS) presentes nas moléculas a serem transportadas (Dingwall e Laskey, 1991). Quando a Impα não está complexada com a Impβ, o domínio IBB funciona como um domínio auto-inibitório, ligando-se aos sítios de reconhecimento de NLSs e impedindo a Impα de interagir com outras moléculas, deixando-a inativa

(Figura 2). Para que a Impα possa participar do processo de transporte, a Impβ desloca o domínio IBB e se liga a ele, deixando os sítios de reconhecimento livres para interagir com a NLS da molécula a ser transportada. Assim, forma-se um complexo trimérico com a Impα ligada a Impβ e a molécula que contém a NLS [Figura 2; (Christie *et al.*, 2016)].

Por sua vez, a Impβ ancora-se aos filamentos das nucleoporinas que formam o NPC, impulsionando o complexo trimérico para dentro do núcleo (Figura 2). Já no núcleo, o complexo RanGTP se liga a Impβ fazendo com que esta se desaclope do domínio IBB, o qual passa a competir com a NLS pelo sítios de ligação da Impα. Como a afinidade do domínio IBB pela Impα é maior do que a afinidade das NLSs pela mesma, o domínio IBB impele a NLSs para fora dos sítios fazendo com que a molécula transportada se desacople da Impα e fique livre no núcleo. Por fim, a Impα se liga a RanGTP e a exportina CAS e assim como a Impβ volta ao citoplasma, onde a hidrólise do Ran GTP permite a liberação dessas proteínas para atuar em um novo ciclo de transporte [ver revisão em Christie *et. al*., 2016 (Figura 2).

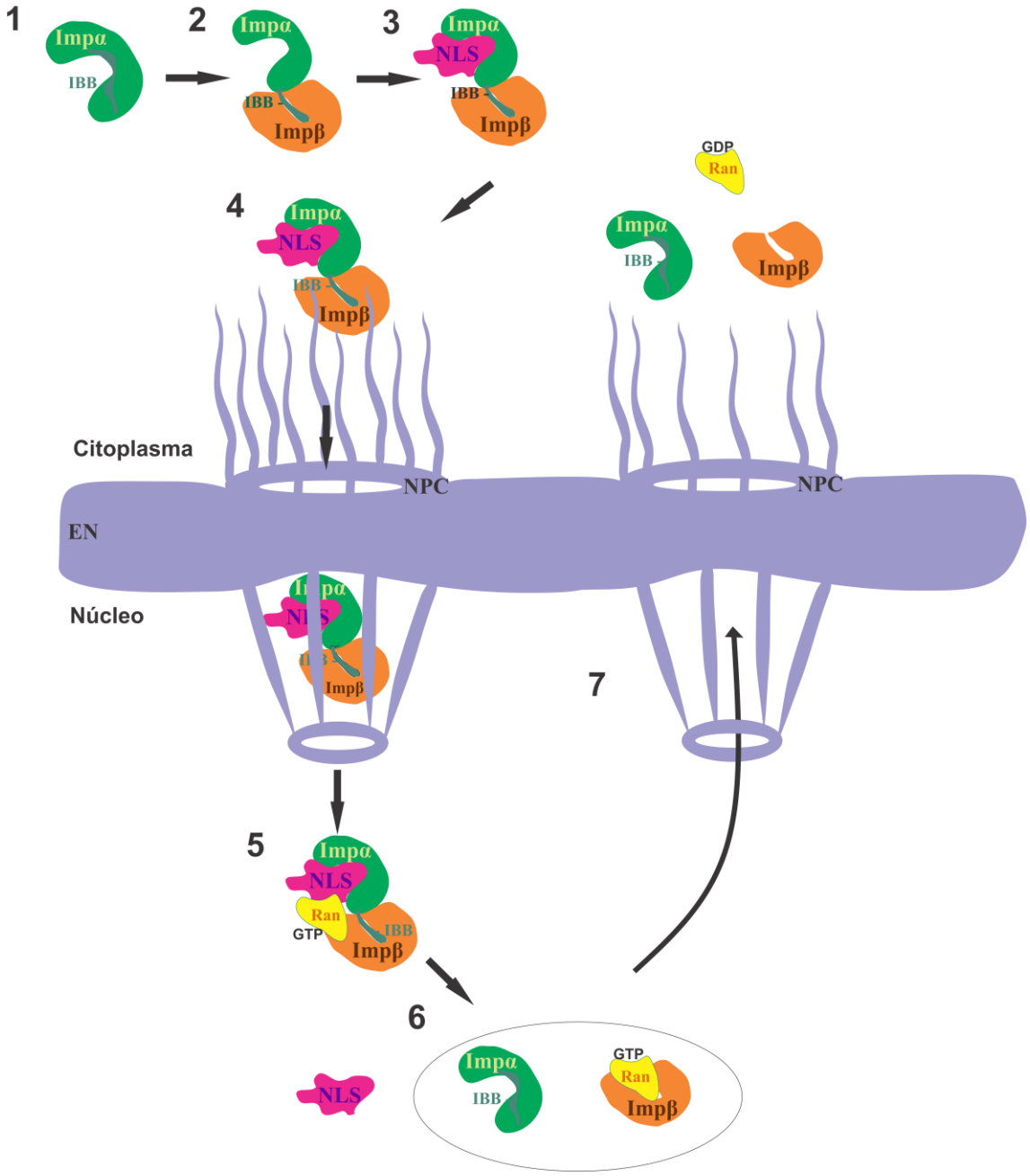



**Figura 2. Esquema simplificado da Via Clássica de Importação Nuclear.** Em 1, os sítios de interação da proteína Impα estão inibidos pelo domínio IBB o qual é deslocado pela proteína Impβ (2), permitindo que a proteína contendo uma NLS se ligue aos sítios principal e/ou secundário da Impα (3). Esse complexo trimérico atravessa o Complexo Poro Nuclear (4 e 5). Já no interior do núcleo, com o auxílio de Ran-GTP, que se liga a Impβ, o domínio IBB volta a competir pelos sítios de ligação da Impα e libera a proteína com a NLS no interior do núcleo (6). Em 7, as proteínas Impα e Impβ voltam ao citoplasma para participar de um novo ciclo de transporte. Imagem produzida utilizando o programa *CorelDRAW X8*.

## 1.2 A proteína Impα

A proteína Impα, inicialmente identificada como Importina 60, pertence à família das proteínas chamadas carioferinas (Gorlich *et al.*, 1995),. Apresenta cerca de 55 kDa e participa ativamente do mecanismo de transporte de macromoléculas para o interior do núcleo celular, através do reconhecimento de NLSs presentes nas moléculas a serem transportadas. A Impα funciona como um "adaptador", ligando-se ao NLS da macromolécula a ser transportada e depois se ancorando a Impβ, que media a passagem do complexo através do NPC (Christie *et al.*, 2016).

Com a elucidação da estrutura molecular da Impα de organismos-modelo como *Saccharomyces cerevisiae* [ScImpα; (Conti *et al.*, 1998)] e *Mus musculus* [MmImpα; (Kobe, 1999)], foi possível observar dois principais domínios funcionais responsáveis pela atuação da proteína no mecanismo de transporte celular via reconhecimento de NLSs: o primeiro consiste em uma curta sequência N-terminal envolvida na ligação com a Impβ e formação do complexo de transporte [domínio IBB- *Importin beta binding*; (Gorlich e Mattaj, 1996; Kobe, 1999)] e outro, formado por dez repetições em armadilho (ARM) que formam os dois sítios de ligação para sequências NLSs (Gorlich *et al.*, 1994; Peifer *et al.*, 1994; Kobe, 1999), o sítio principal e secundário. Os motivos ARM são normalmente constituídos por três hélices-α (H1, H2 e H3) que, devido à angulação que formam entre si, determinam a estrutura curva e alongada da proteína (Kobe, 1999; Andrade *et al.*, 2001). Nas hélices H3 encontram-se resíduos de triptofano e asparagina que formam uma superfície ideal para a ligação de NLSs.

Os motivos ARM estão presentes exclusivamente em organismos eucariotos, enquanto os motivos HEAT, que formam a proteína Impβ são encontrados tanto em eucariotos quanto procariotos. A similaridade desses motivos e a distribuição nos diferentes organismos sugerem que ambos surgiram de um ancestral comum e que a Impα surgiu para refinar as funções de uma Impβ ancestral (Goldfarb *et al.*, 2004).

A elucidação da ScImpα nativa e complexada a SV40-NLS permitiu caracterizar a ligação da proteína com NLSs e sugeriu sua participação no mecanismo de transporte nuclear na forma homodimérica (Conti *et al.*, 1998). Posteriormente, com os estudos da proteína de MmImpα, verificou-se que, para efetuar a importação de proteínas para o núcleo, a Impα, na forma monomérica, forma um complexo com a proteína Impβ, resultando em um heterodímero (Kobe, 1999). Nesse mesmo trabalho, reconheceu-se o

mecanismo autoinibitório da Impα, quando nativa, onde a sequência N-terminal (domínio IBB) interage com o domínio formado pelas repetições dos motivos ARM.

Estruturas cristalográficas da Impα de diferentes organismos já foram elucidadas [*Mus musculus* (Kobe, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Conti *et al.*, 1998), *Homo sapiens* (Cutress *et al.*, 2008), *Oryza sativa* (Chang *et al.*, 2012)]. No entanto, a estrutura da Impα de *N. crassa*, recentemente elucidada por nosso grupo, é a primeira estrutura da Impα de um fungo filamentoso disponível [NcImpα; (Bernardes *et al.*, 2015)]. A elucidação da estrutura da proteína NcImpα permitiu identificar sua interação com a sequência de localização nuclear clássica SV40-NLS, o que possibilitou uma caracterização inicial das especificidades das interações da NcImpα com este peptídeo NLS em relação à outras Impα. No entanto, especificidades no processo de importação nuclear pela proteína NcImpα poderão ser caracterizadas através da elucidação da estrutura da NcImpα complexada a peptídeos NLS específicos de fungos.

## 1.3 Isoformas e especificidades da Impα em diferentes organismos

A Impα apresenta uma estrutura conservada em diferentes organismos, sendo que alguns destes apresentam mais de uma isoforma da Impα. Pela análise das sequências dessas proteínas, foi possível classificá-las em três famílias: α1, α2 e α3 [Figura 3; (Kohler *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 2002)]. O processo de diferenciação das isoformas da proteína Impα está relacionado com o desenvolvimento dos organismos multicelulares e consequente diferenciação de órgãos e tecidos (Mason *et al.*, 2002). Enquanto em *S. cerevisiae* e *N. crassa* apenas uma isoforma da Impα foi identificada [Figura 3; (Conti *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2002), em *H. sapiens* e outros vertebrados são conhecidas sete isoformas da Impα, que são fundamentais em diferentes estágios de desenvolvimento dos organismos (ver revisão em Pumroy & Cingolani, 2015). Nesse grupo algumas características específicas de cada isoforma já foram encontradas como, por exemplo, a isoforma α6 que é expressa exclusivamente em testículos (Kohler *et al.*, 1997), enquanto a isoforma α8, que foi recentemente identificada, é preferencialmente expressa em ovários e estágios embrionários iniciais, além de estar superexpressa em algumas formas de câncer de próstata (Tejomurtula *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010; Kelley *et al.*, 2010; Laurila *et al.*, 2014). Outras isoformas estão expressas em quase todos os

tecidos de organismos adultos, porém, a concentração destas em diferentes estágios de desenvolvimento pode variar (Yasuhara *et al.*, 2007).

Pequenas diferenças estruturais, mas que se tornam significativas no reconhecimento de NLSs foram identificadas nas isoformas humanas. Estudos recentes mostraram que as isoformas α1 e α3 se ligam de forma diferente a proteína RCC1 e isso se deve a diferenças na estrutura tridimensional das isoformas, onde α3 adota uma conformação mais aberta que permite acomodar a porção N-terminal da proteína RCC1 (Sankhala *et al.*, 2017). Apesar de se pensar que os motivos ARM são mais rígidos do que os motivos HEAT da Impβ, experimentos com dinâmica molecular mostraram que a Impα3 humana é muito mais flexível do que a Impα1 de camundongo e Impα7 humana (Pumroy *et al.*, 2015). A isoforma α5 também apresenta uma diferença estrutural característica que é o "desdobramento" do motivo ARM 10 em algumas estruturas, o que também confere afinidade a NLSs específicos (Tarendeau *et al.*, 2007).

As diferenças estruturais das isoformas da Impα em organismos menos complexos ainda não são tão bem caracterizadas. Estudos com uma das isoformas da Impα da planta *O. sativa* indicaram a especificidade da proteína a determinados NLSs (Chang *et al.*, 2012). Nesse trabalho, NLSs que foram indicados como específicos de plantas por Kosugi e colaboradores (Kosugi, Hasebe, Tomita, *et al.*, 2009), se ligaram ao sítio secundário na Impα de arroz e ao sítio principal da Impα de camundongo. Uma das hipóteses para essa ligação diferencial é a presença de resíduos não conservados na região C-terminal das isoformas da Impα, que viabilizam a interação dos NLS ecpecíficos de plantas ao sítio secundário (Chang *et al.*, 2012). Outros NLSs específicos de plantas também já foram identificados em algumas proteínas, como os NLSs da proteína de virulência de *Agrobacterium tumefaciens* e o NLS da proteína de levedura Matα2 que se liga apenas a Impα de planta e de levedura (Hicks e Raikhel, 1995; Smith *et al.*, 1997; Tzfira *et al.*, 2000).

As diferenças entre as isoformas da Impα também são determinantes para o reconhecimento de proteínas virais, sendo está uma área de pesquisa que está em ascensão. Estruturas da Impα complexada a proteínas dos vírus Influenza A, HIV, Epstein-Barr e Ebola, mostraram que além desses vírus utilizarem o transporte nucleocitoplasmático do hospedeiro para atingir e modificar o DNA, alguns vírus apresentam especificidades por determinadas isoformas (Ni e Yu, 2007; Xu *et al.*, 2014; Pumroy *et al.*, 2015; Nakada *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2017). Um exemplo é a proteína

PB2 de Influenza: as linhagens aviárias do vírus utilizam a Impα3 para transportar a proteína, enquanto as linhagens que se adaptaram em mamíferos, a proteína PB2 se liga a Impα7, o que se sugere ser um mecanismo de adaptação para a transferência de vírus entre espécies (Pumroy *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a identificação das diferenças entre as isoformas da Impα fornece informações importantes quanto a regulação de processos de desenvolvimento e mecanismos patogênicos em diferentes organismos.

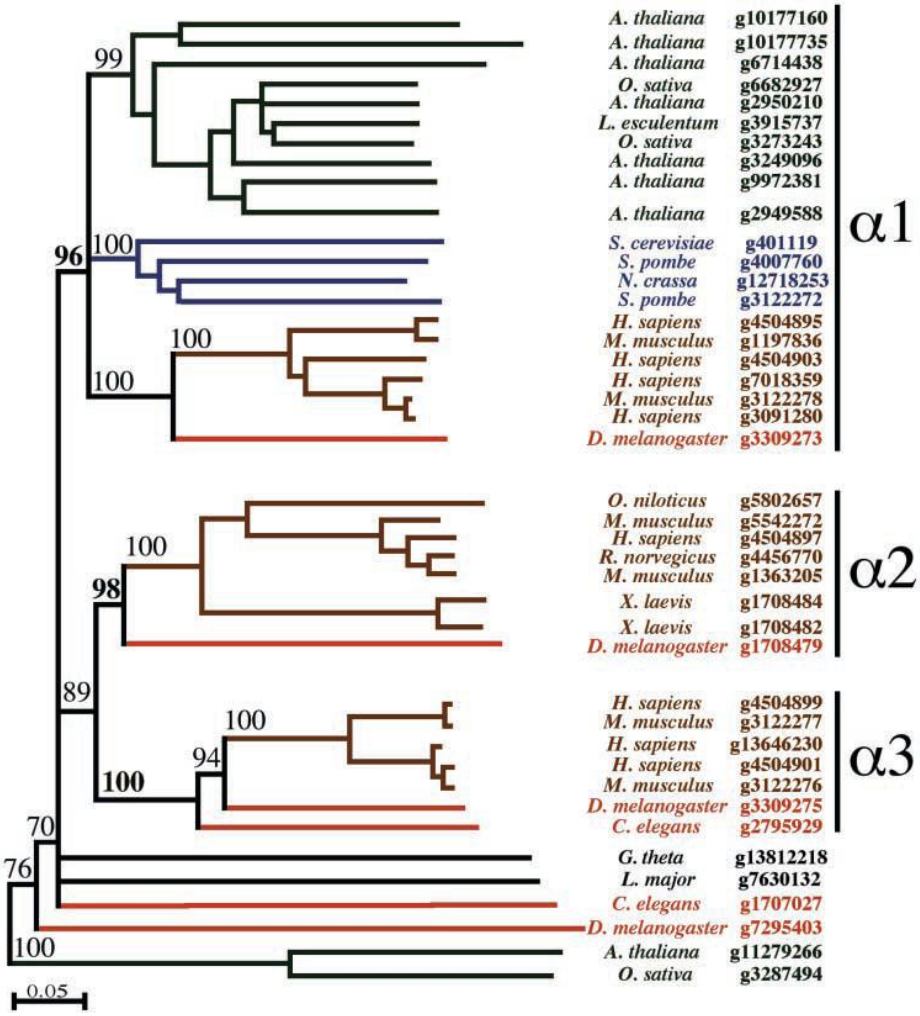



**Figura 3. Filogênia das Impα.** Alinhamento das sequências da proteína Impα foram usados para construir a filogenia. A figura mostra a árvore-consenso dessas sequências da Impα, na qual os domínios ARM são homólogos. Valores de *Bootstrap* são representados como uma porcentagem de 1000 replicações. Espécies, número de identificação das proteínas (PID) e as nomenclaturas α1, α2 e α3 para os genes convencionais são indicados. Genes de vertebrados estão em marrom, invertebrados em vermelho, plantas em verde e fungos em azul. Adaptado de Mason *et. al*.,2002.

## 1.4 Importina-α do fungo *N. crassa.*

O fungo *N. crassa*, pertencente ao filo Ascomyceta, é um fungo filamentoso amplamente empregado como modelo para estudos de biologia celular e molecular. No século 19, estudos de biologia celular demostraram que os fungos filamentosos podem causar doenças em animais e plantas, tornando-os alvo de pesquisas clínicas. Em 1941, o trabalho de Beadle e Tatum (Beadle e Tatum, 1941) apresentou a relação entre genes e proteínas, através de experimentos com o fungo filamentoso *N. crassa.* A partir desta década, inúmeros trabalhos subsequentes com o fungo apresentaram importantes aspectos acerca da metilação do DNA, silenciamento gênico pós-transcricional, reparo de DNA e transporte de proteínas (Perkins e Davis, 2000). No século 20, houve um aumento do interesse nas pesquisas voltadas para questões fundamentais de desenvolvimento e crescimento dos fungos e o fato de *N. crassa* ser um fungo filamentoso multicelular, permitiu que se consolidasse como um organismo modelo, caracterizado como um sistema que permite estudar diferenciação celular e desenvolvimento além de outros aspectos das células eucarióticas (Perkins e Davis, 2000; Davis e Perkins, 2002). A descoberta do genoma de *N. crassa* (Galagan *et al.*, 2003), acelerou ainda mais a investigação de muitos aspectos da biologia desse organismo.

O transporte intracelular de macromoléculas, que compreende a via clássica de importação nuclear, ainda não é bem elucidado em fungos, mas na literatura, estudos apontam a interação da Impα de fungos com potenciais NLSs presentes em fatores de transcrição para que estes sejam transportados ao interior do núcleo (Goncalves *et al.*, 2011). Um exemplo da relevância e aplicabilidade dos estudos dos mecanismos de transporte intracelulares em fungos é o antifúngico Leptomycin B, que tem como alvo uma exportina da família da Impβ e age através da inibição dessa via de transporte (Yashiroda e Yoshida, 2003).

A proteína NcImpα, especificamente, além de sua função no transporte intracelular de macromoléculas também está relacionada a outros processos essenciais para o funcionamento celular como a formação da heterocromatina e metilação do DNA (Klocko *et al.*, 2015). Nesses processos a proteína NcImpα é responsável pela localização do maquinário da heterocromatina dentro do núcleo. Mutações nos resíduos

na porção C-terminal da proteína, nos motivos ARM 8 e 10 inviabilizam a atuação da NcImpα nesse processo (Klocko *et al.*, 2015).

A estrutura cristalográfica da proteína NcImpα complexada ao peptídeo NLS clássico SV40-NLS [Figura 4; (Bernardes *et al.*, 2015)] evidenciou as semelhanças entre as isoformas da proteína Impα na região dos sítios de interação principal e secundário, além de mostrar que a presença dos resíduos de lisina e arginina (KR) nas posições $P_{1'}$ e $P_{2'}$, do sítio secundário, e $P_3$ e $P_4$ ,do sítio principal, é imprescindível para o reconhecimento de NLSs (Bernardes *et al.*, 2015). No entanto, uma análise inicial da proteína evidenciou que a estrutura da NcImpα apresenta maior similaridade com outras Impα do mesmo grupo filogenético α1, tanto na sua estrutura quaternária, que adota uma conformação mais "aberta" do que Impα do grupo α2 quanto na presença de resíduos específicos na porção C-terminal que já foram descritos como responsáveis por especificidades da Impα no reconhecimento de NLSs (Chang *et al.*, 2012; Bernardes *et al.*, 2015).

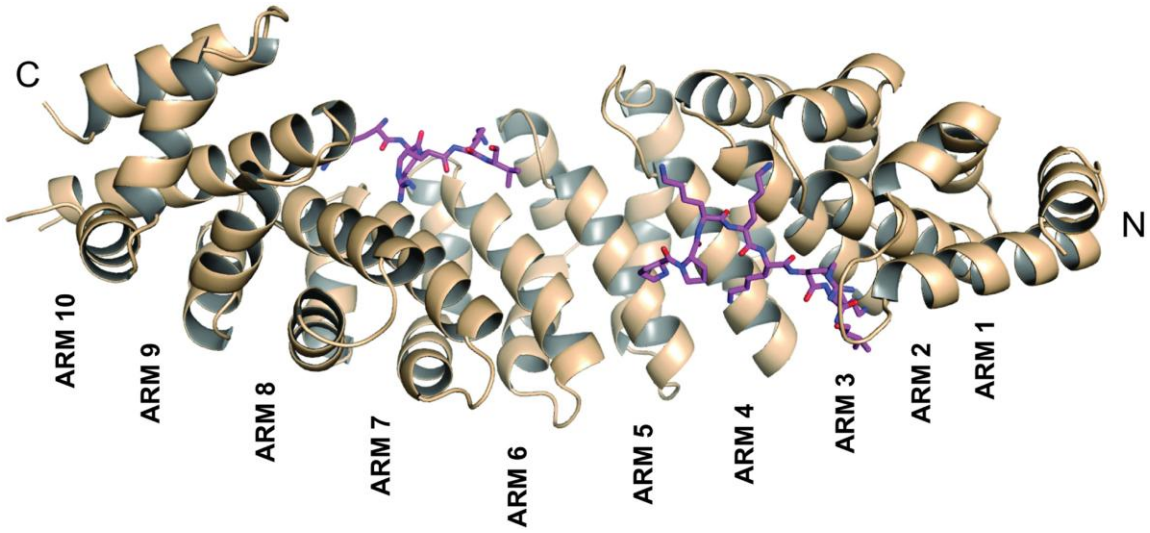



**Figura 4. Estrutura cristalográfica da proteína NcImpα.** A NcImpα está representada em diagrama de fitas (bege) complexada ao peptídeo SV40-NLS, representado em bastões (roxo). Os peptídeos estão ligados ao sítio principal (entre os motivos ARM 2 a 5) e secundário da proteína (entre os motivos ARM 6 a 8). PDB ID: 4RXH. Retirado de (Bernardes *et al.*, 2015).

## 1.5 Sequências de Localização Nuclear

As Sequências de Localização Nuclear (NLSs) são parte essencial do mecanismo de transporte nuclear mediado por Importinas. Na Via Clássica de Importação Nuclear, as proteínas que apresentam as chamadas NLSs clássicas (cNLSs) são reconhecidas pela Impα, que funciona como um adaptador para a ligação com a Impβ, a qual promove o transporte do complexo para o interior do núcleo. As cNLSs são caracterizadas pela presença de um ou mais grupos de aminoácidos básicos, especificamente lisinas e argininas (Kobe, 1999). As cadeias laterais básicas das cNLSs se acomodam entre resíduos dos aminoácidos triptofano, que formam "bolsões" hidrofóbicos na porção côncava da Impα, enquanto asparaginas estabilizam a cadeia principal das NLSs (Conti *et al.*, 1998; Conti e Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Stewart, 2006; 2007). As cNLSs são divididas em dois grupos: as monopartidas, que apresentam apenas um grupo de aminoácidos básicos e são exemplificadas pela cNLS do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40-NLS, $^{126}$P**KKKRK**V$^{132}$), e as bipartidas, exemplificadas pela cNLS da Nucleoplasmina ($^{155}$**KR**PAATKKAGQA**KKKK**$^{170}$, com a região de *linker* destacada em vermelho e os grupos de aminoácidos básicos em negrito) ou da fap-endonuclease 1 (FEN1-NLS, $^{351}$SSA**KRK**EPEPKGST**K**KKAKT$^{372}$), que apresentam dois grupos de aminoácidos básicos. As cNLSs bipartidas se ligam aos sítios principal e secundário da proteína Impα, enquanto as monopartidas se ligam apenas a um dos sítios, preferencialmente, ao sítio de ligação principal (Lange *et al.*, 2007). Nesses sítios, posições específicas são importantes para o reconhecimento de NLSs. No sítio principal, essas posições são denominadas $P_1$-$P_6$, enquanto no sítio secundário as posições são denominadas $P_1$'-$P_4$'. Ensaios de afinidade mostraram que a sequência de aminoácidos requerida para o reconhecimento das cNLSs monopartidas pela Impα deve apresentar uma lisina na posição $P_2$, seguida por resíduos básicos nas posições $P_3$ e $P_5$, conforme o seguinte padrão: K(K/R)X(K/R), sendo que X representa qualquer aminoácido (Hodel *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2007). Já as cNLSs bipartidas são caracterizados pelo seguinte padrão: KR$X_{10-12}$KRXK, onde os dois grupos de resíduos básicos (lisinas e argininas) são separados por uma região de ligação, formada por 10 a 12 aminoácidos (Dingwall e Laskey, 1991; Fanara *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2007). Apesar de grande parte das NLSs serem compatíveis com a sequência padrão descrita para caracterizar as cNLSs, em 2008, Kosugi e colaboradores propuseram a divisão das

NLSs em seis diferentes classes, sendo que as classes 1 e 2 compreendem as sequências monopartidas clássicas, que se ligam, preferencialmente, ao sítio principal da Impα, classes 3 e 4 são as NLS monopartidas que se ligam apenas ao sítio secundário, na classe 5 estão as sequências específicas de plantas e na classe 6 estão as NLS bipartidas [Tabela 1; (Kosugi, Hasebe, Matsumura, *et al.*, 2009)].

**Tabela 1. Sequências consenso das seis classes de NLSs Impα- dependentes.**

| Classe | Consenso [a] |
|---|---|
| **Classe 1** | KR(K/R)R, K(K/R)RK |
| **Classe 2** | (P/R)*XX*KR(ˆDE)(K/R) |
| **Classe 3** | KR*X*(W/F/Y)*XX*AF |
| **Classe 4** | (R/P)*XX*KR(K/R)(ˆDE) |
| **Classe 5** | LGKR(K/R)(W/F/Y) |
| **Bipartidos** | KR*X*10–12K(KR)(KR)*b*<br>KRX10–12K(KR)*X*(K/R)*b* |

[a] Nas sequências apresentadas X representa qualquer aminoácido, (ˆDE) representa qualquer aminoácido exceto ácido aspártico e ácido glutâmico e X10-12, quaiquer 10-12 aminoácidos. Adaptado de Kosugi et. al., 2009.

## 1.6 Potenciais peptídeos NLSs presentes em proteínas relacionadas ao metabolismo de fungos filamentosos.

O desenvolvimento dos fungos multicelulares é regulado por uma rede de vias bioquímicas que, por sua vez, são ativadas por determinadas proteínas específicas que atuam como fatores de transcrição. Para que essas proteínas possam ser transportadas para o interior do núcleo pela via clássica de importação nuclear e assim ativar ou silenciar genes específicos, devem apresentar ao menos uma sequência NLS.

Alguns fatores de transcrição relacionados à regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio no fungo *N. crassa*, em resposta a diferentes condições fisiológicas e ambientais foram identificados por experimentos que empregaram linhagens mutantes nocauteadas, onde foi possível verificar variações no acúmulo de carbono, de acordo com os genes silenciados. Os fatores de transcrição identificados apresentam sequências de aminoácidos característicos de potenciais NLSs e que ainda não foram analisadas.

Entender como esses fatores de transcrição são transportados para o núcleo celular, além de esclarecer como ocorre essa etapa no processo de ativação e silenciamento de determinados genes, pode contribuir com informações para o desenvolvimento de marcadores e na identificação de especificidades dos NLSs de cada organismo.

Nesse trabalho, as potenciais NLSs identificadas nesses fatores de transcrição foram submetidas a experimentos de afinidade, cristalografia e testes funcionais para verificar como ocorre a importação dessas proteínas para o interior do núcleo. A tabela 2 apresenta quais são os fatores de transcrição selecionados para a busca de NLSs. O capítulo 3 dessa tese descreve como esses NLSs foram analisados. Nos capítulos 5, 6 e 7 a função dos fatores de transcrição são descritos e os NLSs identificados em cada um são apresentados junto aos resultados obtidos a partir das análises da interação dos potencias NLSs identificados com a proteína Impα.

**Tabela 2. Fatores de transcrição selecionados para a busca de potenciais NLSs.**

| ORF | Fator de transcrição |
|---|---|
| **NCU00090** | **PAC-3** |
| **NCU03043** | **FLB-3** |
| **NCU09068** | **NIT-2** |
| **AN1052** | **VEA (A. nidulans)** |
| **AN1559** | **VOSA (A. nidulans)** |

# 2 Objetivos

O objetivo desse trabalho é comprovar que as NLSs identificadas em proteínas fúngicas são funcionais e caracterizar a interação dessas sequências com a proteína Impα a fim de entender como essas proteínas são tranportadas para o interior do núcleo das células e identificar possíveis especificidades no transporte intracelular de macromoléculas.

# 3 Material e Métodos: Identificação e caracterização de NLSs

A identificação e caracterização de potenciais NLSs em proteínas já conhecidas fornece informações significativas quanto ao mecanismo de localização e transporte dessas macromoléculas para seu respectivo sítio de ação no interior da célula. Essas informações podem tanto contribuir para o melhor entendimento da função e mecanismo de ação das macromoléculas, quanto serem aplicadas no desenvolvimento de drogas e inibidores que permitem a manipulação de vias metabólicas (Hamamoto *et al.*, 1985). Nesse trabalho, a caracterização de NLSs nos fatores de transcrição de fungos foi realizada seguindo as seguintes etapas (Figura 5):

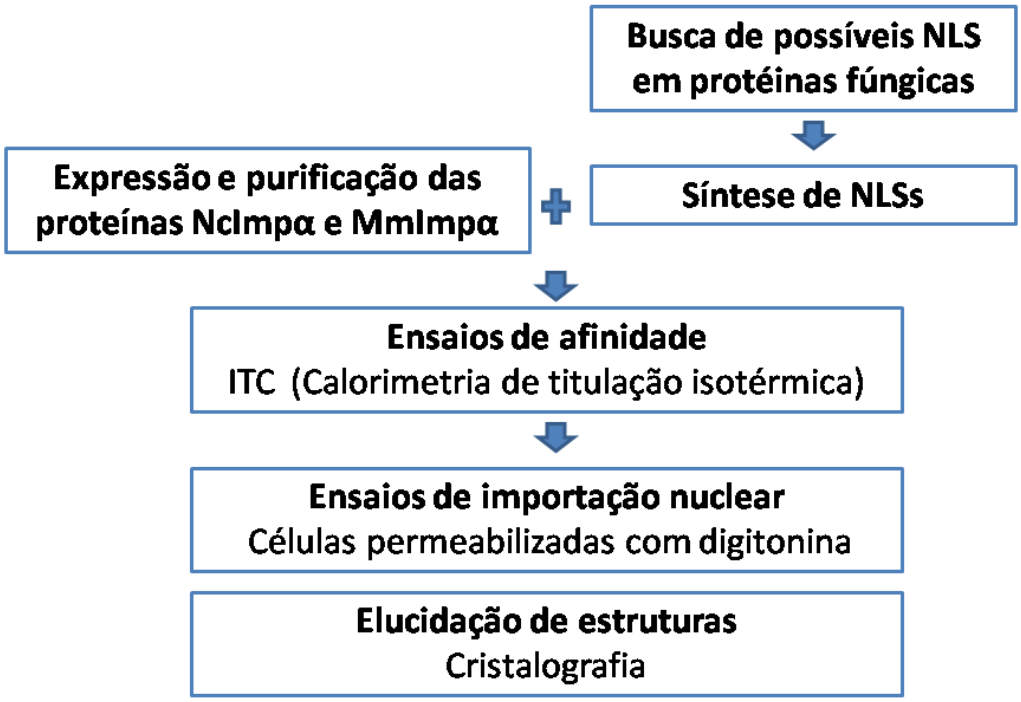



**Figura 5. Etapas para identificação e caracterização de NLSs em proteínas.**

A primeira etapa para identificação de potencias NLSs envolve a utilização de algoritmos que identificam sequências de aminoácidos que apresentam alta similaridade com os NLSs presentes em banco de dados (Kosugi, Hasebe, Tomita, *et al.*, 2009; Mehdi *et al.*, 2011; Lin e Hu, 2013). Apesar desses potenciais NLSs apresentarem uma

probabilidade significativa de serem funcionais, muitas vezes, a presença de determinados resíduos nas extremidades das sequências pode influenciar na afinidade e especificidades na interação com a Impα. Portanto, é necessário a utilização de outras técnicas para validar os resultados obtidos pelos algoritmos além de mensurar a intensidade da ligação das moléculas e a estequiometria dessa interação.

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é muito eficiente na obtenção dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação de micro ou macromoléculas, já que mede a entalpia de forma direta, ou seja, sem a utilização de reagentes intermediários (Ladbury, 2004). Através de experimentos de ITC é possível obter os valores de estequiometria, entalpia, entropia e energia livre, além das constantes de associação ou dissociação envolvidos em uma reação (Ladbury e Chowdhry, 1996). Os valores de entalpia e entropia estão relacionados, principalmente, a formação ou quebra de ligações de hidrogênio entre as moléculas que interagem ou entre estas e as moléculas de solvente (Ladbury, 2004). As constantes de associação ou dissociação ($K_a$ e $K_d$) estão diretamente relacionadas com a estequiometria da reação e apresentam a intensidade com que a reação ocorre, ou seja, valores baixos de $K_d$ indicam alta afinidade entre as moléculas enquanto valores altos de $K_d$ indicam baixa afinidade.

Nesse trabalho, os experimentos de ITC foram utilizados para verificar a afinidade dos potenciais NLSs identificados em proteínas fúngicas com a NcImpα, além de comparar a intensidade da interação em relação a outros complexos já caracterizados.

Após identificar as NLSs com alta afinidade com a Impα, é preciso considerar que a importação nuclear de macromoléculas é um processo que envolve inúmeras moléculas e fatores. No caso da via clássica de importação nuclear, além da presença de uma sequência NLS na macromolécula a ser transportada, a presença de componentes citoplasmáticos (Impα, Impβ, RanGTP) é essencial para que o processo de importação ocorra de forma eficiente (Adam *et al.*, 1990). Por isso, é interessante confirmar a funcionalidade das NLSs na presença de outros componentes citoplasmáticos da célula através de ensaios de importação nuclear realizados *in vitro*. Nesse trabalho, os experimentos foram realizados utilizando células HeLa permeabilizadas com digitonina, uma técnica utilizada a mais de duas décadas para estudar eventos bioquímicos relacionados ao transporte de macromoléculas através do envelope nuclear (Adam *et al.*, 1990). O peptídeo BIMAX1 foi utilizado como controle e competidor, uma vez que este

NLS é amplamente conhecido por ser importado com elevada eficiência para o núcleo pela Impα (Kosugi *et al.*, 2008).

Por fim, as estruturas cristalográficas dos complexos Impα/peptídeosNLS já elucidadas forneceram informações importantes sobre a interação de NLSs junto a Impα, consequentemente, sobre os mecanismos envolvidos no transporte intracelular de macromoléculas (Christie *et al.*, 2016). As estruturas da proteína Impα presente em bancos de dados são provenientes dos seguintes organismos: *H. sapiens* (Nardozzi *et al.*, 2010), *M. musculus* (Fontes *et al.*, 2000), *S. cerevisiae* (Conti e Kuriyan, 2000), *O. sativa* (Chang *et al.*, 2012), *Arabidopsis thaliana* (Wirthmueller *et al.*, 2015) e *N. crassa* (Bernardes *et al.*, 2015). Sendo que, a identidade dessas isoformas com a proteína NcImpα é de, no máximo, 64,69% (Takeda *et al.*, 2013). A estrutura da proteína NcImpα complexada a um peptídeo NLS clássico [NcImpα/SV40-NLS; (Bernardes *et al.*, 2015)] mostrou a elevada similaridade da estrutura da proteína com outras isoformas da proteína. Nesse trabalho apresentamos a estrutura cristalográfica da proteína NcImpα junto a um peptídeo específico de fungo, a fim de caracterizar o transporte intracelular da macromolécula em questão, além de observar possíveis especificidades.

## 3.1 Clonagem das proteínas MmImpα e NcImpα recombinantes.

O cDNA da proteína Impα de *N. crassa* (NcImpα) foi clonado e cedido pela Dra. Fernanda Zanolli Freitas, do grupo da Profª Maria Célia Bertolini do Departamento de Química da UNESP de Araraquara. A clonagem foi realizada através da inserção do cDNA da proteína truncada em pET28A (Novagen) e a expressão em *Eschericia coli*, linhagem Rosetta (DE3) pLysS (Novagen). A proteína recombinante foi produzida fusionada a uma cauda de histidina e truncada, através da exclusão da porção N-terminal correspondente ao domínio auto-inibitório, para impedir que esse domínio impedisse a interação dos NLSs aos sítios da proteína:
$^{1}$MADRYIPEHRRTQFKAKSAFKPDELRRRREEQQVEIRKAKREENLAKRRGIGA GDSRPGASLGAAPDSDDENPP$^{74}$.

A sequência da proteína Impα de *M. musculus*, também truncada (70-529), foi clonada no vetor pET-30a (Novagen) junto a uma cauda de histidina. O vetor foi

inserido em *E. coli*, linhagem BL21(DE3) pLysS. As bactérias já transformadas foram cedidas por nosso colaborador, Prof. Kobe, da Universidade de Queensland, Austrália.

## 3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

A bactéria *E. coli* contendo o plasmídio de expressão pET28a ou pET30a (de acordo com a proteína a ser expressa), armazenada como cultura permanente em nitrogênio líquido (-196 °C), foi pré-inoculada em tubos cônicos contendo 15 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido e 15 μL dos agentes de seleção cloranfenicol e canamicina (50 mg/ml). O pré-inóculo foi mantido sob agitação a 140 rpm, 37 °C, por 12 h para crescimento da cultura. Em seguida, o conteúdo dos tubos foram dispensados em *erlenmeyers* contendo 500 mL de meio LB líquido e 500 mL dos antibióticos cloranfenicol e canamicina (a 50 mg/ml) e mantidos sob agitação a 140 rpm, 37 °C até atingir a densidade óptica Abs600 = 0,6, medida em espectofotômetro. Após essa etapa, foi adicionado aos *erlenmeyers* 5 mL de IPTG (Isopropil β- d- tiogalactopiranosídeo) a 100 mM, para indução da produção da proteína recombinante. Os *erlenmeyers* foram submetidos a agitação a 140 rpm, 28 °C, por 4 h. Ao fim desse período, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 11,5 g por 30 min para sedimentação das células bacterianas, permitindo a separação destas (*pellets*) do meio de cultura. Os *pellets* obtidos após a centrifugação foram submetidos á lise celular para ruptura das células bacterianas e obtenção da proteína solúvel, através da resuspensão das células com a adição de tampão com 50 mM de Hepes, pH 7, 150 mM de Imidazole, 500 mM de NaCl contendo lisozima, DNAse, RNAse e 1 μg/ml de inibidores de proteases (Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina). A solução foi mantida em gelo, por cerca de 1 h e agitada, periodicamente. Ao fim desse período, a solução foi centrifugada a 11,5 g, por 30 min, 4 °C e a porção sobrenadante, onde espera-se encontrar a proteína solúvel, foi armazenada para a etapa posterior de purificação por cromatografia líquida.

A purificação da proteína contida no extrato obtido após a lise celular foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de níquel His-TrapHP (GE Healthcare), acoplada ao aparelho ÄKTA Purifier System (GE Healthcare). Após a injeção do extrato na coluna, foi realizada a eluição de moléculas com ligação inespecífica através da passagem de tampão A contendo 20 mM de Hepes pH 7,0, 1 M de NaCl e 15 mM de imidazol. Posteriormente, as proteínas NcImpα e MmImpα foram

eluídas e coletadas em frações de 1,0mL, através do fluxo de tampão A junto a um gradiente de 0 a 100 % de tampão B contendo 20 mM de Hepes pH 7,0, 500 mM de NaCl e 300 mM de Imidazol. Os picos de eluição observados através dos cromatogramas obtidos foram coletados separadamente e amostras de cada pico foram submetidas á análise por gel SDS-PAGE 12 % para verificação das frações mais puras. Em seguida, as frações mais puras foram submetidas á diálise para remoção do tampão com Imidazol para tampão contendo 20 mM de Tris HCl pH 8 e 100 mM de NaCl, para a manutenção da estabilidade da proteína. Para a diálise, as amostras foram armazenadas em membranas e mergulhadas em tampão, sob agitação constante a 8°C, *overnight*. Em seguida, essas amostras foram concentradas, utilizando o dispositivo de ultrafiltração *Amicon* (Millipore), e centrifugadas a 11,5 g. As amostras concentradas foram utilizadas nos experimentos posteriores.

## 3.3 Predição e síntese de potenciais NLSs.

Uma busca por sequências de localização nuclear (NLS) foi realizada a partir da sequência de aminoácidos dos fatores de transcrição NIT-2, PAC-3, FLB-3, VEA e VOSA. As sequências foram obtidas a partir da tradução das sequências de nucleotídeos obtidas no *N. crassa* database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html). Para a predição de NLSs, foram utilizados os programas cNLS Mapper (Kosugi, Hasebe, Tomita, *et al.*, 2009), PSORTII (ref) e NucImport (Mehdi *et al.*, 2011). Os peptídeos identificados através da busca em banco de dados e outros já caracterizados na literatura foram sintetizados pela empresa GenOne para garantir um grau de pureza maior do que 98 %.

## 3.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Para a realização dos experimentos de ITC foi utilizado o microcalorímetro MicroCal iTC200 (GE Healthcare) a fim de obter as constantes de afinidade relacionadas a interação da proteína NcImpα com os potenciais peptídeos NLS. As medidas foram realizadas em duplicata, titulando o peptídeo na proteína, com o peptídeo em uma concentração 10 a 20 vezes maior do que a proteína. As titulações

foram realizadas em 20 injeções de 2,0 μL com intervalo de 240 s entre cada titulação e 800 rpm de velocidade de homogeneização, a temperatura de 20 °C. Os dados foram processados pelo programa Origin 7.0 (*Microcal Software, Northampton, MA*), com a escolha do modelo de interação que apresentou o melhor ajuste da curva de titulação, para a obtenção dos valores de entalpia (ΔH), entropia (ΔS), constante de dissociação ($K_d$) e estequiometria (n) de cada interação. A afinidade entre as moléculas foi verificada a partir dos valores de $K_d$, que pode ser calculado a partir do calor de interação gerado ou absorvido por cada complexo (Ladbury e Chowdhry, 1996). A interação do peptídeo SV40-NLS com a NcImpα foi utilizada como controle nesses experimentos (Bernardes *et al.*, 2015).

## 3.5 Ensaios de Importação nuclear em células HeLa permeabilizadas com digitonina.

Os ensaios de importação nuclear foram realizados seguindo o protocolo descrito por Wu *et. al.*, 2007 (Wu *et al.*, 2007). Os peptídeos NIT2-NLS ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$), FLB3a-NLS ($^{307}$STSKKHKCKV$^{316}$), FLB3b-NLS ($^{357}$SNLRRHKKVHKPQS$^{370}$) e BIMAX1-NLS (RRRRPRKRPLEWDEDEEPPRKRKRLW) foram sintetizados conjugados a albumina de soro bovina (BSA; GenOne) e marcados com o corante fluorescente Indocarbocianina (Cy3; NIT2-NLS-BSA-Cy3, FLB3a-NLS-BSA, FLB3b-NLS-BSA e BIMAX1-NLS-BSA-Cy3) através da adição de tampão bicarbonato de sódio 0.1-M, pH 9.3, a uma solução contendo os peptídeos conjugados NLS-BSA (2 mg/mL) junto ao Cy3. A concentração final dos peptídeos conjugados com BSA e marcados com Cy3 foi quantificada usando espectofotômetro ao comprimento de onda de 280 nm.

As células HeLa (American Type Culture Collection) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (HyClone) suplementado com 9 % de soro fetal bovino (Sigma), penicilina-estreptomicina, piruvato de sódio 1 mM (CellGro), L-glutamina 2 mM (CellGro), a 37 °C, em uma incubadora contendo 5 % $CO_2$. As células HeLa foram semeadas em lâmínulas de vidro até atingirem 60-70 % de confluência, em cerca de 24 h. Após este período, as lâminulas de vidro contendo as células HeLa confluentes foram lavadas com tampão de importação (HEPES 20 mM, pH 7,4, acetato de potássio 110 Mm, EGTA 1 mM, acetato de sódio 5 mM, acetato de magnésio 2 mM e ditiotreitol 2

mM) e permeabilizadas com digitonina 20 μg/mL á temperatura ambiente, por 3 minutos. Depois de lavagens adicionais com o tampão de importação, as lâmínulas contendo as células permeabilizadas com digitonina foram incubadas com a mistura de importação contendo os peptídeos marcados com CY3, por 30 min, a 37°C na presença ou ausência de 20% de citosol exógeno (material citoplasmático obtido a partir do rompimento de reticulócitos de coelho, Promega) e um sistema de regeneração de energia (ATP 0,4 mM, GTP 0,45 mM, fosfocreatina 4,5 mM e 18 U $mL^{-1}$ de fosfocreatina kinase (all from Sigma). Para prevenir ligações não-específicas, 1.6 mg/mL BSA (Sigma) foi adicionado. Inibidores de proteases (quimostatina, leupeptina, antipaína e pepstatina; Sigma) a 10 μg/mL também foram adicionados. As células foram então lavadas com PBS, fixadas com 3% de paraformaldeído, e montadas com o reagente *Prolong Gold antifade* contendo DAPI (Invitrogen). Dextrano (Invitrogen), foi usado como controle para garantir a permeabilização da membrana plasmática, mas não da membrana nuclear. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência. Para quantificar a importação nuclear da carga marcada por fluorescência, a razão de fluorêscência nuclear/citoplasmática foi determinada, através da medição da intensidade de fluorescência nuclear e citoplasmática usando ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) de acordo com Schedlich *et al*., 2000 (Schedlich *et al.*, 2000). O resultado final para cada peptídeo testado é a média da razão de fluorescência entre núcleo e citoplasma de um total de 100 a 200 celúlas provenientes de três experiemntos independentes. Os dados foram submetidos ao programa PRISM para a realização de análises estatísticas (teste t-student) e obter o gráfico final.

## 3.6 Cristalização

Os primeiros testes de cristalização dos complexos Impα/peptídeos NLS foram realizados utilizando o Kit de cristalização *Screen JCSG + suíte (Jena Bioscience)*, além da mesma condição de cristalização dos complexos NcImpα/SV40-NLS (Bernardes *et al.*, 2014). Para montar as gostas de cristalização, utilizou-se as proteínas NcImpα e MmImpα concentradas a 12 e 18 mg/ml, respectivamente. Os peptídeos foram diluídos para atingir uma proporção de 1:8 em número de moléculas entre proteína e peptídeo. As placas de *sitting-drop* foram montadas utilizando o robô de cristalização de proteínas Oryx4 da *Douglas Instruments*. As placas foram armazenadas a temperatura de 4 °C e 18 °C. Os cristais obtidos foram resfriados a temperatura

criogênica e levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas-SP, para serem submetidos a difração de raios X.

## 3.7 Coleta e processamento de dados de difração de raios X.

Os melhores conjuntos de dados de difração dos complexos Impα/peptídeos NLS foram coletados utilizando o detector Pilatus 2M e o programa MXCube. Os dados foram processados pelo programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997). A modelagem das estruturas foi realizada com o programa *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) e os modelos foram refinados pelo programa PHENIX.

# 4 Produção das proteínas MmImpα e NcImpα recombinantes.

## 4.1 Resultados

A indução da expressão das proteínas NcImpα e MmImpα recombinantes pela adição de 0,1 mM de IPTG a cultura de *E.coli*, por 4 h, a 28 °C, foi satisfatória e o extrato do inóculo de cada cultura, após ser submetido a lise celular e centrifugado, gerou um sobrenadante contendo a proteína solúvel, que foi submetido a cromatografia de afinidade para a obtenção da proteína pura.

A cromatografia de afinidade foi realizada utilizando uma coluna HisTrap Talon® crude (GE Helthcare). A proteína NcImpα foi eluída em tampão contendo 300 mM de Imidazol, o que resultou em um único pico no cromatograma (Figura 6A) contendo a proteína. Após concentrar as amostras do pico, utilizando o dispositivo de ultrafiltração *Amicon* (Millipore), obteve-se a proteína com cerca de 95 % de pureza, como confirmado por gel SDS-Page 12 % (Figura 6B). A proteína MmImpα foi eluída em tampão contendo 150 mM de imidazol, o que resultou em um único pico no cromatograma, o qual foi separado em três frações (Figura 6C). As frações, analisadas por gel SDS-PAGE 12 %, apresentaram a proteína com alto grau de pureza (Figura 6D).

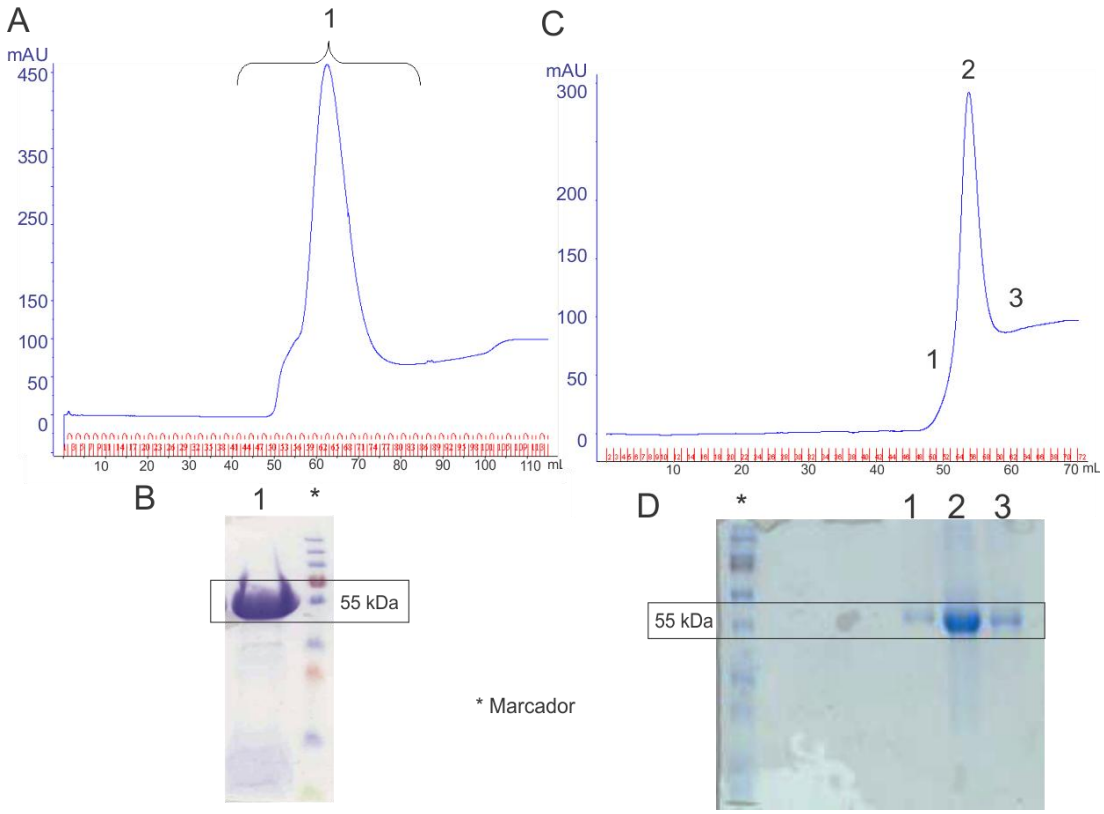



**Figura 6. Purificação das proteínas NcImpα e MmImpα por cromatografia de afinidade.** A) curva de eluição da proteína NcImpα por cromatografia de afinidade (azul), as frações eluídas estão em vermelha. B) Gel SDS-PAGE apresentando a amostra, eluída e concentrada, correspondente ao pico 1 do cromatograma. C) Curva de eluição da proteína MmImpα por cromatografia de afinidade (azul), destacando as frações 1, 2 e 3 que foram analisadas por (D) gel SDS-PAGE 12%. *Marcador de peso molecular.

## 4.2 Conclusão

As proteínas MmImpα e NcImpα, conjugadas a uma cauda de histidina, foram expressas e purificadas com alto grau de pureza através de cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de níquel e em um processo de eluição utilizando imidazol. As amostras foram usadas nos experimentos de cristalização e de calorimetria

# 5 Transporte nucleocitoplasmático do fator de transcrição NIT-2 pela NcImpα.

O fator de transcrição NIT-2, membro da família GATA é responsável pela resposta do fungo *N. crassa* a variações no ambiente, atuando no controle da ativação ou repressão do gene que codifica a nitrato e nitrito redutase em condições limitadas de nitrogênio (Goncalves *et al.*, 2011). NIT-2 atua junto a proteína regulatória NMR (regulação do metabolismo de nitrogênio). Na presença de amônia, glutamina e glutamato, que são as fontes de nitrogênio preferencialmente utilizadas pelos fungos, NMR se liga a NIT-2 impedindo a síntese de enzimas, enquanto na presença de nitrato e nitrito, fontes secundárias de nitrogênio, NMR se desacopla de NIT-2, permitindo que a proteína ative a síntese das enzimas nitrato e nitrito resutase (Marzluf, 1997; Pan *et al.*, 1997). Em experimentos conduzidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dr. Maria Célia Bertollini da Unesp de Araraquara, cepas do fungo *N. crassa* com a presença do gene nit-2 nativo, silenciado (*Δnit-2*) ou acoplado ao gene que codifica a proteína GFP (*Δnit-2:nit-2-sfgfp*), cresceram normalmente em meio Vogel sólido [Figura 7A; (Bernardes *et al.*, 2017)]. As mesmas cepas, quando cultivadas em meio Vogel sem nitrogênio, não cresceram. Quando as cepas foram cultivadas em meio Vogel suplementado com glutamina, fonte preferencial de nitrogênio do fungo, o crescimento das culturas foi restabelecido. Ao suplementar o meio Vogel com $KNO_3$ apenas as cepas nativa e a complementada com GFP apresentaram crescimento similar, confirmando que a ausência da proteína NIT-2 inviabiliza o crescimento do fungo em condições limitadas de nitrogênio. Através de análises por microscopia de fluorescência foi possível observar a localização celular da proteína NIT-2 nas diferentes condições do meio Vogel (Bernardes *et al.*, 2017). Na ausência de nitrogênio e no meio suplementado com glutamina, o fator de transcrição NIT-2 encontra-se no citoplasma [Figura 7B; (Bernardes *et al.*, 2017)]. Em condições limitadas. em que apenas as fontes secundárias de nitrogênio estão presentes [nitrato e nitrito; (Marzluf, 1997)] o fator de transcrição NIT-2 foi localizado no interior do núcleo [Figura 7B (Bernardes *et al.*, 2017)]. Os resultados mostraram que a proteína NIT-2, além de estar relacionada com o processo de conidiação e crescimento do fungo em condições limitadas de nitrogênio, deve ser tranportada para o interior do núcleo para exercer a função de fator de transcrição e

ativar os genes que codificam proteínas responsáveis por metabolizar as moléculas de nitrato e nitrito (Bernardes *et al.*, 2017).

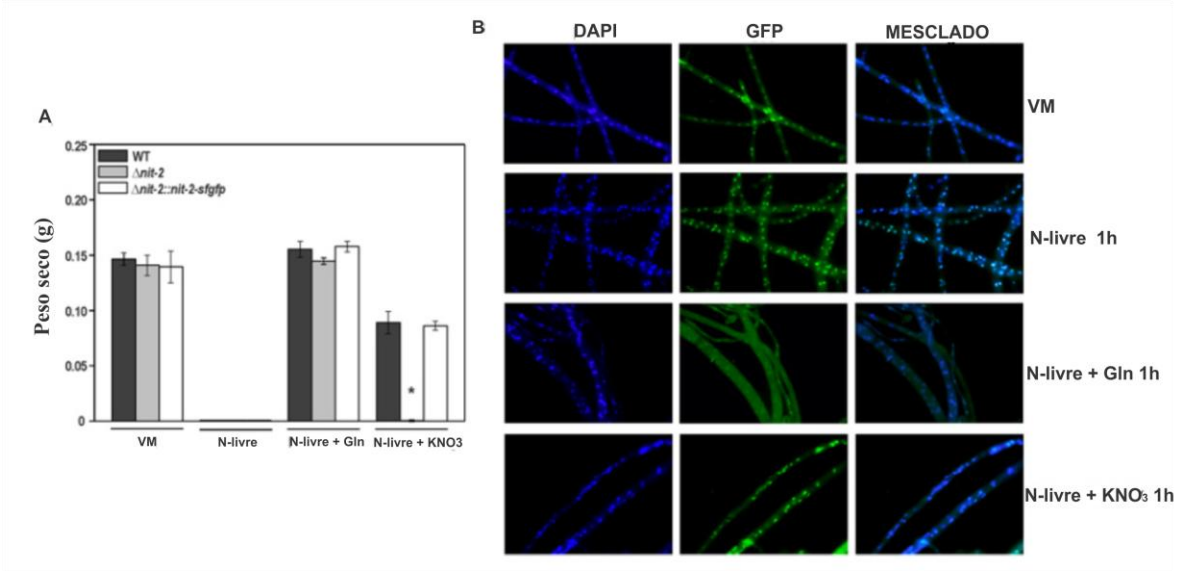



**Figura 7. Crescimento das cepas *Δnit-2* e localização da proteína NIT-2 em diferentes condições de nitrogênio.** (A) As cepas nativa, *Δnit-2*, e *Δnit-2*-complementada (2 × 107 conidia/ml) foram cultivadas em 30 ml de meio VM N-livre, N-livre + 20 mM Gln (glutamina), e N-livre + 20 mM KNO3 contendo 2% de sucrose a 30°C, 200 rpm por 24 h. As culturas foram coletadas e filtradas, e o micélio foi seco a 98°C por 16 h. A biomassa foi expressa em peso seco (g). Os resultados representam três experimentos independentes. Um asterisco indica a diferença significativa entre a cultura nativa e as outras culturas nas mesmas (t-test, $P < 0.01$). (B) Conidia (107 conidia) da cepa complementada cresceram em lâmínulas em meio VM líquido contendo 1% de sucrose a 30°C por 16h. Após este período, o micélio foi transferido para o meio N-livre por 1h, N-free com glutamina, e N-livre com KNO3 por 1 h a 30°C. O micélio foi fixado em PBS com formaldeído, os núcleos foram corados com DAPI, e a fluorescência foi visualizada. Micélio de cultura em meio VM por 16h foi usada como controle. Fluorescência foi avaliada utilizando o microscópio AXIO Imager.A2 (Zeiss) em um aumento de 100×. Os resultados representam três experimentos independentes. Escala: 10 mm. (Adaptado de Bernardes *et. al*., 2017).

Sabendo que a proteína NIT-2 tem cerca de 109,294 kDa, para que entre no núcleo é necessário um transporte mediado por proteínas transportadoras. Através de uma busca em banco de dados, foi possível identificar uma sequência de aminoácidos compatível com o perfil das NLSs clássicas (Goncalves *et al.*, 2011). Portanto, sugeriu-se que a proteína NIT-2 utiliza a via clássica de importação nuclear para ser transportada. Nesse capítulo, são apresentadas evidências que comprovam que a

potencial NLS identificada em NIT-2 é responsável pelo reconhecimento e importação da proteína ao interior do núcleo.

## 5.1 Resultados

### 5.1.1 Identificação de potenciais NLSs na proteína NIT-2.

Para realizar a busca por prováveis NLSs responsáveis pelo transporte da proteína NIT-2 de *N. crassa* para o interior do núcleo, foi utilizado a ORF NCU09068. As sequências sugeridas pelos algoritmos foram comparadas com as sequências citadas por trabalhos já publicados para que fosse feita a seleção da provável sequência NLS que seria analisada. A Tabela 3 mostra a sequência da proteína, as potenciais NLSs e a posição destas na sequência da proteína.

**Tabela 3. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína NIT-2.** Os possíveis NLSs indicados pelos programas cNLS Mapper e PSORTII são apresentados na tabela, junto a sequência na qual as buscas por NLSs foram realizadas. Em vermelho estão identificadas as NLSs sugeridas e em negrito as NLSs selecionadas para os estudos posteriores.

| ORF | Sequência da proteína | NLSs previstos |
|---|---|---|
| **NCU09068** | MAASTTTPTATTRPFFTMNPTTTEHDFRFPRRPGDSMAGTG<br>LGGAAMSSSSANNNHNQHHPMSAFNHHHHHNAAGSARG<br>RDSDGRPSSSNNNTSNGFVANINHQSSSNNNISKNIPPPTSD<br>YHTQSASNGAAAYDLLRSSAFPPFQDGLAGMTQSPDEMQ<br>KQDPLATQVWKYFAKTKLALPNQERMENLTWRMMAKPL<br>QTYRRQMETDRTHRFSESAPQKSTSGIARLRKSSEQTQSQG<br>SDLMNLDDFINGENISTPAGLSLAPSPETSSKMADDRTAHH<br>STASAI**PIKARKD**QQSQHMIPQSVPAALHHPRMQTEFGYLP<br>RHL**RKTSIDETSKRNPNRKRP**ADFSPHVSAVTPSYVTNGL<br>DADTDLHDYSLDHTSHDGLPPQTAPSSVPYALDTVGLDAD<br>TFITSAGPFQQNFSFSPSTSPMVSHDPFTAMFGPNNSSMHSG<br>PINGNNFYSPPASAFQSTASTPHPMNEGGDNFYFGVDMRR<br>ARQQPYQPGNHGMGNAMAHQFPYAGNGNMMFPASSAGQ<br>DPTPSFAAPNSFSGHIDPTQVFHNEQAVRSPGMSVLQDSLF<br>TFGAESDGDEEDGGAFADRNLSISHDFSSQGMEEPAFDSPS<br>MGWDPSLPGNFSTQAARYPGGPPRKQVTIGATTTDYVDNT<br>GEWDGSGLPRSQSQSFRQSDLRKGKMSRTASTPGLSARMN<br>PFERLAQSASHSPPADVGRSSGLSSVPASRPSSPPPGAKQGS<br>TTNLQGAAGNSTDTPTTCTNCFTQTTPLWRRNPDGQPLCN<br>ACGLFLKLHGVVRPLSLKTDVIKKRNRGSGASLPVGGTST<br>RSKKNASMSAAARKNSTLSITSNANNQPPAQVATPPAQQQ<br>VRASSVNESESPASGPASGGNTAGSTPTSYHGSTGSTSGAV<br>GGKSVIPIASAPPKSAPGPGAGSMSRRD**TISSKRQRRHSKS**<br>AGSDQPVSAGAVSSSGMDVDSPANSTGSNETMPTFNPGGA<br>FSGLPPTTQSSLGFGNGYINTPRPMVGPGGMMGMPNGQAG<br>QMMGASSSSGPGSGPSRTGAEWEWLTMSL | [287]PIKARKD[293]<br>[337]PNRKRPA[343]<br>[325]RKTSIDETSKRNPNR<br>KR[341]<br>**[915]TISSKRQRRHSKS[927]** |

*** As sequências obtidas nos banco de dados foram comparadas com as potenciais NLSs sugeridas por Gonçalves e colaboradores (Gonçalves *et. al.*, 2011).**

### 5.1.2 Afinidade da proteína NcImpα pelo peptídeo NIT2-NLS

O peptídeo correspondente ao potencial NLS do fator de transcrição NIT-2 ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) foi submetido aos experimentos de ITC em uma concentração 20 vezes maior do que a concentração da proteína NcImpα (800µM e 40µM, respectivamente). Os dados foram processados considerando um modelo de interação com dois sítios da proteína sendo ocupados pelo peptídeo (Figura 8). Os valores de $K_d$ obtidos para os sítios 1 e 2 foram de 0,56 ± 0,32 µM e 9,9 ± 1,1 µM, o que indica uma forte interação entre a proteína e peptídeo, em ambos os sítios (Tabela 4). O valor da estequiometria da reação confirma a proporção de 2:1 entre peptídeo e proteína e os valores de entalpia e entropia mostram que a reação é exotérmica e que ocorre de forma espontânea (Tabela 4).

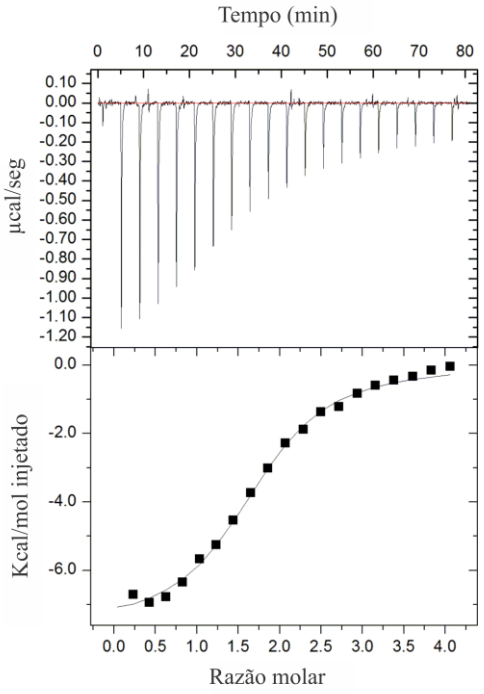



**Figura 8. Termogramas e isoterma resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica do complexo NcImpα/NIT2-NLS.**

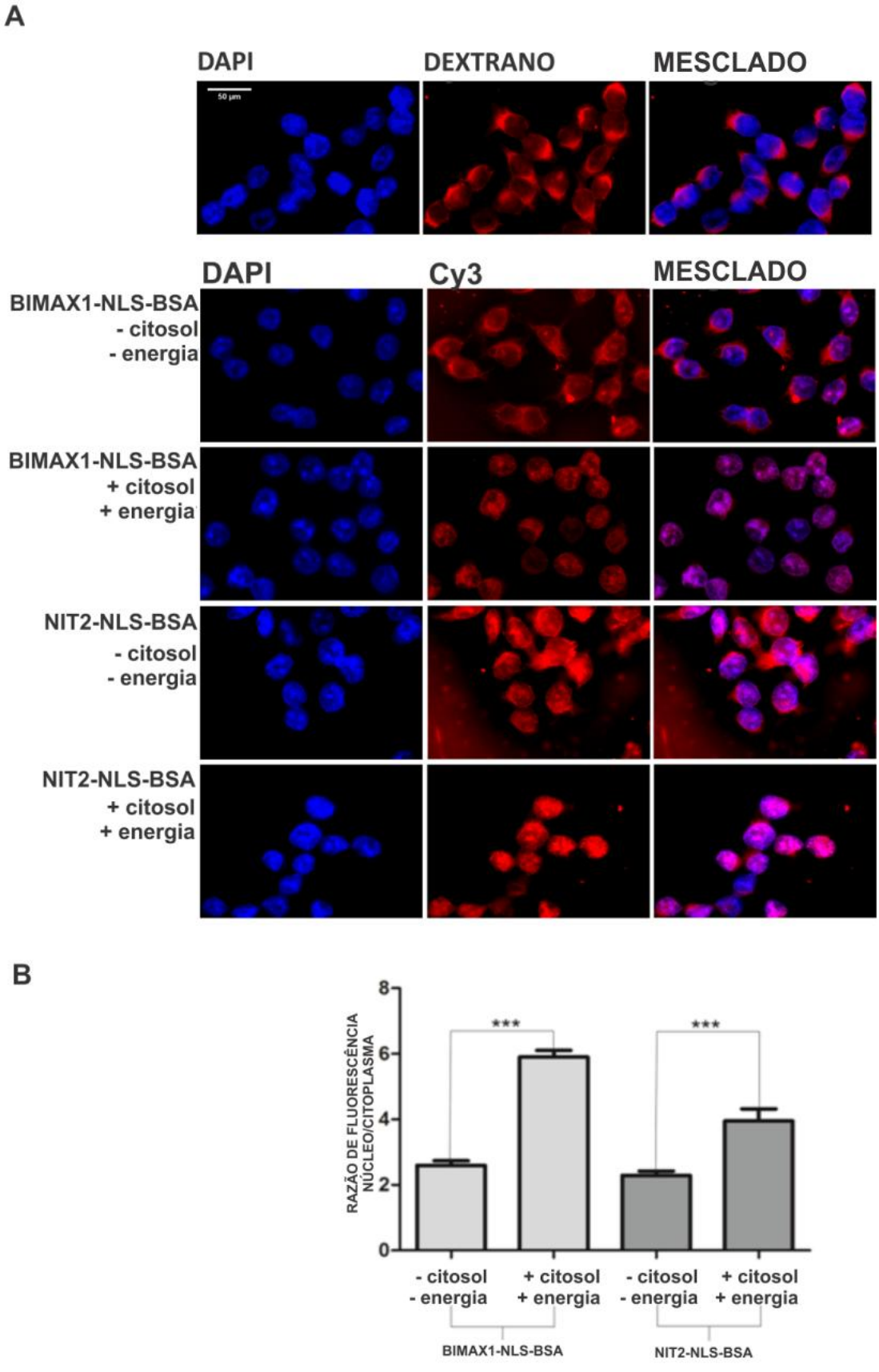
**Tabela 4. Constantes termodinâmicas obtidas pelas análises por ITC do complexo NcImpα/NIT2-NLS.**

| Complexo | n* | Kd (μM) | ΔH (Kcal/mol) | ΔS(cal/mol/deg) |
|---|---|---|---|---|
| **NcImpα/NIT2-NLS** | 0,95[1] | 0,56 ± 0,32 | -6,64 ± 0,27 | 0,24 |
| | 0,95[2] | 9,90 ± 1,10 | -7,04 ± 0,20 | 4,58 |

* estequiometria. [1] sítio 1. [2] sitio 2.

### 5.1.3 Transporte do peptídeo NIT2-NLS ao interior do núcleo de células HeLa permeabilizadas.

Através dos ensaios de importação nuclear com os peptídeos NLSs conjugados a BSA, foi possível observar a presença do complexo NIT2-NLS-BSA no núcleo das células permeabilizadas com digitonina e na presença de citosol (Figura 9A). A quantificação do transporte das macromoléculas também mostrou que a eficiência da importação do complexo BIMAX1-NLS-BSA é significativamente maior do que quando NLS fúngicos foram utilizados (Figura 9A).



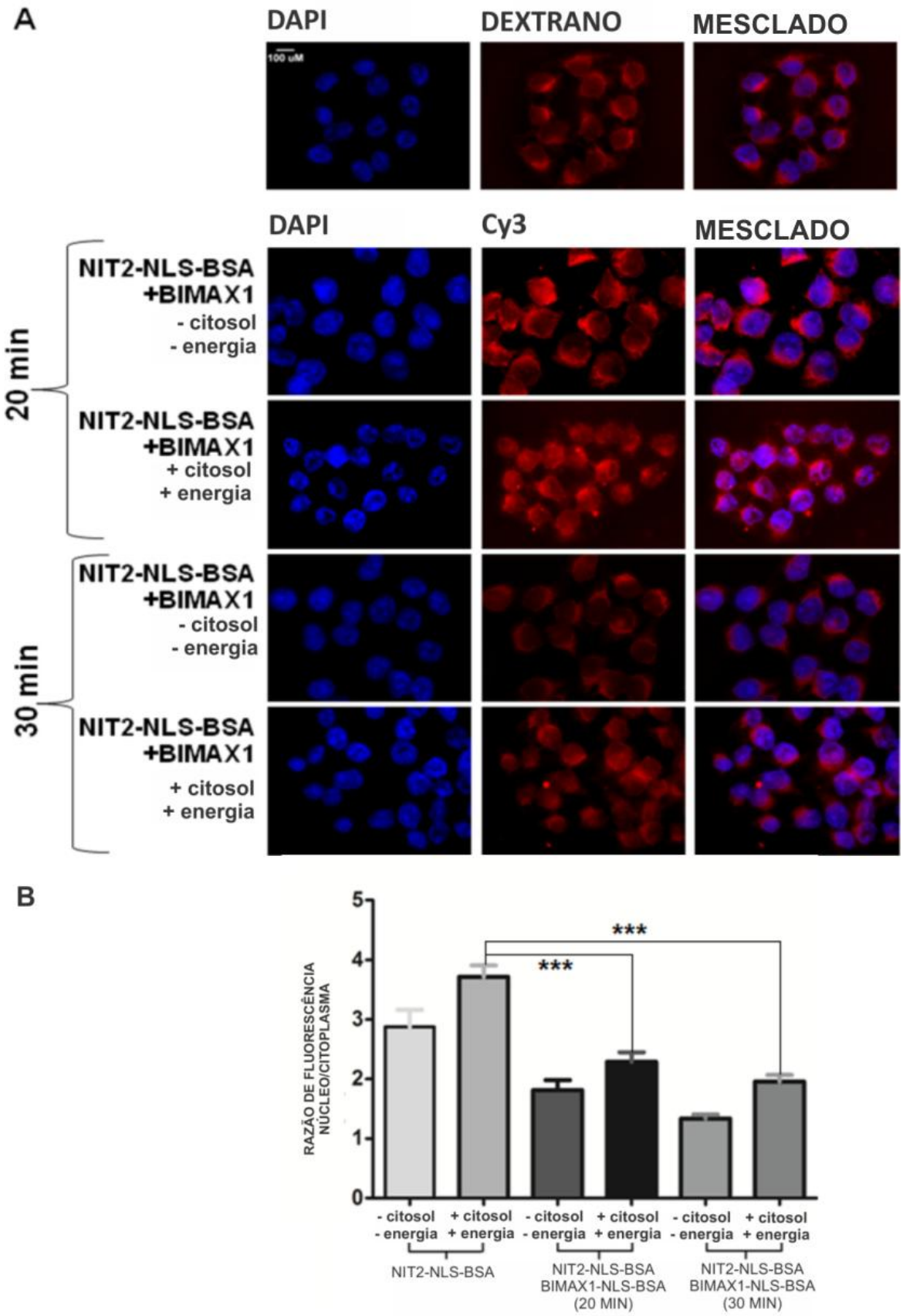

**(Legenda na próxima página)**

**Figura 9. Ensaio de importação nuclear em células Hela com os complexos BIMAX1-NLS-BSA e NIT2-NLS-BSA.** (a) Os complexos BIMAX1-NLS-BSA e NIT2-NLS-BSA marcados com Cy3 (vermelho) foram incubados em células HeLa permeabilizadas com digitonina na presença ou ausência de citosol e um sistema de regeneração de energia. O experimento controle com dextrano (70 kDa) marcado com Texas Red foi realizado para verificar que a membrana plasmática, mas não o envelope nuclear das células, foi permeabilizada pela digitonina. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e imagens representativas de três experimentos são mostradas. (b) Diagrama de barras da razão de fluorescência nuclear/citoplasmática para os experimentos mostrados em A. A quantificação foi realizada usando o programa ImageJ. São mostrados o valor médio e erro padrão da média obtida de 100-150 células para cada condição a partir de três experimentos independentes. ***p <0,05, teste de t-Student não pareado.

### 5.1.4 Ensaios de competição entre os peptídeos NIT2-NLS-BSA e BIMAX1-NLS-BSA.

Os ensaios de competição entre os peptídeos NIT2-NLS-BSA e BIMAX1-NLS-BSA foram realizados seguindo o mesmo protocolo descrito para os ensaios com apenas um peptídeo conjugado com BSA. Esses ensaios foram realizados para confirmar que o bloqueio dos sítios de ligação da proteína Impα, através da adição de um inibidor da Impα inviabiliza a translocação do complexo NLS-BSA-Cy3, confirmando que o NLS depende da Impα para ser transportado. Variações no tempo de incubação foram testados para avaliar o efeito na importação nuclear de NIT2-NLS-BSA-Cy3.

Como pode ser observado nas figuras 10A e 10B, nos diferentes tempos de incubação de 20 ou 30 minutos, a quantidade de NIT2-NLS-BSA-Cy3 no núcleo é menor do que no citoplasma, quando citosol e energia foram adicionados, indicando que BIMAX1-NLS-BSA começou a competir com NIT2-NLS-BSA-Cy3, bloqueando a importação nuclear do peptídeo (Figura 10A). Nenhuma diferença significativa foi observada nos diferentes tempos de incubação (Figura 10B).




**(Legenda na próxima página)**

**Figura 10. Ensaio de importação nuclear em células Hela com o complexo NIT2-NLS-BSA e o peptideo BIMAX1.** (A) O complexo NIT2-NLS-BSA marcado com Cy3 (vermelho) foi incubado em células HeLa permeabilizadas com digitonina na presença ou ausência de citosol e um sistema de regeneração de energia. O peptídeo BIMAX1 foi adicionado junto ao complexo NIT2-NLS-BSA para avaliar o bloqueio do transporte. O experimento controle com dextrano (70 kDa) marcado com Texas Red foi realizado para verificar que a membrana plasmática, mas não o envelope nuclear das células, foi permeabilizada pela digitonina. Foram testados dois tempos de incubação de 20 e 30 minutos. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e imagens representativas de três experimentos são mostradas. (B) Diagrama de barras da razão de fluorescência nuclear/citoplasmática para os experimentos mostrados em A. A quantificação foi realizada usando o programa ImageJ. São mostrados o valor médio e erro padrão da média obtida de 100-150 células para cada condição a partir de três experimentos independentes. *** P <0,05, teste de t-Student não pareado.

### 5.1.5 Estrutura cristalográfica do complexo NcImpα/NIT2-NLS.

O melhor conjunto de dados de difração do complexo NcImpα/NIT2-NLS foi coletado a partir do cristal da mesma condição do complexo NcImpα/SV40-NLS, composta por Bicine 0,2 mM, pH 8,5 e polietileno glicol 6000 20 % (p/v) [Figura 11; (Bernardes *et al.*, 2015)]. Para a elucidação da estrutura, utilizou-se o arquivo de coordenadas da estrutura do complexo NcImpα/SV40-NLS (Bernardes *et al.*, 2015) junto ao arquivo de reflexões resultante do processamento pelo HKL2000. As estatísticas de coleta e refinamento do complexo são apresentadas na Tabela 5.

A estrutura do complexo NcImpα/NIT2-NLS foi modelada de acordo com a presença de densidade eletrônica para os resíduos. A estrutura obtida mostra a conformação côncava da proteína, já observada em estruturas da Impα de outros organismos (Conti *et al.*, 1998; Kobe, 1999; Cutress *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2012), e constituída, predominantemente, por hélices-α que formam as repetições dos domínios ARMs (Figura 12A). Foi possível observar a presença de densidade eletrônica para o peptídeo NIT2-NLS ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) tanto no sítio principal (Figura 12B) quanto secundário da proteína (Figura 12C) sendo que, no sítio principal, foi possível modelar sete resíduos do peptídeo ($^{917}$ASKRQRR$^{923}$), que ocuparam as posições $P_0$ a $P_6$ e no sítio secundário, foi possível modelar seis resíduos ($^{918}$SKRQRR$^{923}$), ocupando as posições $P_0$' a $P_5$'.

Os peptídeos se ligaram a proteína em uma conformação estendida e antiparalela a direção das hélices dos motivos ARMs. No sítio principal, o valor médio de *B-factor* dos resíduos centrais do peptídeo (resíduos 919-922; posições $P_1$-$P_5$; *B-factor*=33,4 $Å^2$) é menor do que o *B-factor* da proteína inteira (43,3 $Å^2$), o que indica uma elevada estabilidade dos peptídeos nessa região (Tabela 6). Já no sítio secundário, os resíduos centrais do peptídeo (resíduos 919-922; posições $P_{1'}$-$P_{4'}$) apresentaram um valor de *B-factor* = 47,7 $Å^2$, ou seja, mais elevado do que o valor da proteína inteira (Tabela 6). Portanto, supõe-se que a interação do peptídeo a esse sítio é mais instável.

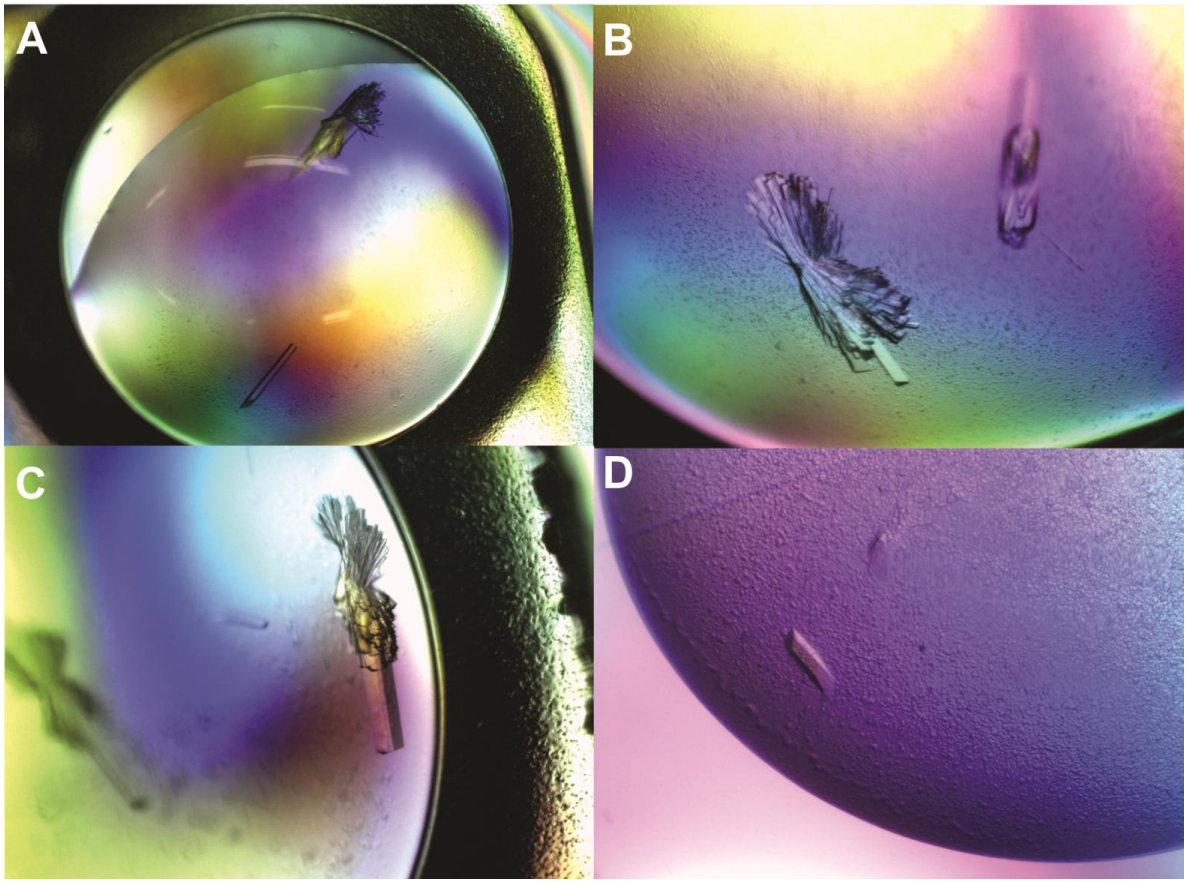



**Figura 11. Cristais do complexo NcImpα/NIT2-NLS.**

**Tabela 5. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura cristalográfica do complexo NcImpα/NIT2-NLS.**

| **NcImpα/NIT2-NLS** | |
|---|---|
| **Cela unitária (Å)** | 45,0 63,7 183,6 |
| **Grupo espacial** | P $2_12_12_1$ |
| **Resolução (Å)** | 45,9 - 2,5 (2,6 - 2,5)[a] |
| **Reflexões únicas** | 18973 (1810)[a] |
| **Dados Completos (%)** | 99,71 (97,36)[a] |
| **Multiplicidade** | 5,9 (5,9) |
| **Rmerge†(%)** | 26,3 (72,0) |
| **Média I/σ(I)** | 5,10 (1,92) |
| **$R_{cryst}$[c] (%)** | 17,95 (23,81) |
| **$R_{free}$[d] (%)** | 24,61 (32,54) |
| **Número de átomos** | 3440 |
| **Proteína** | 3160 |
| **Peptídeo** | 118 |
| **Água** | 175 |
| **Resíduos nas regiões mais favoráveis** | 98 |
| **(não permitidas) (%)** | 0,23 |
| **Fator de temperatura médio (Å$^2$)[e]** | 43,30 |

[a] Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.
[b] Rmerge = Σ*hkl*(Σ*i*(|I*hkl*,*i*-<I*hkl*>|))/Σ*hkl*,*i*<I*hkl*>, onde I*hkl*,*i* é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e <Ihkl> é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para I > -3σ (I).
[c] Rcryst = Σ*hkl*(||Fobs*hkl*|-|Fcalc*hkl*||)/|Fobs*hkl*|, onde |Fobs*hkl*| e |Fcalc*hkl*| são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados.[d] Rfree é equivalente ao Rcryst ,mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas.[e] Calculado com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

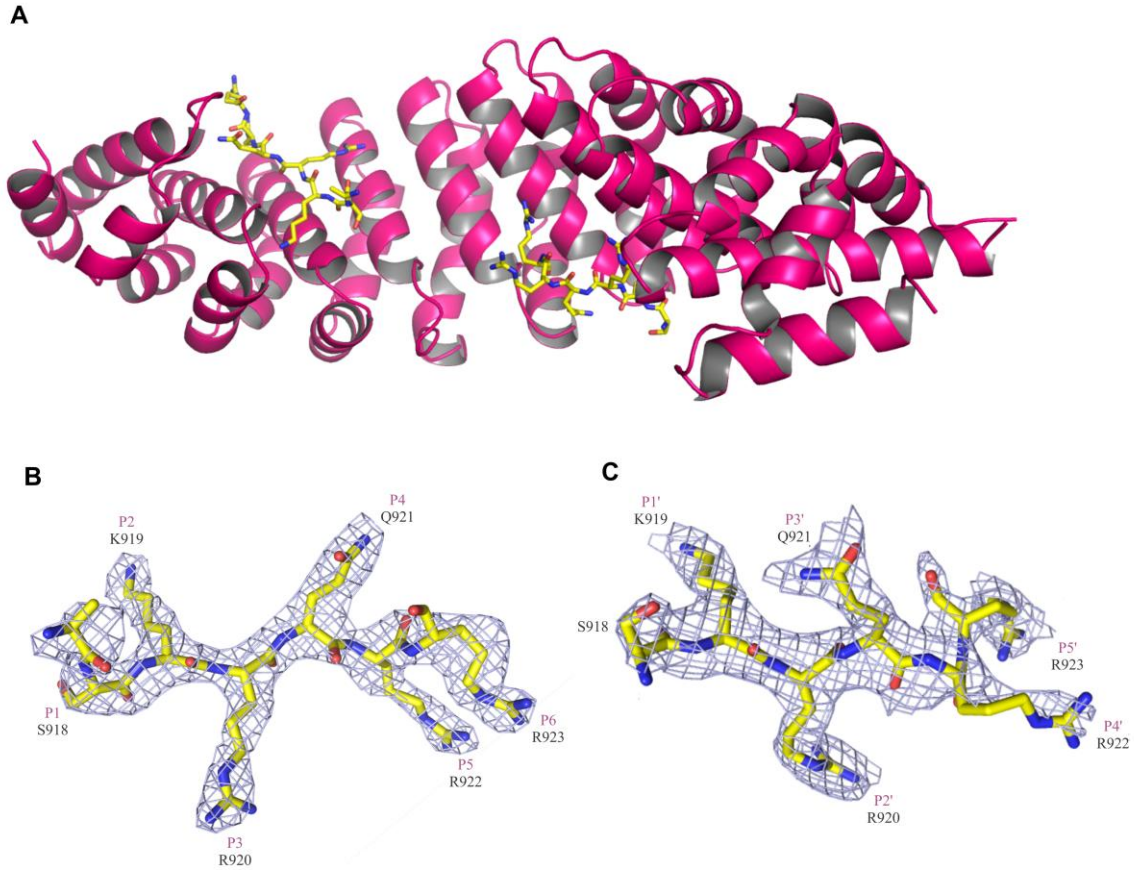



**Figura 12. Estrutura cristalográfica da proteína NcImpα complexada ao peptídeo NIT2-NLS.** A) A estrutura apresenta a conformação côncava, formada pelos motivos ARMS, característica da proteína Impα. B) Resíduos 917-923 do peptídeo NIT2-NLS ligado ao sítio principal da proteína NcImpα, posições $P_0$-$P_6$. C) Resíduos 918-923 do peptídeo NIT2-NLS ligado ao sítio secundário da proteína NcImpα, posições $P_{0'}$-$P_{5'}$. Os peptídeos estão contornodados pelo mapa de densidade eletrônica 2|Fobs|-|Fcalc| com σ=1,5. PDB ID: 5VQ1. Retirado de Bernardes *et. al*., 2017.

Dentre as interações que ocorrem no sítio principal da proteína, destaca-se a presença dos resíduos de asparagina N235, N192 e N150 que estabilizam a cadeia principal do peptídeo NIT2-NLS, enquanto os triptofanos W231, W188 e W146 acomodam as cadeias laterais dos resíduos básicos das argininas R920 e R922, através de interações hidrofóbicas [(Bernardes *et al.*, 2015; Christie *et al.*, 2016); Figura 13A]. A presença de uma lisina na posição $P_2$ (K919) também é imprescindível, como pode ser observado pelas quatro ligações de hidrogênio que esse resíduo forma com resíduos da proteína NcImpα (Figura 13A). Por fim, a glutamina Q921 na posição $P_4$ forma

ligações de hidrogênio com resíduos de lisina e leucina, o que também sugere a importância desse resíduo na formação desse complexo.

No sítio secundário, novamente, asparaginas (N361 e N319) orientam e estabilizam a cadeia principal do peptídeo, enquanto os triptofanos W399 e W357 acomodam a cadeia lateral da arginina R920. Assim como no sítio principal, o resíduo K919, agora na posição $P_{1'}$, forma algumas ligações de hidrogênio que são significativas para a estabilização do peptídeo e o resíduo de glutamina Q921,em $P_{3'}$, participa de uma interação hidrofóbica com T322 (Figura 13B).

**Tabela 6. Valores de B-factor dos resíduos dos peptídeos NIT2-NLS ligados aos sítios principal e secundário da proteína NcImpα.**

| Resíduos | Sítio principal | Sítio secundário |
|---|---|---|
| **A[124]** | 44,60 | |
| **S[125]** | 38,80 | 56,80 |
| **K[126]** | 28,20 | 36,50 |
| **R[127]** | 32,10 | 33,40 |
| **Q[128]** | 33,20 | 46,00 |
| **R[129]** | 34,60 | 74,90 |
| **R[130]** | 38,60 | 51,60 |
| **Média** | 35,72 | 49,86 |

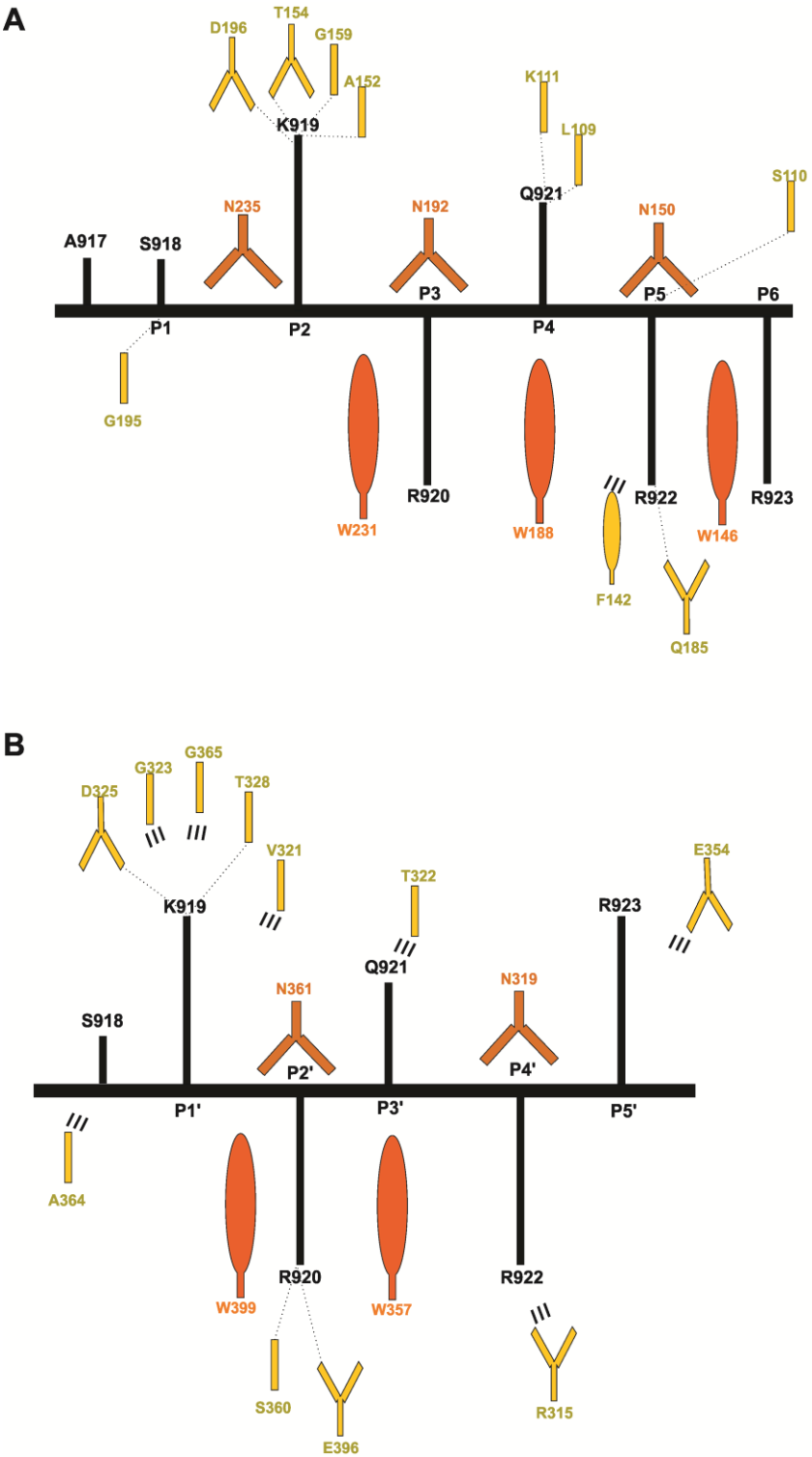



**Figura 13. Esquema representando as interações entre o peptídeo NIT2-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína NcImpα.** Em ambos os sítios, os resíduos do peptídeo NIT2-NLS interagem com resíduos da proteína NcImpα através de interações hidrofóbicas (arcos tracejados) e ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). Os resíduos de triptofano e asparagina que estabilizam a cadeia principal dos peptídeos estão representados em laranja, outros resíduos que interagem com os peptídeos estão representados em amarelo.

## 5.2 Discussão

A interação do peptídeo NIT2-NLS com a proteína NcImpα é característica de um peptídeo NLS clássico, que se encaixa na classificação: monopartido da classe 1, de acordo com Kosugi *et. al.*, 2009 (Kosugi, Hasebe, Tomita, *et al.*, 2009). Os dados estruturais são condizentes com os resultados de ITC, onde as medidas de afinidade com o peptídeo NIT2-NLS junto a proteína NcImpα demonstraram que o peptídeo tem elevada afinidade a ambos os sítios de ligação da proteína. Apesar de tanto os dados estruturais quanto calorimétricos mostrarem que a afinidade do peptídeo a ambos os sítios é elevada, o peptídeo ligado ao sítio principal apresenta tanto um valor de $K_d$ mais baixo do que o do sítio secundário, quanto valores de *B-factor* mais próximos ao valor de *B-factor* da proteína inteira, o que evidencia a maior afinidade do peptídeo ao sítio principal da proteína. Essa informação contrasta com dados apresentados em outros estudos com Impα da família α1, que demonstram a ligação preferencial de NLSs ao sítio secundário da proteína (Chang *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013). Considerando que o fungo *N. crassa* apresenta apenas uma isoforma da proteína Impα, o reconhecimento de NLSs por ambos os sítios da NcImpα é condizente com a necessidade da proteína em reconhecer todas as proteínas que entram no núcleo celular através da Via Clássica de Importação Nuclear, sendo assim, a especialização e diferenciação observadas nas isoformas da Impα presentes em organismos complexos, como *Homo sapiens* e *Mus musculus* (Mason *et al.*, 2002), não é observada no organismo *Neurospora crassa* no reconhecimento de NLSs clássicas..

O complexo NcImpα/NIT2-NLS também apresentou uma configuração não tão usual nas posições $P_4$ e $P_{3'}$, ocupadas pelo resíduo de glutamina (Q921). Essa posição é, majoritariamente, ocupada por resíduos de lisina ou arginina em outros complexos, tanto em proteínas da família α1, como OsImpα e ScImpα, quanto da família α2, como MmImpα, no entanto, essa configuração também pôde ser observada na estrutura do complexo MmImpα/yCBP80_cNLS [Tabela 7; (Marfori *et al.*, 2012)]. Isso indica que a presença de resíduos de glutamina nessas posições é favorável no processo de reconhecimento de NLSs, o que contribui para a definição de quais resíduos podem ocupar essas posições para que o que o reconhecimento das cNLSs seja viável. Essas

definições podem ajudar na especialização dos banco de dados e identificação de NLS em outras proteínas.

**Tabela 7. Interação de NLSs monopartidos e NLS-like com a proteína Impα.** As sequências foram obtidas a partir das seguintes estruturas: NcImpα/SV40 [PDB ID: 4RXH; (Bernardes *et al.*, 2015)]; OsImpα/SV40, OsImpα/A89 e OsImpα/B54 [PDB ID: 4B8O, 4B8P, 2YNS (Chang *et al.*, 2012)]; ScImpα/c-Myc [PDB ID: 1EE4; (Conti e Kuriyan, 2000)]; MmImpα/yCBP80 [PDB ID:3UKY; (Marfori *et al.*, 2012)]; MmImpα/XPG1 [PDB ID:5EKF; (Barros *et al.*, 2016)]; MmImpα/BIMAX1 [PDB ID: 3UKW;(Marfori *et al.*, 2012)]. As posições em negrito correspondem aos resíduos ligados aos sítios principal e secundário.

| | **Sítio secundário** | | | | | | | | | | | | | | | | **Sítio principal** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | **$P_1'$** | **$P_2'$** | **$P_3'$** | **$P_4'$** | **$P_5'$** | | | | | | | **$P_1$** | **$P_2$** | **$P_3$** | **$P_4$** | **$P_5$** | **$P_6$** | | |
| **NcImpα/NIT-2** | | T | I | S | S | **K** | **R** | **Q** | **R** | R | H | S | K | S | | | A | **S** | **K** | **R** | **Q** | **R** | R | |
| **NcImpα/SV40** | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | | | | | | | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | |
| **OsImpα /SV40** | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | G | G | | | | S | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | G |
| **OsImpα/A89** | VHK | T | V | L | G | **K** | **R** | **K** | **Y** | M | | | | | | | | | | | | | | |
| **OsImpα/B54** | | S | V | L | G | **K** | **R** | **K** | **R** | H | P | K | V | | | | | | | | | | | |
| **ScImpα/c-Myc** | | | P | A | A | **K** | **R** | **V** | **K** | L | D | | | | | P | A | **A** | **K** | **R** | **V** | **K** | L | D |
| **MmImpα/yCBP80** | | | | N | R | **K** | **R** | **R** | **G** | D | | FDEDNYRDFRPR | | | | | M | **P** | **K** | **R** | **Q** | **R** | I | P |
| **MmImpα/XPG1** | | | | S | L | **K** | **R** | **K** | **R** | | | | | | | | S | **L** | **K** | **R** | **K** | **R** | | |
| **MmImpα/BIMAX1** | | | | P | R | **K** | **R** | **P** | **L** | E | W | | EWDEDEEP | | | | P | **R** | **K** | **R** | **K** | **R** | L | W |

A presença do complexo NIT2-NLS-BSA no interior do núcleo das células HeLA permeabilizadas com digitonina e incubadas com citosol e um sistema de regeneração de energia, confirma a hipótese de que a potencial sequência NLS presente é transportada para o interior do núcleo com o auxílio de componentes citoplasmáticos. Os ensaios de competição, utilizando o peptídeo BIMAX como bloqueador do transporte nucleocitoplasmático realizado pela Impα, comprovaram que o peptídeo NIT2 depende do reconhecimento pela Impα para ser transportado e não utiliza outras vias de transporte.

A razão da intensidade de fluorescência obtida para o controle positivo do ensaio com o complexo BIMAX1-NLS-BSA é mais alta, quando comparada aos valores obtidos nos ensaios com peptídeos NLS de proteínas fúngicas. Isso ocorre por, considerando que BIMAX1-NLS é um peptídeo sintético que foi desenvolvido para ter a mais alta afinidade com a Impα, dentre os NLSs conhecidos, já é esperado que tenha uma afinidade mais elevada do que os peptídeos NLSs de proteínas de fungos. Além disso, essa diferença de intensidade também pode ser justificada pela menor afinidade dos NLS fúngicos com a Impα de mamífero utilizada nos ensaios. Uma outra hipótese é que a presença de resíduos de glutamina nos peptídeos NLS fúngicos podem aumentar a afinidade com a proteína NcImpα enquanto diminui a afinidade desses peptídeos com outras isoformas de Impα.

## 5.3 Conclusão

A potencial sequência NLS identificada no fator de transcrição NIT2 apresentou elevada afinidade a proteína NcImpα e a cristalização do complexo NcImpα/NIT2-NLS indicou que esse peptídeo interage com a proteína em uma conformação monopartida e ligado a ambos os sítios de reconhecimento de NLSs da proteína. Os dados indicam que essa sequência é a responsável pelo transporte da proteína NIT2 para o interior do núcleo e depende da Impα para ser reconhecida. A forte ligação do peptídeo ao dois sítios da proteína NcImpα evidencia a flexibilidade da proteína no reconhecimento de NLSs pelos dois sítios, considerando que *N. crassa* apresenta apenas uma isoforma da Impα que deve reconhecer todos os diferentes NLSs nas proteínas do fungo. Também foi provado que a presença de um resíduo de glutamina na posição P4 é possível e favorável na interação de NLSs com a Impα.

# 6 Importação nuclear do fator de transcrição PAC-3.

O fator de transcrição PAC-3 é uma proteína já bem caracterizada em outros fungos filamentosos do gênero *Aspergilus* (PACC) e está relacionada a resposta do organismo a variações no pH do ambiente através da ativação de genes alcalinos e repressão de genes ácidos específicos (Tilburn *et al.*, 1995). Além disso, estudos recentes mostraram que um dos genes que a proteína regula é o gene que codifica a glicogênio sintase, controlando o acúmulo do glicogênio (Goncalves *et al.*, 2011). O glicogênio é um polissacarídeo de reserva de carbono e energia em muitos organismos e possui um mecanismo de regulação metabólica sensitiva a disponibilidade de nutrientes e outras condições do ambiente. Enzimas responsáveis pela degradação e síntese do glicogênio são reguladas a níveis transcricionais e pós-transcricionais e essa regulação pode estar relacionada a condições fisiológicas do organismo (Goncalves *et al.*, 2011). Também é discutido a relação entre o fator de transcrição PAC-3 com mecanismos patogênicos em fungos como, por exemplo, a colonização do tecido pulmonar alcalino de murinos, durante infecção por *Arpergillus fumigatus* (Bertuzzi *et al.*, 2014).

Segundo proposto por Mingot *et. al*., 2010, em ambientes ácidos, a proteína PAC-3 é localizada no citoplasma em uma conformação "fechada" (Figura 14). Em condições de pH alcalino, a via de transdução de sinal do gene *pal* transmite um sinal a proteína PAC-3 que adota uma conformação "aberta" e passa a ser localizada no núcleo das células [Figura 14; (Mingot *et al.*, 2001)]. Nessa conformação, a proteína fica acessível ao processamento proteolítico que resulta na clivagem da porção C-terminal, que funciona como um domínio de ação-negativa. Após a clivagem, a proteína se torna competente para a regulação transcricional de genes alcalinos [Figura 14; (Mingot *et al.*, 2001)].

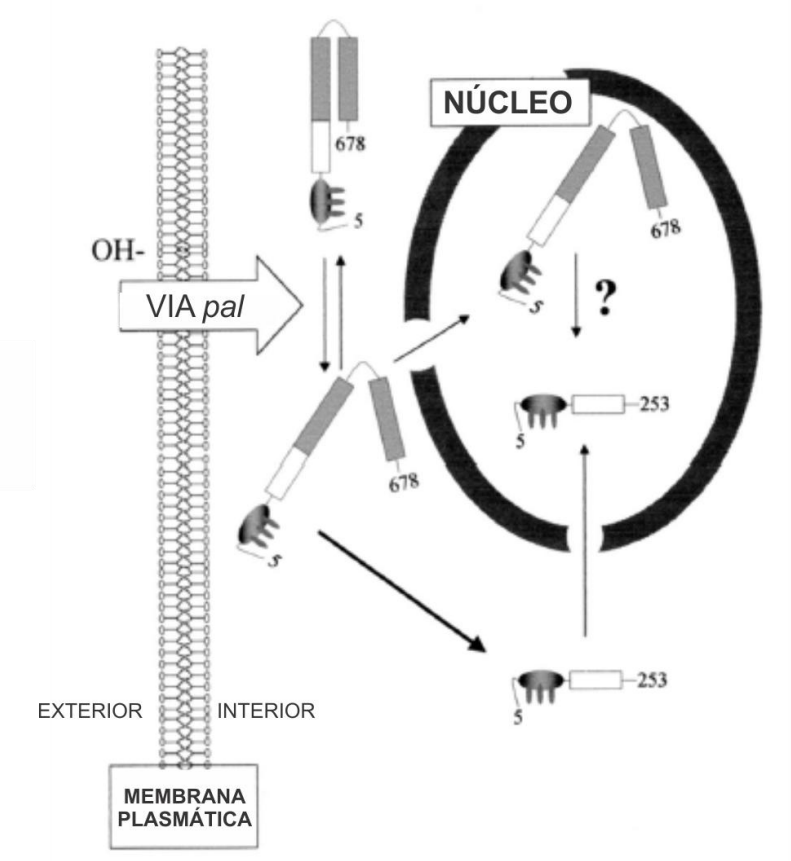



**Figura 14. Modelo para o tráfico subcelular da proteína PACC de *A. nidulans* em resposta ao pH do ambiente.** Após ser sintetizada, a proteína PACC adota uma conformação fechada, inacessível a atuação de proteases. Quando o ambiente de crescimento é alcalino, um sinal é transmitido pela via do gene *pal*. A recepção desse sinal pela PACC leva a proteína a adotar uma conformação aberta, na qual PACC se torna acessível ao processamento proteolítico. Os autores sugerem um modelo em que o processamento acontece exclusivamente no citoplasma. A proteína processada seria transportada para o interior do núcleo, onde ativa a expressão de genes alcalinos e inativa genes ácidos. Uma porção da PACC inteira, representando a proteína em uma conformação aberta que escapa do processamento, é capaz de entrar no núcleo. Como evidências definitivas de que o processamento da proteína ocorre no citoplasma, a possibilidade de que o processamento ocorra no interior do núcleo é indica por uma interrogação. Adaptado de Mingot *et. al*., 2001.

Experimentos *in vivo* mostraram a migração do fator de transcrição PAC-3 para o interior do núcleo das hifas de *N. crassa* (Virgilio *et al.*, 2016). Nesses experimentos, esporos do fungo foram cultivados em meio Vogel, em pH 5,8, por 12h. Após esse período, o micélio foi transferido para meio com pH 7,8. Através de análises por microscopia de fluorescência foi possível visualizar a localização da proteína no citoplasma, no meio ácido e posterior localização no núcleo, em meio alcalino [Figura 15; (Virgilio *et al.*, 2016)].

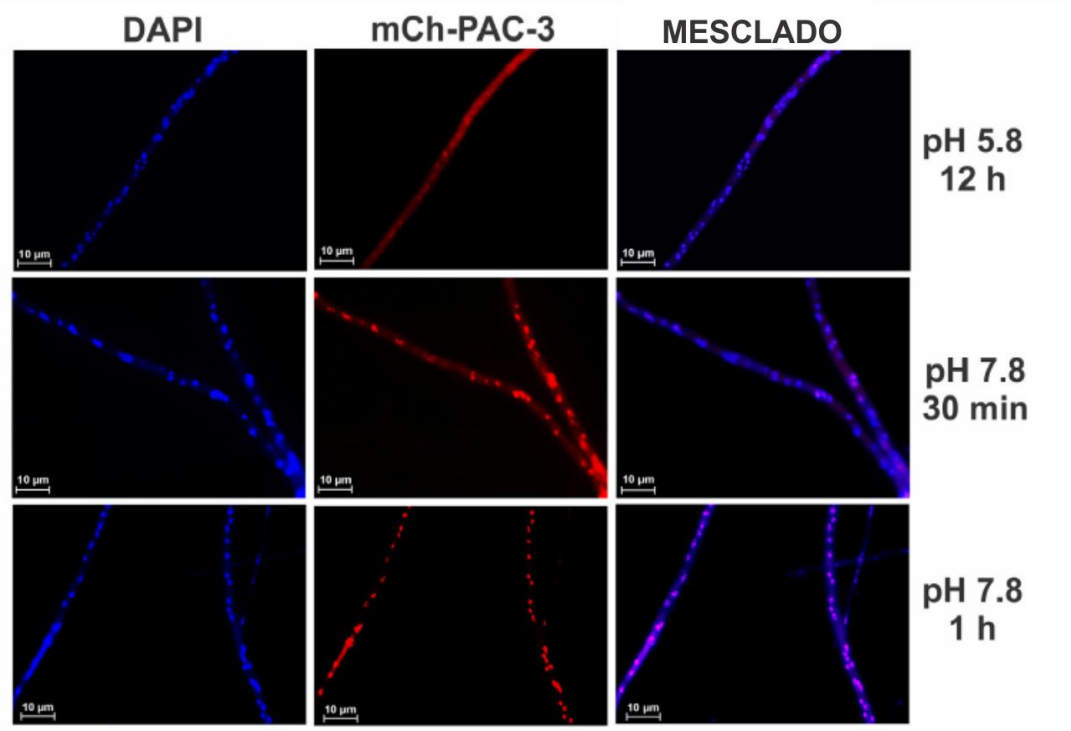



**Figura 15. Localização subcelular da proteína PAC-3**. (A) A proteína PAC-3 é transportada para o interior do núcleo em condições de pH alcalino. Conídias da cepa Δpac-3 complementada cresceram em lamínulas em meio VM contendo 1% de sucrose, pH 5,8, a 30 °C por 12h. Após esse período, o micélio foi transferido para meio VM contendo 1% de sucrose, pH 7,8 a 30 °C por 30 min e 1h. O micélio foi fixado com formaldeído em PBS, os núcleos foram corados com DAPI e a fluorescência foi visualizada usando o microscópio AXIO Imager.A2 (Zeiss) em um aumento de 100x. As imagens de um dos três experimentos realizados são mostradas. Adaptado de Virgílio, *et. al*., 2016.

## 6.1 Resultados

### 6.1.1 Identificação de potenciais sequências NLS na proteína PAC-3.

Para realizar a busca por prováveis NLSs responsáveis pelo transporte da proteína PAC-3 para o interior do núcleo, foi utilizado a ORF NCU00090. As sequências indicadas pelos algoritmos foram comparadas com as indicadas por trabalhos já publicados para que fosse feita a seleção da provável sequência NLS que seria analisada. A tabela 8 mostra a sequência da proteína, as potenciais NLSs e a posição destas na sequência da proteína.

**Tabela 8. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína PAC-3.** Os possíveis NLSs indicados pelos programas cNLS Mapper e PSORTII são apresentados na tabela, junto as sequências nas quais as buscas por NLSs foram realizadas. Em vermelho estão identificadas as NLSs sugeridas e em negrito as NLSs selecionadas para os estudos anteriores.

| ORF | Sequência | NLSs previstos |
|---|---|---|
| **NCU00090** | MSSTPAQENGTVNGANAAPAPAPAQTTPTPAPATAATPT<br>TAPAASANGTAANAMKPEASSNSSNSASNGTTPAPSTTP<br>TTASNSSAPAAAQDESLVCRWAECNERFTSAEVLYEHIC<br>EKHVGRKSTNNLNLTCQWNSCRTTTVKRDHITSHVRVHV<br>PLKPHKCDFCGKCFKRPQDLKKHVKTHADDSVLVGRSPQ<br>DQNGGMNGAYRAQAPVHKAPSGFYDHNGHMRGTNQVPFG<br>QPHQNGQASYYHAQYPASQPYHAPMYYPAQTMGGQRNDF<br>TGHQAA**PFDARKRQFDDLNDFFGSVKRRQIN**PTSYESVG<br>RALMPLHAPLGLHSGGLATEYMAQPPHTLGMASAHHPLT<br>QHYYLPPMPNLRTKEDLQQMDHFLEQMQATVYENTAVDM<br>RHHSPTYATRPSIDPYHGASLASPLSATSPHSAGTPAVT<br>PTPSNMSYTSGHSPSTSSTSLSPTSRHSSTPSVSYPTLP<br>SRPGLPYPSTSGLGSNFTHNERRLSGGVLQSARRAADEA<br>DRAPTPKASEQATVSSPSEDSETGDVNGPETYDDWLQHM<br>RVIEYLRQGIRARLERQDFDEDDTSRIDPMVLESSDRNQ<br>QQRNQQQQQQKSPNEPTAAGPSAPEKPLYPVLPRIN | $^{280}$PFDARKR$^{286}$<br>$^{285}$KRQFDDLNDFFGSVKRR$^{301}$<br>$^{281}$**FDARKRQFDDLNDFFGSVKRRQI**$^{303}$ |

*** As sequências obtidas nos banco de dados foram comparadas com as potenciais NLSs descritas na literatura por Gonçalves e colaboradores (Gonçalves *et. al*., 2011).**

### 6.1.2 Afinidade do peptídeo PAC3-NLS com as proteínas NcImpα e MmImpα.

As medidas de afinidade com o potencial NLS do fator de transcrição PAC-3 ($^{281}$FDARKRQFDDLNDFFGSVKRRQIN$^{304}$) e as proteínas NcImpα e MmImpα foram realizadas com o peptídeo em uma concentração 10 vezes maior do que a proteína (500 µM e 50 µM, respectivamente). Os dados processados, considerando um modelo de interação com apenas um sítio e que resultaram em um melhor ajuste da curva de titulação (Figura 16), indicaram um $K_d$ de 0,39 ± 0,07 µM para o complexo NcImpα/PAC3-NLS, o que sugere uma forte interação e indica que a sequência do peptídeo corresponde a um provável NLS bipartido ou uma sequência monopartida que interage com apenas um sítio da proteína [Tabela 9; (Bernardes *et al.*, 2017)]. As medidas de afinidade do mesmo peptídeo com a proteína MmImpα resultaram em valores muito semelhantes ao do complexo NcImpα/PAC3-NLS, quando os dados

foram processados considerando um modelo de interação com apenas um sítio. O valor de Kd obtido foi de 0,83 ± 0,25 µM, o que também mostra uma forte interação entre proteína e peptídeo (Tabela 9). A variação de entalpia do complexo NcImpα/PAC3-NLS é maior do que MmImpα/PAC3-NLS o que, junto com as variações na entropia, demonstram variações na espontaneidade da reação para cada complexo (Tabela 9). Já a estequiometria de ambos os complexos é similar e demonstra que o peptídeo PAC3-NLS se comporta como bipartido quando ligado as proteínas NcImpα e MmImpα (Tabela 9).

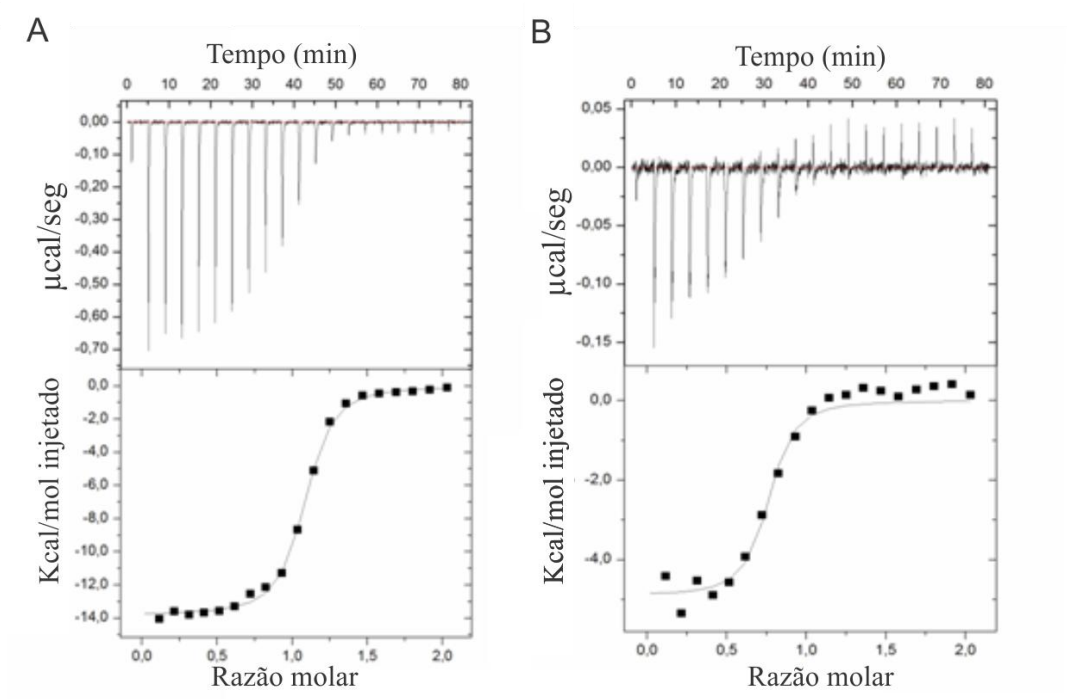



**Figura 16. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos A) NcImpα/PAC3-NLS e B) MmImpα/PAC3-NLS.**

**Tabela 9. Constantes termodinâmicas obtidas a partir das medidas de ITC dos complexos NcImpα/PAC3-NLS e MmImpα/PAC3-NLS.**

| Complexos | n* | Kd (µM) | ΔH (Kcal/mol) | ΔS(cal/mol/deg) |
|---|---|---|---|---|
| **NcImpα/PAC3-NLS** | 1,06 | 0,39 ± 0,07 | -12,17 ± 0,17 | -12,20 |
| **MmImpα/PAC3-NLS** | 1,02 | 0,83 ± 0,25 | -3,74 ± 0,14 | 15,10 |

***** estequiometria da reação

### 6.1.3 Estrutura cristalográfica do complexo Impα/PAC3-NLS

Os primeiros testes de cristalização do complexo NcImpα/PAC3-NLS foram realizados utilizando o Kit de cristalização *Screen JCSG + Core II suíte (Jena Bioscience)*, além da mesma condição de cristalização do complexo NcImpα/SV40-NLS (Bernardes *et al.*, 2014). Para montar as gostas de cristalização, utilizou-se a proteína concentrada a 12 mg/ml e o peptídeo PAC3-NLS concentrado a 10 mg/ml, em uma proporção de 1:8 em número de moléculas. As placas de *sitting-drop* foram montadas utilizando o robô de cristalização de proteínas Oryx4 da *Douglas Instruments*. As placas foram armazenadas a temperatura de 4 °C. Após quatro semanas, foi possível observar o crescimento de cristais em diferentes condições de cristalização (Figura 17). Esses cristais foram coletados e resfriados a temperatura criogênica para serem submetidos a difração de raios X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas-SP, no entanto, não apresentaram dados de difração de raios X adequados para a resolução da estrutura do complexo.

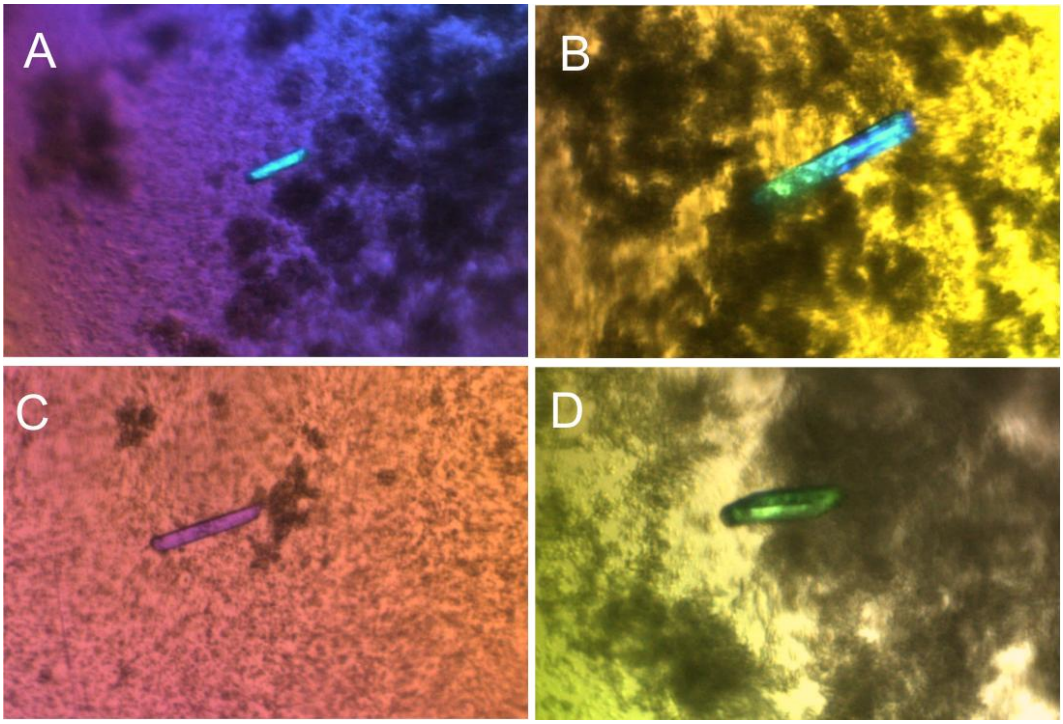



**Figura 17. Cristais do complexo NcImpα/PAC3-NLS.** Cristais obtidos nas condições: A) cloreto de sódio 0,1M, bicina pH 9,0 0,1M e 20% PEG 500. B) cloreto de lítio 1M, bicina pH 9,0 0,1M e 10% PEG 6000. C) tris HCl pH 8,5 e fosfato de amônia dihidrogenado. D) MES pH 6,5 e 12% PEG 20000.

Devido a dificuldade de cristalizar o peptídeo PAC3-NLS com a proteína NcImpα e também com o objetivo de comparar a interação de um mesmo NLS com Impα diferentes, foram realizados experimentos de cristalização do peptídeo com a Impα de *Mus Musculus*. Os primeiros testes de cristalização do complexo MmImpα/PAC3-NLS foram realizados utilizando a mesma condição de cristalização de outros complexos MmImpα/peptídeos NLS (Bernardes *et al.*, 2014). Para montar as gostas de cristalização, utilizou-se a proteína concentrada a 18 mg/ml e o peptídeo PAC3-NLS concentrado a 5 mg/ml, em uma proporção de 1:8 em número de moléculas. As placas de *sitting-drop* foram montadas utilizando o robô de cristalização de proteínas Oryx4 da *Douglas Instruments*. As placas foram armazenadas a temperatura de 18 °C. Após duas semanas, foi possível observar cristais do complexo MmImpα/PAC3-NLS obtidos nas condições citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e citrato de sódio 0,55 M com dimensões adequadas para serem resfriados a temperatura criogênica e levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas-SP, onde foram submetidos a difração de raios X (Figura 18). Os dados coletados, após etapas de processamento e refinamento, permitiram a elucidação da estrutura cristalográfica do complexo, conforme dados apresentados na Tabela 10.

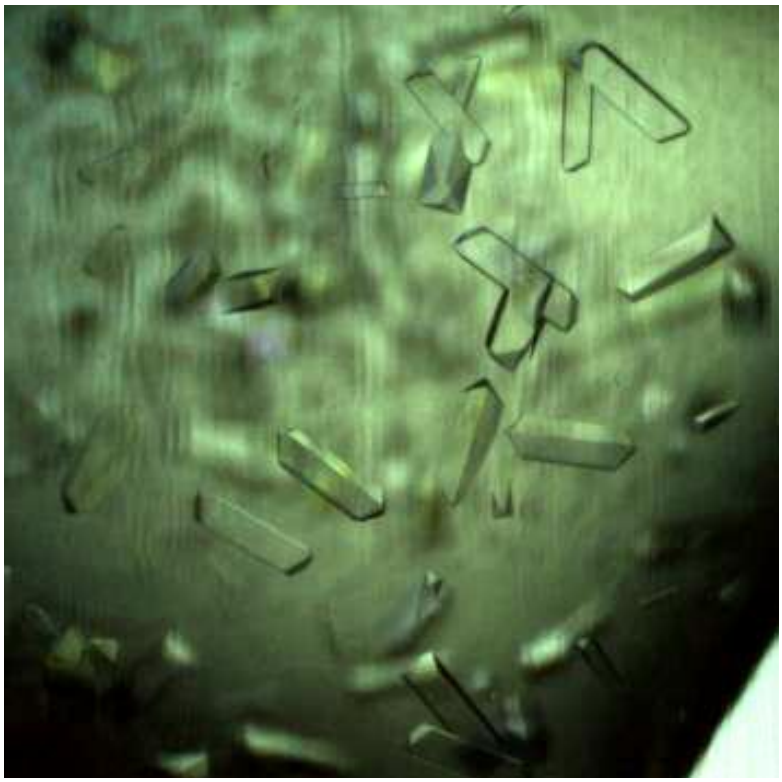


**Figura 18. Cristais do complexo MmImpα/PAC3-NLS**. Cristais obtidos na condição: 0,1 M citrato de sódio pH 6,0 e 0,6 M citrato de sódio.

**Tabela 10. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS.**

| MmImpα/PAC3-NLS | |
|---|---|
| **Cela unitária (Å)** | 78,2 90,2 100,3 |
| **Grupo espacial** | P $2_1$ $2_1$ $2_1$ |
| **Resolução (Å)** | 45,08 - 1,918 (1,986 - 1,918) |
| **Reflexões únicas** | 54747 (5220) |
| **Dados Completos (%)** | 99,57 (96,52) |
| **Média I/σ(I)** | 10,86 (0,49) |
| **$R_{cryst}$ [c] (%)** | 19,30 (39,9) |
| **$R_{free}$ [d] (%)** | 22,30 (40,0) |
| **Número de átomos** | 3598 |
| **Proteína** | 3413 |
| **Peptídeo** | 142 |
| **Água** | 185 |
| **Resíduos nas regiões mais favoráveis** | 97 |
| **(não permitidas) (%)** | 0,45 |
| **Fator de temperatura médio (Å$^2$)[e]** | 40,9 |

[a] Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.
[b] Rmerge = Σ*hkl*(Σ*i*(|I*hkl*,*i*-<I*hkl*>|))/Σ*hkl*,*i*<I*hkl*>, onde I*hkl*,*i* é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e <Ihkl> é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para I > -3σ (I).
[c] Rcryst = Σ*hkl*(||Fobs*hkl*|-|Fcalc*hkl*||)/|Fobs*hkl*|, onde |Fobs*hkl*| e |Fcalc*hkl*| são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados.[d] Rfree é equivalente ao Rcryst ,mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas.[e] Calculado com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

A estrutura cristalográfica obtida (Figuras 19A) apresentou a conformação côncava formada por repetições em armadillos (ARMs) característica da proteína Impα (Conti *et al.*, 1998; Kobe, 1999; Cutress *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2012), conforme já observado na estrutura do complexo NcImpα/SV40-NLS elucidada (Bernardes *et al.*, 2015). Foi observado densidade eletrônica nos sítios principal e secundário da proteína MmImpα, indicando a presença do peptídeo PAC3-NLS nessas regiões (Figura 19A e 19D). A densidade eletrônica do sítio principal permitiu a modelagem indubitável da porção C-terminal do peptídeo (Figura 19E, 19F). No sítio secundário, nas posições P1' e P2' a modelagem dos resíduos $^{285}$KR$^{286}$ está bem definido, enquanto a densidade eletrônica na posição P3' levantou dúvidas quanto ao resíduo que estaria ligado nesta posição (Figura 19B e 19C). Em um primeiro momento foi suposto que o peptídeo estaria se ligando em uma conformação monopartida, com apenas a região C-terminal

do peptídeo PAC3-NLS $^{297}$SVKRRQIN$^{304}$ interagindo com os dois sítios e a posição P3' sendo ocupada por um resíduo de arginina. No entanto, após algumas etapas de refinamento foi possível encaixar os resíduos da porção N-terminal do peptídeo PAC3-NLS no sítio secundário sem alterações significativas nos valores de *B-factor* dos resíduos e sugeriu-se a hipótese de que a ligação de um resíduo mais curto na posição P3', no caso o resíduo de glutamina Q$^{287}$ exige que moléculas de solvente se acomodem nessa posição, para intermediar a interação do peptídeo com os resíduos da proteína. Sendo assim, o que em um primeiro momento aparenta ser um resíduo mais longo é, na verdade, um resíduo de cadeia lateral curta junto a uma molécula do solvente. A molécula de solvente ainda não foi identificada, devido às inúmeras possibilidades, considerando todas as soluções utilizadas desde as etapas de purificação até a cristalização da proteína.

Por fim, na estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS foi possível modelar resíduos da sequência do peptídeo PAC3-NLS tanto no sítio principal quanto no sítio secundário (Figuras 20A, 20B e 20C) em uma conformação bipartida, apesar de não ter sido possível observar densidade eletrônica para cinco resíduos da região de *linker* ($^{291}$LNDFF$^{295}$), provavelmente, devido a alta flexibilidade dessa região, conforme já foi descrito por Fontes e colaboradores (Fontes *et al.*, 2003). A distribuição dos valores de *B-factor* entre os resíduos que interagem com os dois sítios da Impα mostram, novamente, o menor valor para os resíduos nas posições P1'/P2' e P2/P3 em relação ao *B-factor* da proteína inteira (Tabela 11), confirmando que no peptídeo PAC3-NLS a presença desses resíduos na NLS é essencial para o reconhecimento pela Impα.

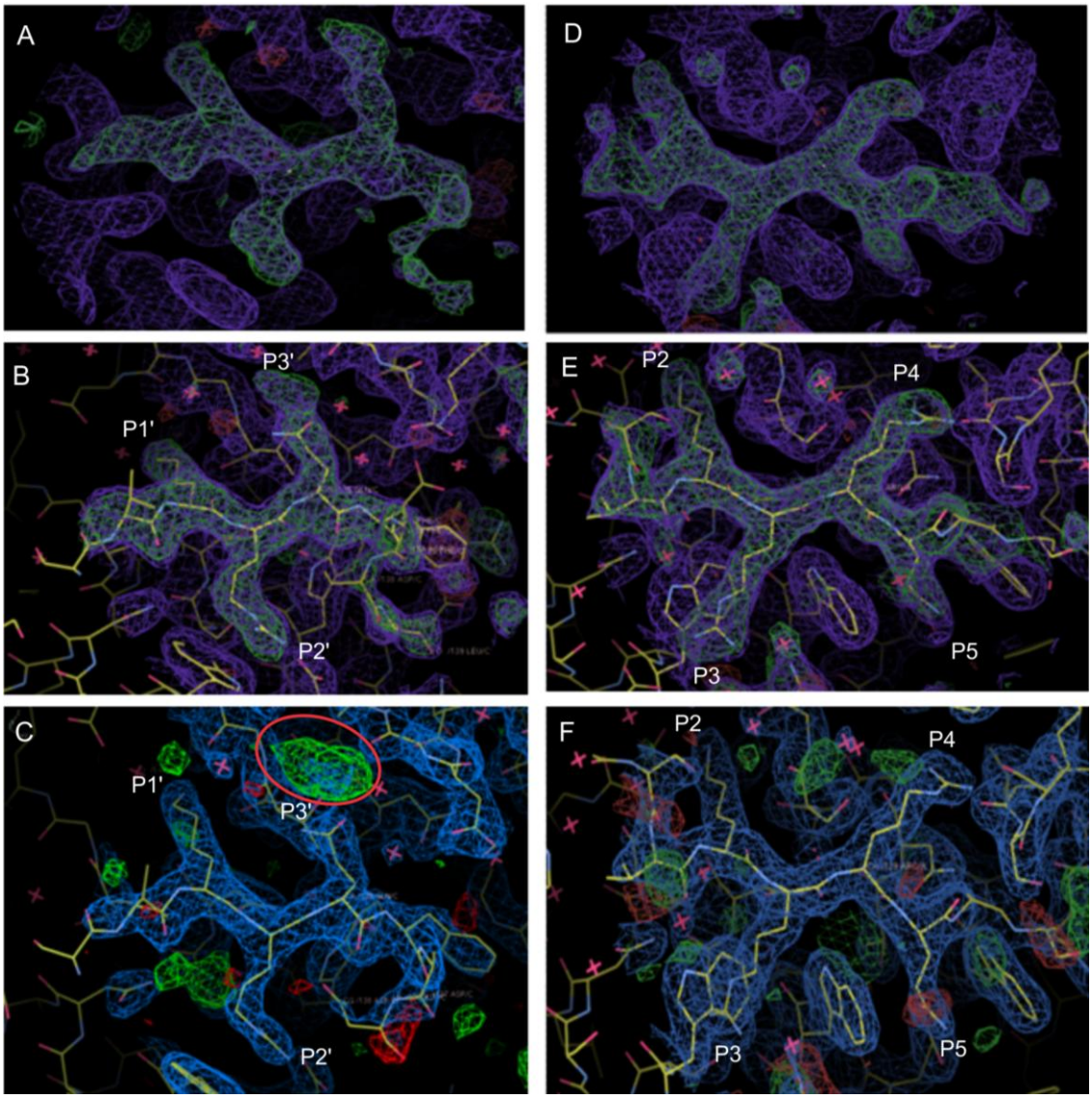



**Figura 19. Mapa de densidade eletrônica nos sítios principal e secundário do complexo MmImpα/PAC3-NLS.** A) Mapa de densidade eletrônica 2|Fobs|-|Fcalc| com σ=1,5,na região do sítio secundário da proteína MmImpα onde foram acomodados os resíduos da porção N-terminal do peptídeo PAC3-NLS, conforme mostrado na imagem B, com destaque as regiões P1', P2' e P3'. C) Após etapas de refinamento é possível observar a presença de densidade eletrônica próxima ao resíduo na posição P3', destacada por um círculo vermelho, que sugere a presença de moléculas de solvente nessa região para acomodar o resíduo de glutamina. D) Mapa de densidade eletrônica 2|Fobs|-|Fcalc| com σ=1,5,na região do sítio principal da proteína MmImpα onde foram acomodados os resíduos da porção C-terminal do peptídeo PAC3-NLS. E) Destaque para as posições P1-P4 onde a densidade eletrônica é bem definida para acomodar as cadeias laterais longas de lisina e arginina. F) Região do sítio principal após etapas de refinamento. Imagens obtidas a partir do programa Coot.

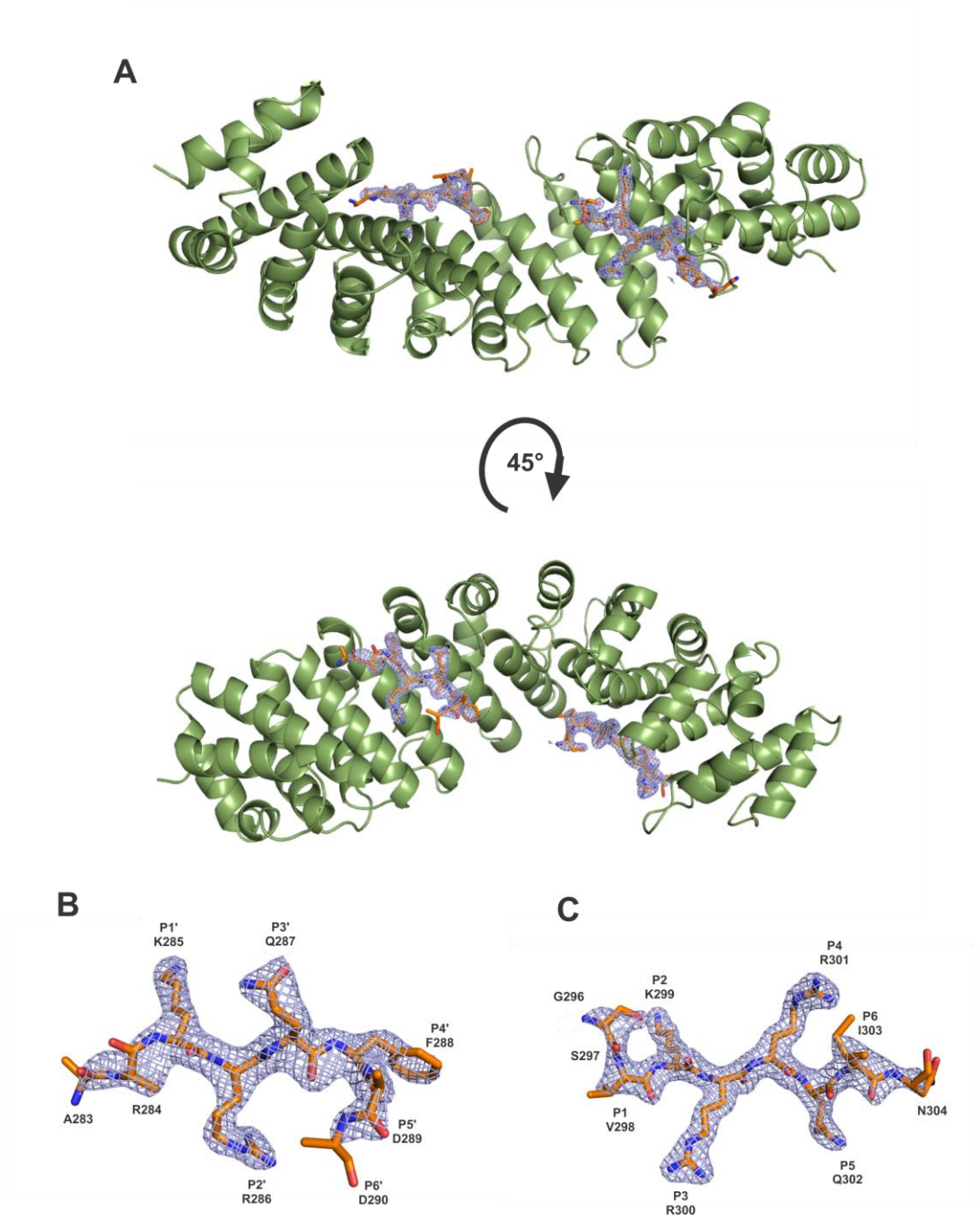



**Figura 20. Estrutura cristalográfica do complexo MmImpα/PAC3-NLS.** A)Estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS, com a proteína representada em diagrama de fitas (verde) e o peptídeo PAC3-NLS representado em bastões (laranja) ligado aos sítios principal e secundário da proteína. B) Sequência do peptídeo PAC3-NLS que se ligou ao sítio secundário da proteína MmImpα, indicando a posição ocupada por cada resíduo ($P_{-1'}$ a $P_{6'}$). C) sequência do peptídeo PAC3-NLS que se ligou ao sítio principal da proteína MmImpα, indicando a posição ocupada por cada resíduo ($P_1$ a $P_6$). Os peptídeos estão contornados pelo mapa de densidade eletrônica 2|Fobs|-|Fcalc| com σ=1,5. Imagem produzida no programa PyMol.

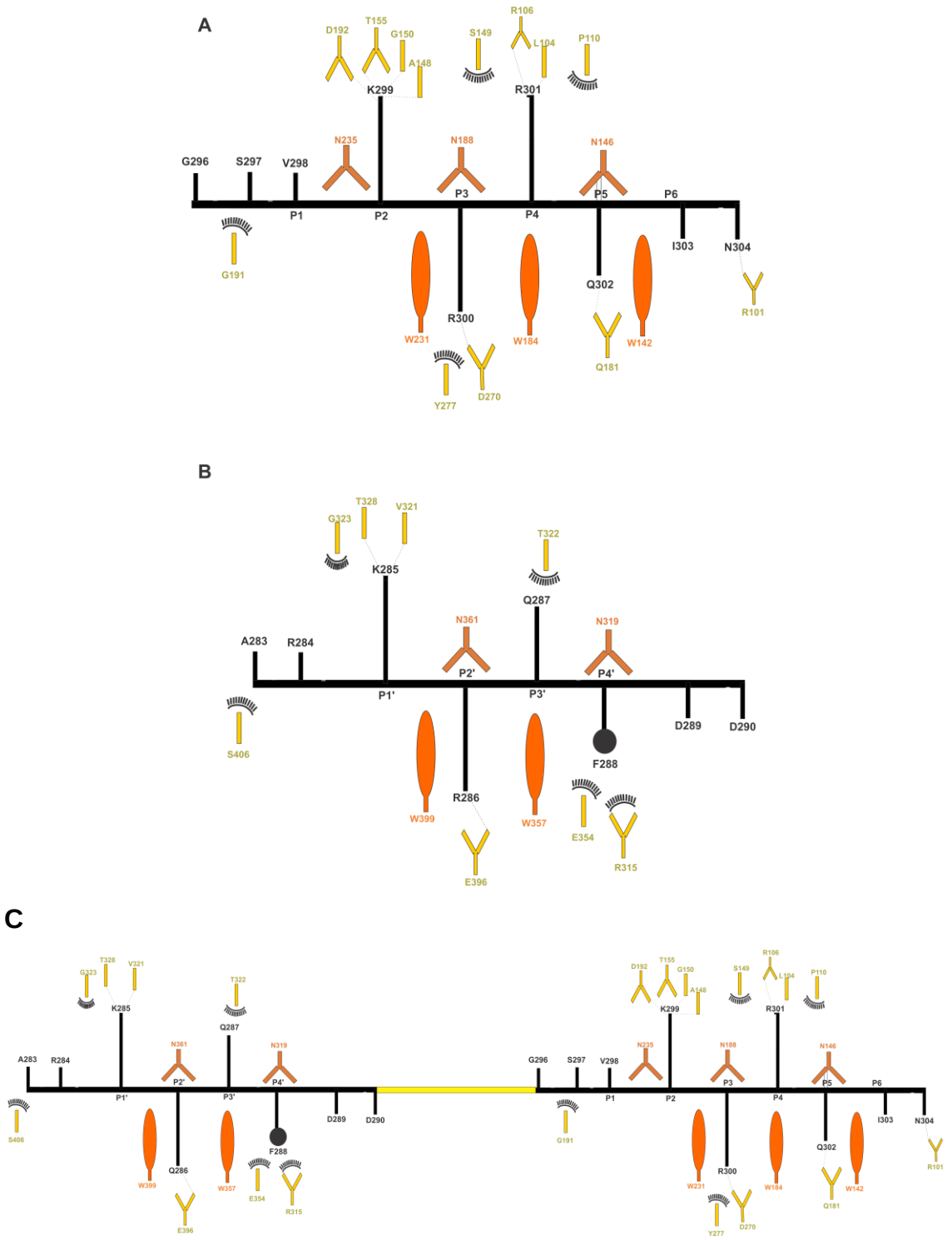
**Tabela 11. Valores de *B-factor* dos resíduos do peptídeo PAC3-NLS ligado aos sítios principal e secundário da proteína NcImpα.**

| Sítio secundário | | | Sítio principal | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Resíduos** | **Posições** | ***B-factor*** | **Resíduos** | **Posições** | ***B-factor*** |
| **A$^{283}$** | | 81,40 | **S$^{297}$** | | 69,00 |
| **R$^{284}$** | | 75,70 | **V$^{298}$** | P1 | 51,30 |
| **K$^{285}$** | P1' | 53,90 | **K$^{299}$** | P2 | 39,70 |
| **R$^{286}$** | P2' | 56,10 | **R$^{300}$** | P3 | 41,10 |
| **Q$^{287}$** | P3' | 54,60 | **R$^{301}$** | P4 | 46,10 |
| **F$^{288}$** | P4' | 58,30 | **Q$^{302}$** | P5 | 56,80 |
| **D$^{289}$** | | 69,20 | **I$^{303}$** | P6 | 64,40 |
| **D$^{290}$** | | 80,20 | **N$^{304}$** | | 79,60 |
| **Média** | | 66,17 | **Média** | | 56,00 |

No sítio principal, o peptídeo PAC3-NLS apresenta interações conservadas, comuns a outros complexos Impα/peptídeos NLS como as asparaginas N235, N188, N146, que orientam a cadeia principal do peptídeo e os resíduos básicos que se acomodam entre os triptofanos W231, W 184 e W146 (Figura 21A). As interações da K299 em P2 também são muito conservadas, inclusive quando se compara com as interações do complexo NcImpα/NIT2-NLS apresentadas no capítulo anterior (Bernardes *et. al*., 2015). As diferenças ocorrem quando se observa os resíduos e interações que ocupam as posições P3, P4 e P5, enquanto no complexo NcImpα/NIT2-NLS poucas interações ocorrem nessas posições, em MmImpα, o resíduo R300, em P3 participa de uma ligação de hidrogênio com D270 e de uma interação hidrofóbica com Y277 (Figura 21A). Em P4, o resíduo R301 realiza ligações de hidrogênio com R106 e L104 e interações hidrofóbicas com S149 e P110. Por fim, Q302, em P5 participa de uma ligação de hidrogênio com Q181. O resíduo de glutamina na posição P5 é uma interação não usual e faz com que o peptídeo não corresponda a sequência consenso das NLSs clássicas monopartidas: K(K/R)X(K/R) (Lange *et al.*, 2007).

No sítio secundário, além dos triptofanos W399 e W357 e as asparaginas N361 e N319 que estabilizam a cadeia principal, o maior número de ligações ocorre entre os

resíduos P1' e P4' (Figura 21B). K285, em P1' realiza ligações de hidrogênio com T328 e V321 e uma interação hidrofóbica com G323. O resíduo F288, em P3', participa de interações hidrofóbicas com R315 e E354 (Figura 21B).




**(Legenda na próxima página)**

**Figura 21. Esquema representando as interações entre o peptídeo PAC3-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína MmImpα.** Em ambos os sítios, os resíduos do peptídeo PAC3-NLS interagem com resíduos da proteína MmImpα através de interações hidrofóbicas (arcos tracejados) e ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). Os resíduos de triptofano e asparagina que estabilizam a cadeia principal dos peptídeos estão representados em laranja, outros resíduos que interagem com os peptídeos estão representados em amarelo.A figura C representa as regiões que se ligam aos sítios conectadas pelo *linker*.

## 6.2 Discussão

### 6.2.1 A proteína PAC-3 é transportada para o núcleo celular a partir do reconhecimento de uma NLS bipartida não-clássica.

O transporte da proteína PAC-3 para o interior do núcleo acontece após uma mudança conformacional resultante de um processo de sinalização celular regulado pelo gene *pal*, de acordo com o pH do meio extracelular (Mingot *et al.*, 2001). Essa mudança conformacional de "fechada" para "aberta" acaba por expôr os sítios proteolíticos da proteína e resulta na perda de sua porção C-terminal, a qual funciona como um mecanismo de auto-inibição (Mingot *et al.*, 2001). A NLS identificada na proteína PAC-3 está localizada próximo a esse domínio, entre os resíduos 281 a 304. Essa informação sugere que a clivagem do domínio C-terminal resulta na exposição da NLS, no entanto, a proteina inteira, em sua conformação aberta, antes da clivagem , também foi localizada no interior do núcleo, inclusive em ambiente ácido (Mingot *et al.*, 2001). A hipótese é que a mudança conformacional da proteína PAC-3 leva a exposição da NLS permitindo a interação com a proteína Impα, independente da clivagem da porção C-terminal.

A afinidade do peptídeo PAC3-NLS com a proteína NcImpα é alta, se comparada com a afinidade de outros complexos Impα/peptídeos NLS, confirmando que a sequência pode ser responsável pelo reconhecimento e transporte da proteína para o interior do núcleo (Virgilio *et al.*, 2016). As medidas de afinidade dos complexos NcImpα/PAC3-NLS e MmImpα/PAC3-NLS indicaram que o peptídeo se comporta como bipartido mesmo quando ligado a Impα de famílias diferentes (Virgilio *et al.*, 2016), ou seja, apenas um peptídeo se liga aos dois sítios de ligação da NcImpα ao mesmo tempo. A estrutura cristalográfica do peptídeo PAC3-NLS complexado a

MmImpα confirma essa hipótese pois a sequência do peptídeo PAC3-NLS se ligou aos dois sítios da proteína simultaneamente, em uma conformação bipartida. Apesar de que a densidade eletrônica da sequência que interage com o sítio principal é mais definida do que a do sítio secundário, o que sugere que, nesse sítio a ligação é mais fraca e pode ocorrer uma dupla ocupação. Esse modo de ligação é coerente com a distribuição dos aminoácidos na sequência do peptídeo onde os dois *clusters* de aminoácidos básicos estão separados por 12 outros aminoácidos, região conhecida como *linker* ($^{281}$**FDARKR**QFDDLNDFFGSV**KRRQI**$^{303}$, em vermelho destaca-se a região de *linker*). Apesar de não ser possível visualizar densidade eletrônica para os aminoácidos $^{291}$LNDFF$^{295}$ da região de *linker*, foi construído um modelo hipotético incluindo esses resíduos na estrutura, demostrando que o tamanho da sequência é suficiente para ocupar a região intermediária e "conectar" as duas sequências de PAC3-NLS que ocupam os sítios principal e secundário de MmImpα (Figura 22A). A sobreposição da sequência completa do peptídeo PAC3-NLS com outros NLSs bipartidos também demonstra a interação conservada das sequências na região dos sítios e a flexibilidade da região de *linker* [Figura 22B e 22C (Fontes *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2014; Kirby *et al.*, 2015)]. Inclusive, na estrutura da NLS bipartida de XRCC1, também não foi possível modelar alguns resíduos do *linker* [Figura 22D; (Kirby *et al.*, 2015)].

O modo de ligação do peptídeo ao sítio principal da proteína não é usual, com um resíduo de glutamina na posição P5. Segundo a sequência consenso das NLSs clássicas bipartidas (KRX10-12K(K/R)X(K/R), essa posição deveria ser ocupada por aminoácidos básicos de cadeia longa (K/R), porém glutamina (Q) é um aminoácido polar de carga nula e cadeia mais curta do que lisinas (K) e argininas (R). Essa característica da interação é importante para que se possa redefinir qual é a sequência consenso das NLSs clássicas e não-clássicas.

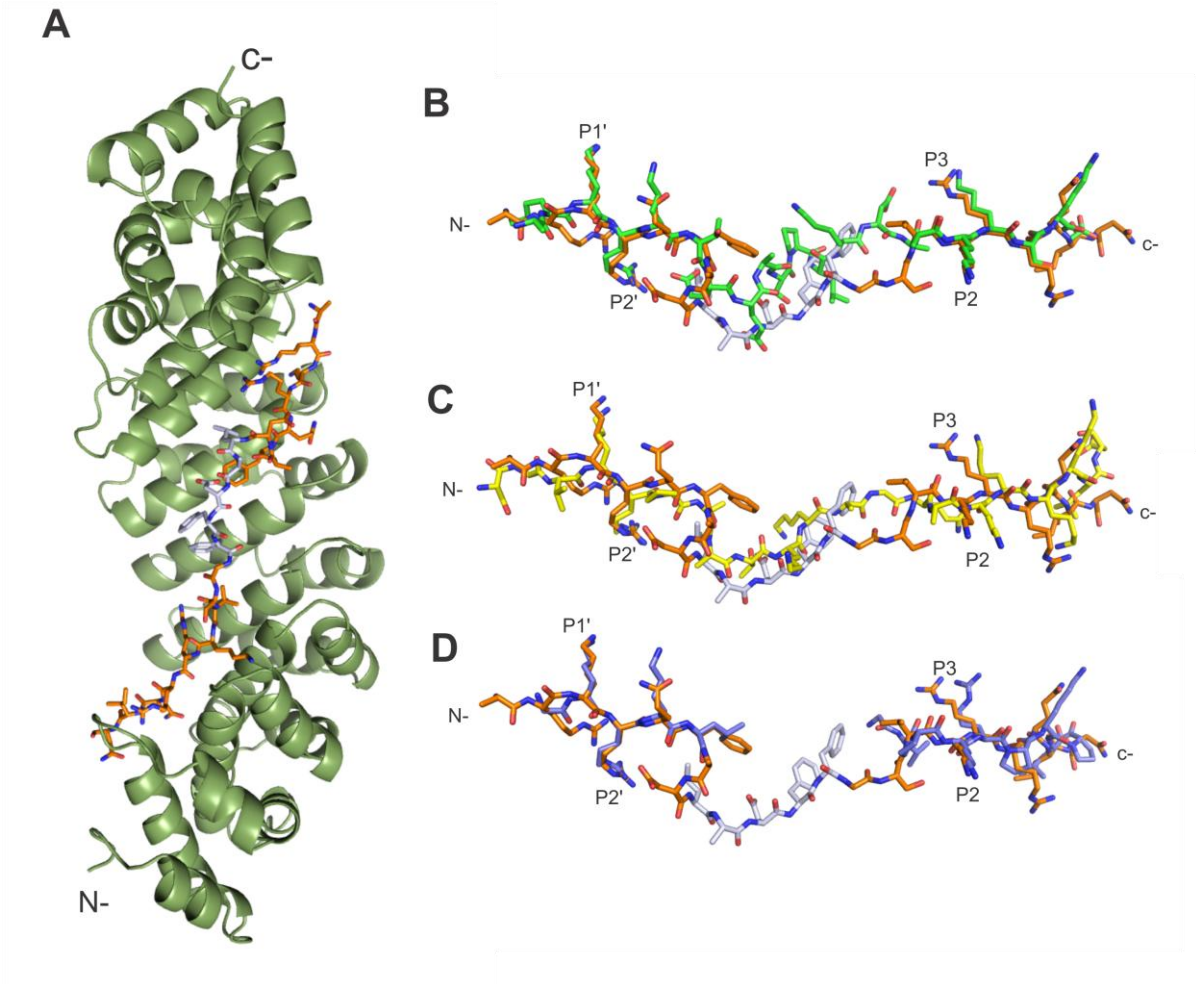



**Figura 22. Sobreposição de NLSs bipartidas que interagem com a proteína Impα.** A) Estrutura do peptídeo PAC3-NLS (em bastões, laranja) interagindo com a proteína MmImpα (verde), incluindo a região de *linker* $^{291}$LNDFF$^{295}$ (cinza) que não foi modelada na estrutura cristalográfica. B) Sobreposição da sequência completa de PAC3-NLS com a NLS bipartida de N1N2 (verde; PDB ID:1PJN) que interage com a proteína MmImpα. C) Sobreposição da sequência completa de PAC3-NLS com a NLS bipartida da nucleoplasmina (amarelo; PDB ID:4BPL) que interage com a proteína OsImpα. D) Sobreposição da sequência completa de PAC3-NLS com a NLS bipartida de XRCC1 (azul, PDB ID:SE6Q) que interage com a proteína MmImpα.

## 6.2.2 Diferenças entre as estruturas NcImpα e MmImpα

A sobreposição dos peptídeos SV40-NLS e NIT2-NLS que interagem com a proteína NcImpα com o peptídeo PAC3-NLS complexado a MmImpα mostra a conservação das regiões P2/P3 e P1'/P2' (Figura 23). Apesar das diferenças entre as proteínas, tanto em MmImpα quanto em NcImpα, os resíduos de glutamina dos peptídeo

PAC3-NLS e NIT2-NLS ocupam a posição P3'.Em contrapartida, é notável a variação nas posições dos resíduos que ocupam as posições a partir de P3' e P4'(Figura 23).

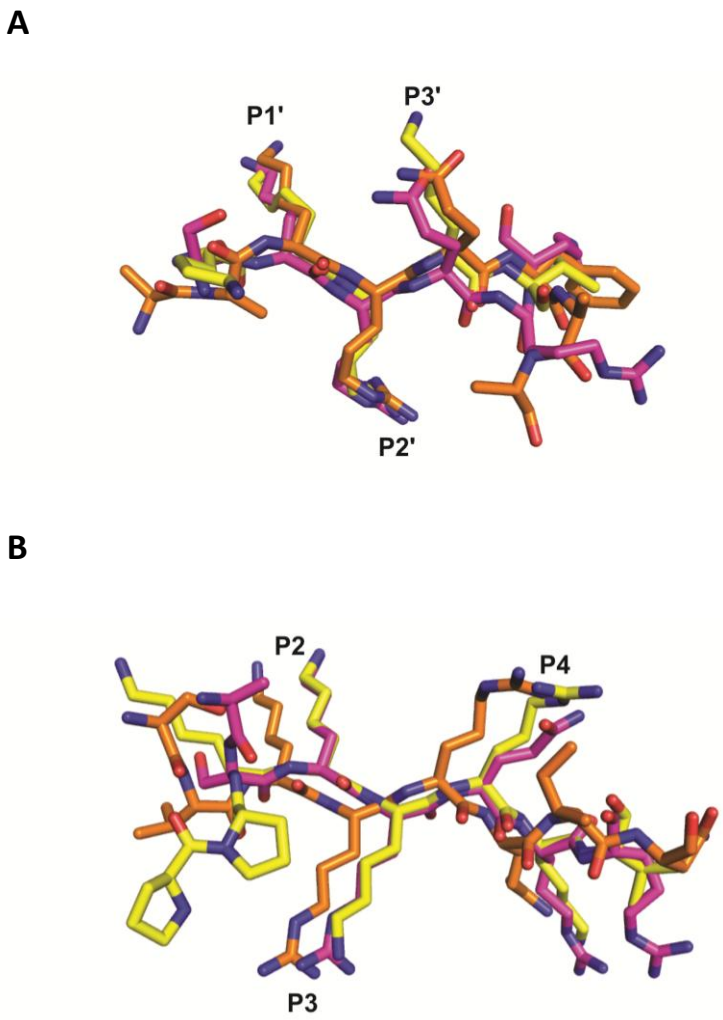



**Figura 23. Sobreposição dos peptídeos SV40-NLS, NIT2-NLS e PAC3-NLS que interagem com a proteína Impα.** As NLSs foram obtidas a partir das estruturas dos complexos NcImpα/SV40-NLS (PDB ID: 4RXH) e NcImpα/NIT2-NLS (PDB ID: 5VQ1).

Como os sítios principal e secundário da Impα são bastante conservados entre as isoformas, as especificidades na interação da Impα com peptídeos NLS podem estar relacionadas com os resíduos localizados ao redor dos sítios e que interagem com as extremidades das NLSs ou até mesmo com a estrutura tridimensional da proteína, onde pequenas diferenças na conformação das isoformas podem impedir a ligação de NLSs (Chang *et al.*, 2012; Sankhala *et al.*, 2017).

Analisando a interação do complexo MmImpα/PAC3-NLS e comparando com as estruturas já resolvidas da proteína NcImpα com os peptídeos SV40-NLS e NIT2-NLS (Bernardes *et al.*, 2015; Bernardes *et al.*, 2017) algumas diferenças estruturais podem ser destacadas. A isoforma NcImpα apresenta uma conformação mais fechada do que MmImpα (Bernardes *et al.*, 2015). Os movimentos de abertura, fechamento e torção da proteína Impα já foram caracterizados através de experimentos de dinâmica molecular e demonstraram a importância desses movimentos no reconhecimento de NLSs bipartidos e acomodação de NLSs de diferentes tamanhos (Geraldo *et al.*, 2016).

Através da sobreposição das estruturas de NcImpα e MmImpα é possível observar, nitidamente, o deslocamento do motivo ARM10, próximo ao sítio secundário das proteínas enquanto a região entre os motivos ARM 4-7 é altamente conservada entre as estruturas (Figura 24A e 24C). A flexibilidade do motivo ARM 10 já foi observada na estrutura da proteína HsImpα5 complexada ao domínio PB2 de Influenza, que contém um NLS bipartido [Figura 24D, 24F; (Tarendeau *et al.*, 2007)]. Como o motivo ARM 10 está próximo ao sítio secundário da proteína, as variações na afinidade de peptídeos NLSs a este sítio de interação está relacionada com a flexibilidade dessa região que pode aumentar ou diminuir a interação com resíduos das extremidades das NLS ou causar um empedimento estérico para a ligação de determinadas sequências.

Mutações no ARM10 da proteína NcImpα inviabilizam a atuação da proteína em outros processos intracelulares como a localização intranuclear do maquinário heterocromático (Klocko *et al.*, 2015). Como o organismo *N. crassa* apresenta apenas uma isoforma da Impα, a mesma isoforma deve exercer todas as funções designadas a Impα. Portanto, o Arm 10 deve ser flexível tanto para o reconhecimento das NLSs quanto para direcionar a localização de moléculas dentro do núcleo.

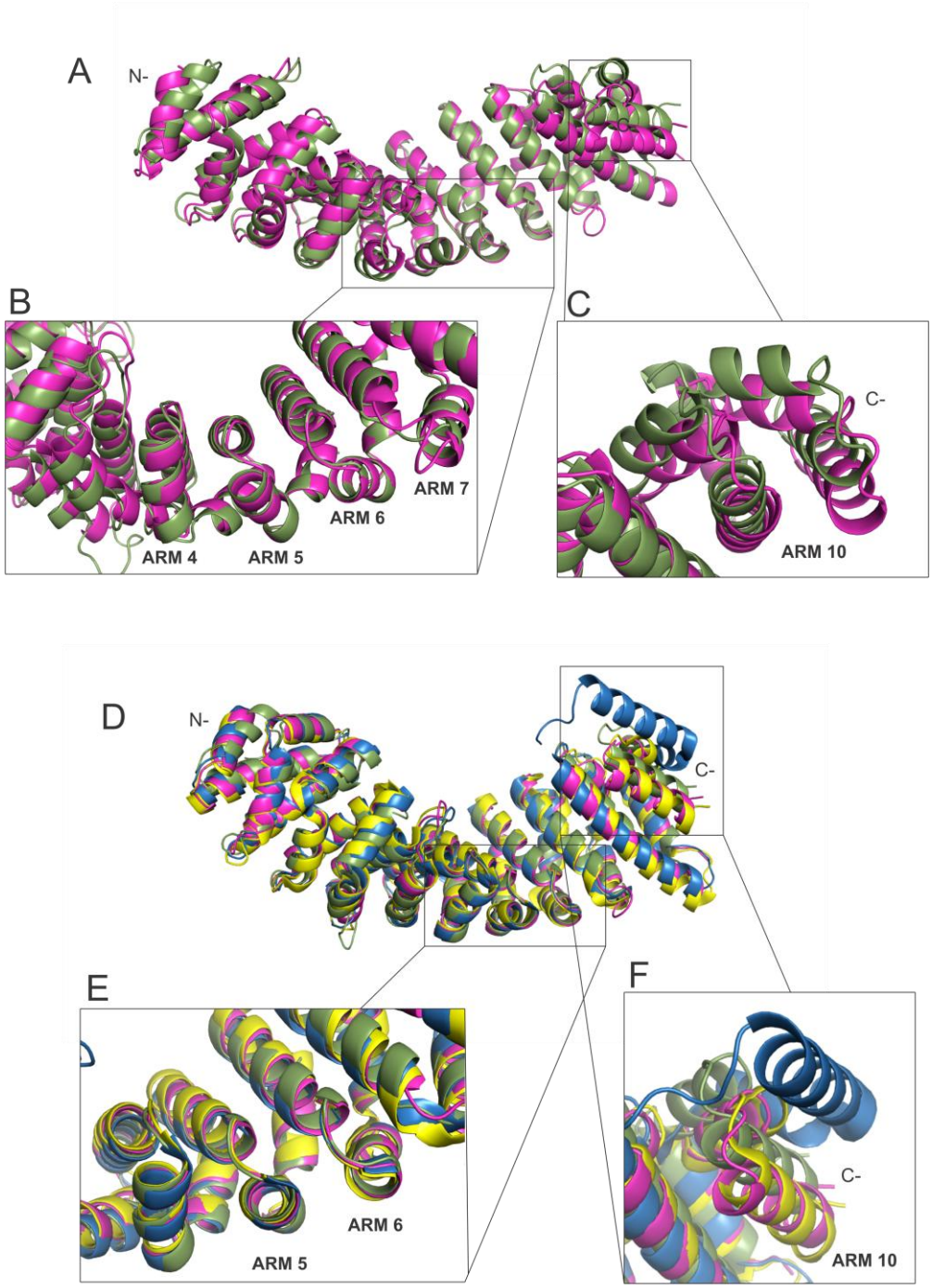



**Figura 24. Sobreposição da estrutura NcImpα com as estruturas das proteínas MmImpα, OsImpα e HsImpα.** A) Estrutura da proteína NcImpα em rosa, sobreposta a MmImpα, em verde. B) Destaque das regiões dos ARMS 5, 6 e 7, altamente conservados e C) região C-terminal onde o ARM 10 apresenta-se bastante flexível. D) Estrutura das proteínas NcImpα (rosa), MmImpα (verde), OsImpα [amarelo; PDB ID: 4B80**;** (Chang *et al.*, 2012**)**] e HsImpα [azul; PDB ID: 2JDQ; (Tarendeau *et al.*, 2007)] sobrepostas. E) Destaque das regiões dos ARMS 5 e 6, altamente conservados e F) região C-terminal onde o ARM 10 apresenta-se bastante flexível, principalmente na estrutura do complexo HsImpα/PB2 (Tarendau et. al., 2007). As estruturas OsImpα e NcImpα apresentam maior similaridade nessa região.

No trabalho publicado por Chang et. al., 2012, o peptídeo A89, descrito por Kosugi et. al., 2009 como sendo um NLS específico de plantas, foi co-cristalizado com as Impα de arroz (OsImpα) e camundongo (MmImpα). Curiosamente, o peptídeo se ligou apenas ao sítio secundário de OsImpα e apenas ao sítio principal de MmImpα (Chang et. al., 2012). Analisando as diferenças entre os sítios de ambas a proteínas, os autores identificaram que, no sítio secundário de MmImpα, a presença de resíduos não conservados na porção C-terminal, impediriam a interação da extremidade do NLS A89 com a proteína. Dentre os resíduos que causam esse impedimento estérico para a ligação de determinados NLSs ao sítio secundário da Impα de mamífero está o aminoácido treonina (T402) que é substituído pelo aminoácido serina na estrutura de OsImpα, assim como na proteína NcImpα [Figura 25; (Chang et. al., 2012; Bernardes et. al., 2015)]. Sendo assim, nessas proteínas, não há impedimento para a interação de determinados NLSs ao sítio secundário. Além disso, resíduos de lisina e ácido glutâmico que interagem e estabilizam as extremidades dos NLSs em OsImpα e NcImpα são substituídos por uma alanina e serina em MmImpα [Figura 25, (Chang *et. al*., 2012)]. Também é importante lembrar que OsImpα e NcImpα pertencem ao mesmo grupo filogenético α1 e apresentam uma identidade em torno de 63%, enquanto MmImpα pertence ao grupo α2 e apresenta apenas 46% de identidade com NcImpα (Bernardes et. al., 2015). Considerando essas informações, é possível inferir que os mesmo resíduos que impedem a ligação do peptídeo NLS A89 ao sítio secundário da proteína MmImpα, também dificulta a interação da porção N-terminal do peptídeo PAC3-NLS a esse sítio, o que justifica a maior flexibilidade dos resíduos do peptídeo no sítio secundário e menor afinidade do complexo MmImpα/PAC3-NLS comparado a NcImpα/PAC3-NLS.

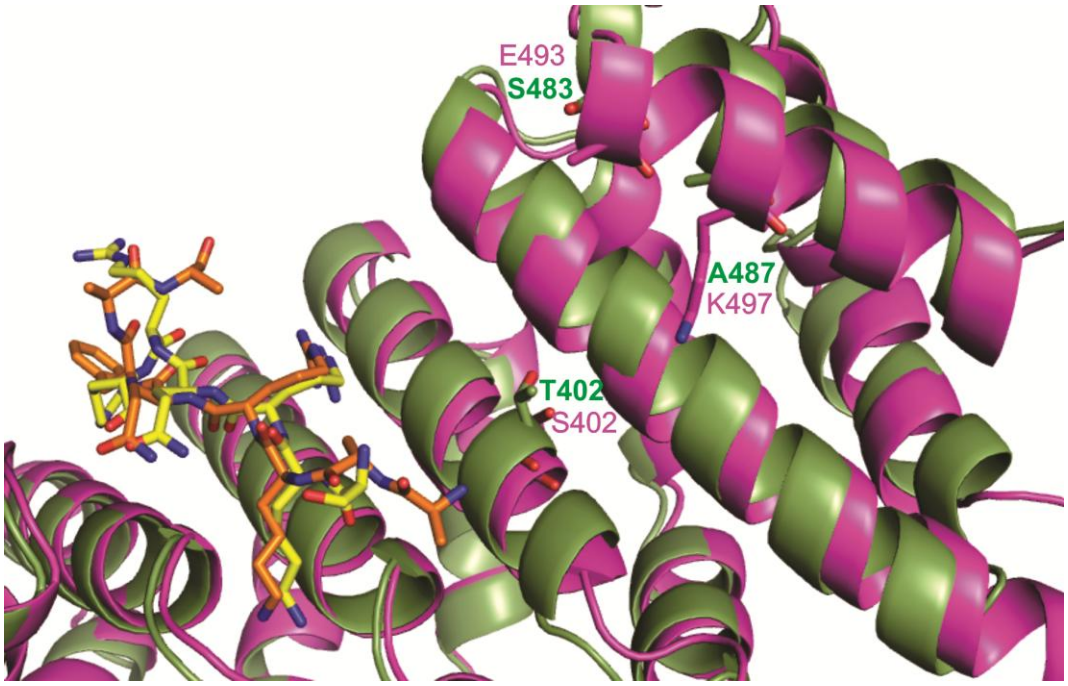



**Figura 25. Resíduos que dificultam a ligação de NLSs ao sítio secundário de MmImpα.** A figura mostra a região do sítio secundário das estruturas dos complexos NcImpα/ NIT2-NLS (rosa, PDB ID: 5VQ1) e MmImpα/PAC3-NLS (verde) sobrepostas. Os peptídeos NIT2-NLS e PAC3-NLS estão representados em bastões amarelos e larajas, respectivamente. Em destaque estão os aminoácidos não-conservados presentes em MmImpα que impedem a ligação da extremidade de determinados NLSs a esse sítio. Adaptado de Bernardes *et. al*., 2015.

## 6.3 Conclusão

A potencial sequência NLS identificada na proteína PAC-3 apresentou elevada afinidade com a proteína NcImpα, porém não foi possível cristalizar o complexo NcImpα/PAC3-NLS. No entanto, a estrutura do complexo MMImpα/PAC3-NLS mostrou que a NLS se liga em uma provável conformação bipartida, sendo que a interação da sequência ao sítio principal apresenta maior afinidade. A ligação de PAC3-NLS com MmImpα também mostrou que a sequência não corresponde ao consenso definido para NLSs clássicos, indicando que esse conceito deve ser redefinido e o peptídeo pode pertencer a uma classe diferente de NLSs. Também foram observadas diferenças estruturais entre as estruturas de NcImpα e MmImpα que devem ser significativas no reconhecimento de NLSs específicos.

# 7 Potenciais NLSs dos fatores de transcrição FLB-3, VEA e VOSA.

A proteína FLB-3 do fungo *N. crassa*, cuja proteína homóloga em *A. nidulans*, é conhecida como FLBC, é uma proteína *zinc-finger* descrita como responsável pela regulação do desenvolvimento dos fungos filamentosos através da ativação do gene brlA, que é o primeiro gene da via regulatória do processo de conidiação, etapa inicial do ciclo assexuado do fungo (Adams *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2012). Mutações na proteína FLB-3 resultaram em alto níveis de glicogênio e elevada expressão do gene glicogênio sintase, indicando a relação da proteína com o metabolismo de glicogênio em *N. crassa (*Gonçalves *et. al*., 2011). A deleção do gene FLB-3 em *N. crassa* resultou em uma baixa produção de macroconídia, inabilidade das culturas em desenvolver hifas aéreas, baixa produção de β-caroteno e esterilidade (Boni *et al.*, 2018). De acordo com sua função na regulação de genes relacionados ao crescimento do fungo, o fator de transcrição FLB-3 está localizado no interior do núcleo de células em desenvolvimento e hifas (Kwon *et al.*, 2010). Nesse trabalho, as potenciais sequências NLSs identificadas na proteína FLB-3 foram submetidas a testes de afinidade com a proteína Impα.

FLB-3 também atua como repressor do gene VOS-1 durante o crescimento vegetativo de *N. crassa*. A proteína VOS-1 faz parte de um grupo de proteínas importantes para regulação de processos metabólicos em fungos: as proteínas da família Velvet. Em *A. nidulans*, a proteína, VOS-1 é conhecida como VOSA e junto com VEA, atuam na regulação global do desenvolvimento sexual ou assexual de fungos em resposta à variações de luz do ambiente [Figura 26; (Calvo, 2008; Araujo-Bazan *et al.*, 2009)]. Ao contrário de FLB-3, VOSA é descrito com um fator de transcrição que atua como repressor do desenvolvimento assexuado, junto a proteína VelB, além de atuar na maturação de esporos [Figura 26; (Ni e Yu, 2007; Ahmed *et al.*, 2013)]. VOSA é localizado no núcleo de esporos e apresenta uma sequência NLS já identificada [Figura 27 (Ni e Yu, 2007)]. Nesse trabalho são apresentados experimentos de afinidade da proteína Impα com essa sequência a fim de comprovar que esta é uma sequência NLS.

Por fim, a proteína VEA, que pertence ao fungo *A. nidulans* e também faz parte do grupo *velvet* é descrita como reguladora do desenvolvimento do fungo em diferentes

condições de luminosidade (Araujo-Bazan *et al.*, 2009). Quando o fungo está em um ambiente exposto à luz, a proteína VEA é localizada no citoplasma, enquanto no escuro a proteína é localizada dentro do núcleo e promove o desenvolvimento do fungo na forma sexuada (Araujo-Bazan *et al.*, 2009). Além dessa atuação na morfogênese de fungos, a proteína VEA também está relacionada a regulação do metabolismo secundário, envolvendo a produção de moléculas como antibióticos e micotoxinas, as quais possuem um grande interesse clínico e comercial (Kato *et al.*, 2003; Stinnett *et al.*, 2007; Bayram, Krappmann, Ni, *et al.*, 2008; Bayram, Krappmann, Seiler, *et al.*, 2008). A localização da proteína VEA no núcleo celular depende de seu reconhecimento pela Impα por duas sequências NLSs presentes na porção N-terminal da proteína [Figura 27; (Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007)]. A proteína VE-1, ortóloga a VEA em *N. crassa* não apresenta NLSs identificados, no entanto, nesse trabalho são apresentadas as possíveis razões para que a sequência em VE-1 que é homóloga a NLS de VEA não funcione como uma NLS (Bayram, Krappmann, Seiler, *et al.*, 2008).

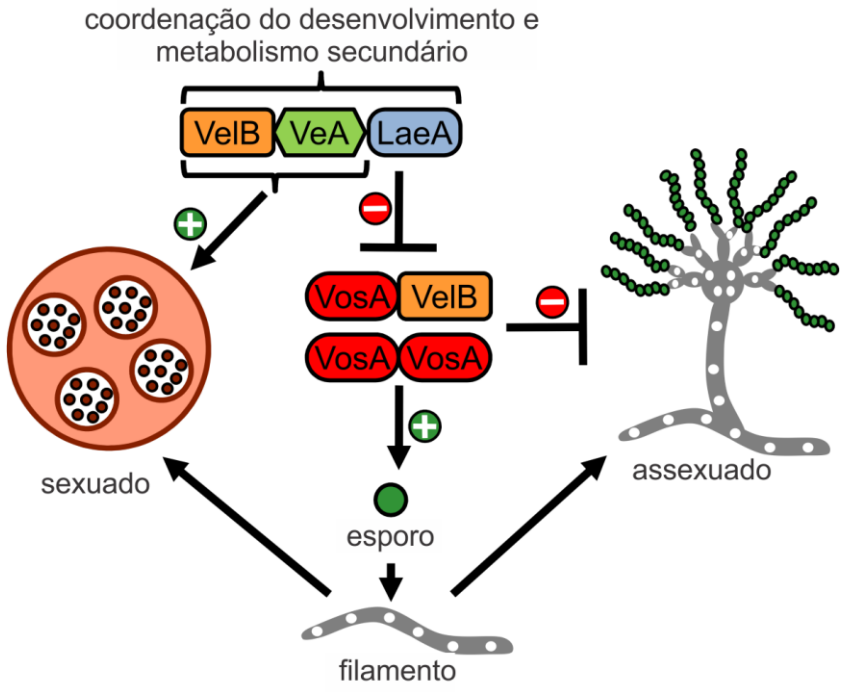



**Figura 26. Diagrama esquemático da função dos reguladores *velvet* no desenvolvimento de *A. nidulans*.** A proteína VelB é parte de ao menos dois complexos de proteínas *velvet*. No escuro, VosA-VelB inibem o desenvolvimento assexuado e, simultaneamente, VeA-VelB e a proteína não-velvet LaeA coordenam o desenvolvimento sexual com a produção da micotoxina Sterigmatocystin. A luz inibe esse processo e favorece o desenvolvimento assexuado. VosA contém um NLS, enquanto VeA proporciona o transporte de VelB ao interior do núcleo. VosA também é encontrada no núcleo de esporos. Adaptado de Ahmed *et. al.*, 2013.

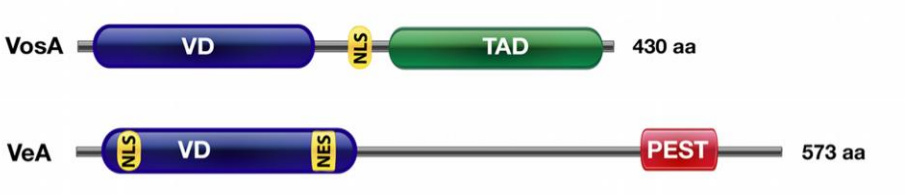



**Figura 27. Identificação dos domínios das proteínas da família velvet.** As proteínas da família *velvet* VeA e VosA de *A. nidulans* contém um domínio velvet homólogo (VD) que compreende uma região com 150-200 aminoácidos. Nas sequências dessas proteínas também é possível localizar regiões: NLSs, NES (sequências de exportação nuclear, PEST (regiões ricas em prolina, glutamato, serina e treonina, provavelmente relacionadas com a estabilidade das proteínas). Adaptado de Ahmed *et. al*., 2013.

## 7.1 Resultados

### 7.1.1 Identificação de potenciais peptídeos NLSs nas sequências das proteínas FLB-3, VEA e VOSA.

A predição de possíveis NLSs nas sequências dos fatores de transcrição FLB-3, VEA e VOSA, através dos programas PSORT e cNLS Mapper, além de pesquisas em trabalhos já publicados (Kim *et. al*., 2002; Ni e Yu, 2007; Bayram, Krappmann, Seiler, *et al.*, 2008) resultou nos dados apresentados na Tabela 12. Para a realização dos estudos de afinidade e cristalização desses NLSs com a proteína Impα, foram selecionados apenas as sequências com maior *score* ou já mencionadas em estudos anteriores, além de observar a presença de resíduos KR nas sequências e o comprimento da região de *linker*. Para a síntese dos peptídeos, foram adicionados resíduos nas extremidades de algumas das sequências para garantir a interação com a proteína Impα.

**Tabela 12. Prováveis NLSs identificados na sequência das proteínas FLB3, VEA e VOSA .** Os possíveis NLSs indicados pelos programas cNLS Mapper e PSORTII são apresentados na tabela, junto as sequências nas quais as buscas por NLSs foram realizadas. Em vermelho estão identificadas as NLSs sugeridas pelos programas e artigos e em negrito as NLSs selecionadas para os estudos posteriores.

| ORF | Sequência da proteína | NLSs previstos * |
|---|---|---|
| **FLB3**<br><br>**(NCU03043)** | MMMTLDANQHRFAPLNYDHMSYQSSQPHFTNPWGSSSGP<br>GGPPPPPPPQQPAPQNMYINNRDSAGLPHLNLAALPKRQ<br>HDVRNGSVWPHQPAAPGPVTTAPAGSAPMADVYRQQDLL<br>SMPQDHLLGLNRMPHPATSTAYDTSAYTTSASPVSTNYP<br>PSTSQYELGYPPATMRGAFGMAPDDTARRYSQQGIQPDD<br>RRSFQDALEASQGMLTMSQETPRNIYDVRNRARGSTDSY<br>GFPQTHSTGSSVSSASFGGYYGGSVDGSISDYSTAGSDI<br>ESLSGRSLPRPQGLMSSQPPAPQSMMGSFSSKVSTSTS**K**<br>**KHK**CKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFHCEVEGCGQ<br>FSVVSNL**RRHKKVHKP**QSETPSETGSEAGQHSE | [312]**KKHK**[315]<br><br>[360]**RRHKKVHKP**[368]<br><br>[337]TGEKPFHCEVEGCGRQFSVVSNLR<br>RKKVHK[367] |
| **VEA**<br><br>**(AN1052)** | MATLAAPPPPLGESGNSNSVSRITREG**KKITYKLNIMQQ**<br>**PKRARAC**GQGSKSHTDRRPVDPPPVIELNIFESDPHDDS<br>NKTDITFVYNANFFLFATLEPERPIATGKLMTNQGSPVL<br>TGVPVAGVAYLDKPNRAGYFIFPDLSVRNEGSYRFSFHL<br>FEQIKDPKDATEGTQPMPSPVPGKLSSPQEFLEFRLEVI<br>SNPFIVYSAKKFPGLTTSTPISRMIAEQGCRVRIRRDVR<br>MRRRGDKRTEDYDYDNERGYNNRRPDQYAGSDAYANAPE<br>RPRSTSISTNMDPYSYPSRRPSAVEYGQPIAQPYQRPMA<br>STPAPSSTPIPAPIPMPGPVALPPSTPSPASAHAPAPPS<br>VPLAAPPPLHTPSYQSHLSFGATQTQYPAPQLSHIPQQT<br>TTPTHPYSPRSSISHSRNQSISEYEPSMGYPGSQTRLSA<br>ERPSYGQPSQTTSLPPLRHSLEPSVNSRSKTPSNMITSL<br>PPIQSLSELPSTTSQPSSAIGSSPANEPGPRLWETNSML<br>SKRTYEESFGHDDRPLYNGMRPDSESYPGGMQRRPSYER<br>SSLLDGPDQMAYKRANGRMVSKPATMR | [40]PKRARAC[46]<br><br>[28]**KKITYKLNIMQQPKRAR**[44]<br><br>[36]IMQQPKRARAC[46]<br><br>[537]GMQRRPSYERSSLLDGPDQMAYK<br>RANG |
| **VOSA**<br><br>**(AN1559)** | MSAANYPDPSLPRPSTSDDFELIVRQNPNRARVAGGKEK<br>ERKPVDPPPIVQIRVREEGTYLAQHYLQSPYFFMSCSLY<br>DAQEDAPASIPPSTALTGTLVSSLHRLKDVDNTDGGFFV<br>WGDLSIKVEGDFRLKFSLFEMRKTDVVFLKSIVSERFTV<br>SPPKSFPGMAESTFLSRSFADQGVKLRIRKEPRTLIKRT<br>APRPEEYPQAAIPRSPSDRTAMQIPGSSYPAPPYQPTSR<br>DYSYYA**PVKRQRT**SVDYGARGMYDADGRMRQMETYPQTA<br>TLYGQPGGYPTPMMGYPSGHGGVPDYAMSYGLPPSAQVP<br>QMQDPAAQSRSSQQATMQSLGMVNPPGTPTPDSARAMMQ<br>QAYPRPQYSASTAVLPPLQQSRNYPQGTNGATRGYYEQS<br>PQATPILPSQPLGTSEAERYGVPPGHTGYDHTGSANGTP<br>R | [238]YYAPVKRQRTS[248]<br><br>[241]**PVKRQRT**[247] |

*** As sequências obtidas nos banco de dados foram comparadas com as potenciais NLSs descritas na literatura, presentes nas proteínas FLB-3 (Gonçalves *et. al.*, 2011), VOSA (Ni e Yu, 2007) e VEA (Kim *et. al.*, 2002; Stinnet *et. al.*, 2007).**

## 7.1.2 Afinidade dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS, VE1-NLS, VEA-NLS e VOSA-NLS com a proteína NcImp*α*

### 7.1.2.1 FLB3a-NLS e FLB3b-NLS

A busca por NLSs no fator de transcrição FLB-3 apresentou duas sequências que apresentam características de NLSs: FLB3a-NLS: [307]STSKKHKCKV[316] e FLB3b-

NLS: $^{357}$SNLRRHKKVHKPQS$^{370}$. Para calcular a afinidade de cada peptídeo com a NcImpα, utilizou-se os peptídeos em uma concentração 50 vezes maior do que a proteína para FLB3a-NLS (2mM e 40µM, respectivamente) e 25 vezes maior para FLB3b-NLS (1mM e 40µM). Os dados foram processados, considerando um modelo em que os peptídeos ocupam os dois sítios da proteína (Figura 28A e 28B), o processamento dos dados indicou valores de $K_d$ de 74,60 ± 12,90 µM para o sítio 1 e 0,20 ± 0,74 µM para o sítio 2 de FLB3a-NLS e 221 ± 88,50 µM para o sítio 1 e 7,87 ± 2,40 µM para o sítio 2 de FLB3b-NLS. Esses valores mostram que ambos os peptídeos parecem ter uma maior afinidade com apenas um dos sítios de NcImpα (Tabela 13).

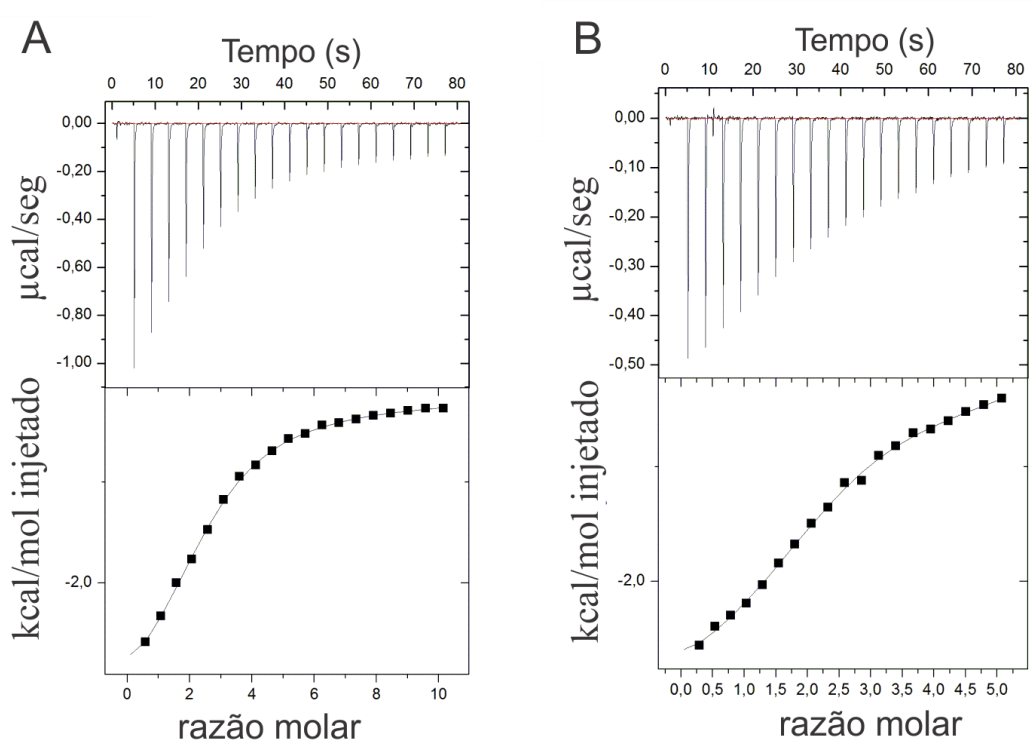



**Figura 28. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) NcImpα/FLB3a-NLS; B) NcImpα/FLB3b-NLS.**

### 7.1.2.2 VE1-NLS, VEA-NLS e VOSA-NLS

O peptídeo VEA-NLS apresenta uma sequência característica de uma NLS ($^{28}$KKITYKLNIMQQPKRAR$^{44}$), enquanto o peptídeo VE1-NLS seria a sequência correspondente na proteína VE-1 ($^{28}$RKLWYSLRVVQEPLRARAC$^{44}$), no entanto esses peptídeos apresentam algumas diferenças em suas sequências, o que refletiu diretamente nos resultados de afinidade. O peptídeo VEA-NLS apresentou um $K_d$ de 9,34 ± 0,67 µM, considerando apenas um sítio de interação (Figuras 29A), o que indica que o peptídeo é um provável NLS e apresenta uma afinidade considerada alta com a NcImpα. Já o peptídeo VE1-NLS apresentou uma afinidade muito baixa ou nula (Figura 29B), que não permitiu o cálculo de $K_d$, portanto, não é considerado um NLS.

As medidas de afinidade com o peptídeo VOSA-NLS ($^{241}$PVKRQRT$^{247}$) também indicou elevada afinidade do peptídeo com a NcImpα, conforme demonstrado pelo $K_d$ de 5,60 ± 1,00 µM, considerando um modelo em que apenas um sítio da proteína é ocupado pelo peptídeo (Tabela 13; Figura 29C).

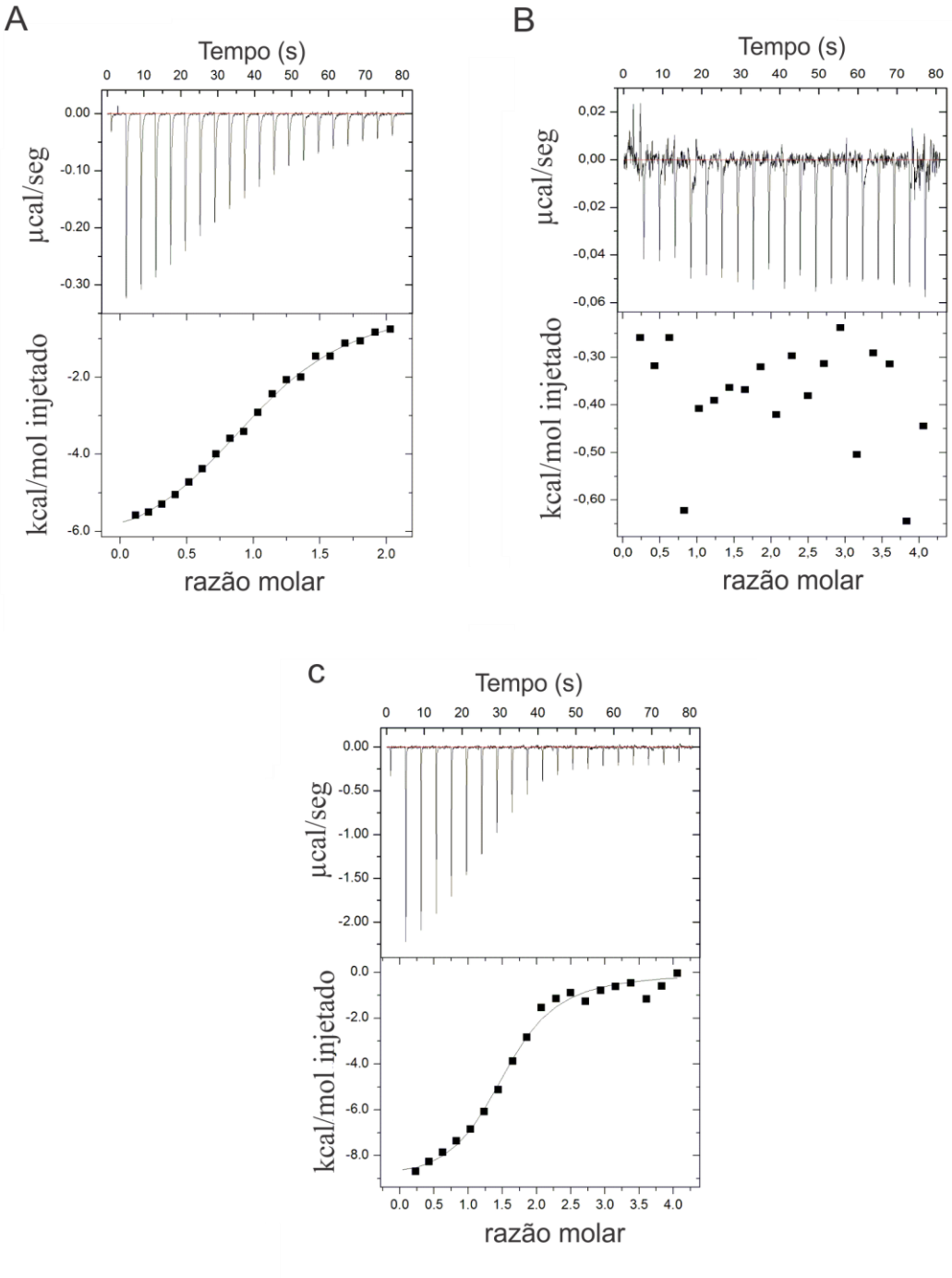


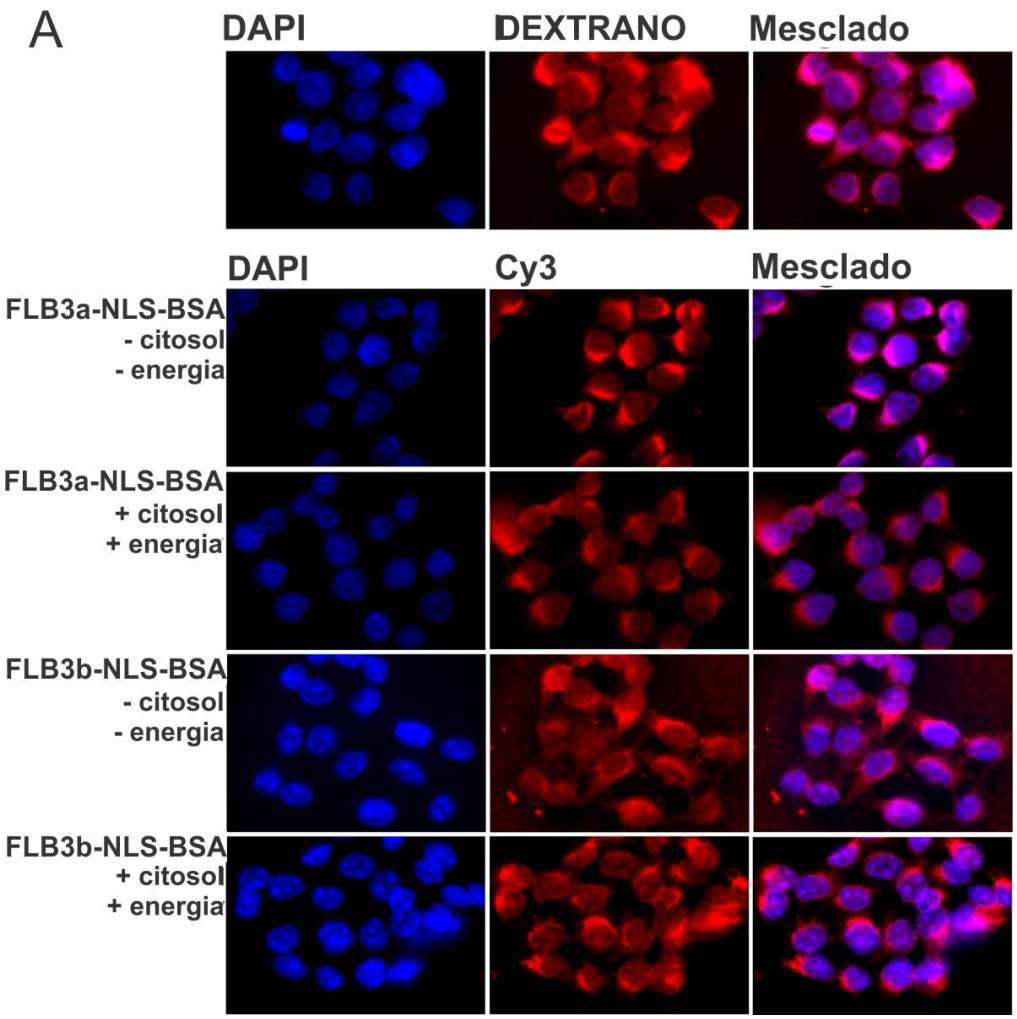

**Figura 29. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) NcImpα/VEA-NLS; B) NcImpα/VE1-NLS; C) NcImpα/VOSA-NLS.**

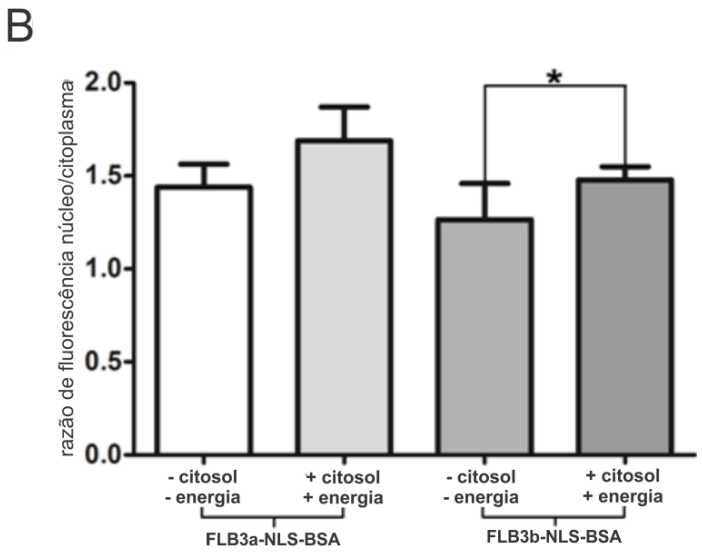
**Tabela 13. Constantes termodinâmicas obtidas a partir dos experimentos de ITC dos complexos NcImpα/FLB3a-NLS, NcImpα/FLB3b-NLS, NcImpα/VEA-NLS, NcImpα/VOSA-NLS.**

| Complexos | n | Kd (μM) | ΔH (Kcal/mol) | ΔS(cal/mol/deg) |
|---|---|---|---|---|
| NcImpα/FLB3a-NLS | 1,40 | 74,6 ± 12,90 | -4,08 ± 0,28 | 4,95 |
| | 1,48 | 0,20 ± 0,74 | -2,35 ± 0,08 | 22,60 |
| NcImpα/FLB3b-NLS | 1,36 | 221 ± 88,5 | -5,74 ± 1,52 | - 2,87 |
| | 2,04 | 7,87 ± 2,40 | -2,53 ± 0,10 | 14,7 |
| NcImpα/VEA-NLS | 1,08 | 9,34 ± 0,67 | -6,76 ± 0,13 | - 0,08 |
| NcImpα/VOSA-NLS | 1,52 | 5,6 ± 1,00 | -9,29 ± 0,31 | -7,70 |

### 7.1.3 Ensaios de Importação nuclear com os peptídeos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA

Através dos ensaios de importação nuclear com os peptídeos NLSs conjugados com BSA, foi possível observar que apenas uma pequena fração dos complexos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA foi importada para o interior do núcleo das células permeabilizadas com digitonina e na presença de citosol (Figura 30A). A quantificação do transporte das macromoléculas também mostrou que a eficiência da importação dos complexos BIMAX1-NLS-BSA e SV40-NLS-BSA é significativamente maior do que quando NLS fúngicos foram utilizados (Figura 30A).




(Legenda na próxima página)

**Figura 30. Ensaios de importação nuclear em células Hela com os complexos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA.** (A) Os complexos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA marcados com Cy3 (vermelho) foram incubados em células HeLa permeabilizadas com digitonina na presença ou ausência de citosol, e um sistema de regeneração de energia. O experimento controle com dextrano (70 kDa) marcado com Texas Red foi realizado para verificar que a membrana plasmática, mas não o envelope nuclear das células, foi permeabilizada pela digitonina. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência, e imagens representativas de três experimentos são mostrados. (B) Diagrama de barras da razão de fluorescência nuclear/citoplasmática para os experimentos mostrados em A. A quantificação foi realizada usando ImageJ. São mostrados o valor médio e erro padrão da média obtida de 150-200 células para cada condição a partir de três experimentos independentes. * P <0,05, teste t de Student não pareado.

## 7.2 Discussão

### 7.2.1 A substituição de uma lisina por uma leucina no peptídeo VE1-NLS impede a ligação a NcImpα

As proteínas VEA e VE-1 são proteínas homólogas que pertencem a organismos diferentes [*A. nidulans* e *N. crassa*, respectivamente; (Bayram, Krappmann, Seiler, *et al.*, 2008; Calvo, 2008)]. No entanto, a afinidade do peptídeo VE1-NLS com a NcImpα, se mostrou nula, o que impossibilitou o cálculo de $K_d$, enquanto o valor de $K_d$ obtido para o peptídeo VEA-NLS foi compatível com o do controle SV40-NLS (Bernardes *et al.*, 2015) e característico de um NLS bipartido. Portanto, os dados de afinidade de interação desses peptídeos com a NcImpα evidenciam que as pequenas diferenças nas sequências desses dois peptídeos são determinantes para mudanças significativas na afinidade dos complexos. Analisando o alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos VEA-NLS e VE1-NLS e considerando que a ligação do peptídeo VEA-NLS com a Impα ocorre de forma similar a outros complexos Impα/NLSs bipartidos, onde os resíduos de lisina e arginina interagem com a proteína nas posições P1'/P2' e P2/P3, é sugerido que a substituição do resíduo de lisina em VEA-NLS por um resíduo de leucina em VE1-NLS acaba por reduzir consideravelmente a afinidade do peptídeo pelo sítio principal da proteína. No sítio secundário, a ligação da sequência KK da porção N-terminal de VEA-NLS ás posições P1' e P2' é improvável e nunca descrita na literatura. Portanto, como os experimentos de afinidade indicaram uma estequiometria de 1:1, com o peptídeo ocupando apenas um sítio é provável que o peptídeo se ligue apenas ao sítio

secundário da protéina. Esse resultado contraria os dados da literatura que descrevem o peptídeo VEA-NLS como sendo bipartido (Stinnet *et. al*., 2007). No entanto, no trabalho de Stinnet e colaboradores também é mostrado que a região $^{37}$MQQPKRAR$^{44}$ é suficiente para interagir com a Impα (Stinnet *et. al*., 2007).

Os resultados indicam que, apesar de serem proteínas homólogas, o mecanismo de transporte das proteínas VEA e VE1 para o interior do núcleo celular é diferente, podendo estar relacionado com variações nas funções que cada uma exerce em cada organismo.

### 7.2.2 O peptídeo VOSA-NLS deve se ligar a proteína Impα em uma conformação monopartida similar a NIT2-NLS.

O peptídeo VOSA-NLS também apresentou elevada afinidade sendo compatível com um modelo de interação em que apenas um dos sítios de ligação da proteína é ocupado pelo peptídeo. Considerando o comprimento da sequência de aminoácidos de VOSA-NLS sugere-se que este é um provável NLS monopartido, que se liga apenas a um dos dois sítios da proteína. Comparando a sequência VOSA-NLS com a sequência dos peptídeos já cristalizados junto a proteína NcImpα, é possível observar a similaridade com o peptídeo NIT2-NLS. Portando, se sugere que o modo de ligação do peptídeo VOSA-NLS seja o mesmo do peptídeo NIT2-NLS, com uma interação preferencial ao sítio principal, que é o sítio mais conservado entre as Impα (**Tabela 14)**.

**Tabela 14. Sugestão da ligação dos peptídeos VEA-NLS e VOSA-NLS aos sítios da proteína Impα.** Alinhamento dos resíduos dos peptídeos NIT2-NLSs e SV40-NLS que interagem com o sítio principal e secundário da proteína Impα e sugestão do provável modo de ligação dos peptídeos VEA-NLS e VOSA-NLS, considerando que as posições P1'/P2' e P2/P3/P5 são ocupadas pelos resíduos de lisina e arginina, conforme observado na estrutura de outros complexos Impα/peptídeos NLS. Também é mostrado como as diferenças nos resíduos de VE1-NLS (em cinza) impedem sua ligação a Impα. Os aminoácidos que , preferencialmente, devem se ligar a Impα, estão sublinhados.

| | | | | | P1' | P2' | P3' | P4' | | | | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VEA-NLS** | | | | | K | K | I | T | Y | KLNIM | Q | Q | P | K | R | A | R | | | |
| **VE1-NLS** | | | | | R | K | L | W | Y | SLRVV | Q | E | P | L | R | A | R | A | C | |
| **VOSA-NLS** | | | | | | | | | | | | P | V | K | R | Q | R | T | | |
| **NIT2-NLS** | T | I | S | S | K | R | Q | R | R | H | | S | S | K | R | Q | R | R | | |
| **SV40-NLS** | | P | K | K | K | R | K | V | | | | P | P | K | K | K | R | K | V | |

### 7.2.3 As sequências NLSs encontradas na proteína FLB-3 interagem com apenas um dos sítios da proteína NcImpα.

Por fim, foi possível notar que a afinidade de FLB3b-NLS e FLB3a-NLS com a NcImpα é alta em apenas um dos sítios da proteína. Portanto, pode ser que a interação desses peptídeos com a NcImpα ocorra de forma monopartida mas com a ligação preferencial a um dos sítios, como ocorre com o peptídeo hPLSCR4-NLS complexado a Impα de mamífero [MmImpα; (Lott *et al.*, 2011)]. Nesse complexo, as constantes de dissociação obtidas através de medidas de ITC foram compatíveis com a interação do peptídeo em apenas um sitio e, na estrutura cristalográfica do complexo o peptídeo só se ligou ao sítio secundário (Lott *et. al.* 2011). Os ensaios de importação nuclear também indicaram que a importação de ambos os peptídeos para o núcleo das células permeabilizadas não ocorre de forma eficiente. Alinhando as sequências dos peptídeos FLB3a-NLS e FLB3b-NLS com as prováveis posições que os resíduos ocupariam na proteína e comparando com o modo de ligação de outros peptídeos NLSs (ver tabela em de Barros *et. al.*, 2016), se observa que apesar de ambas as sequências apresentarem resíduos básicos de lisina e arginina, nenhuma delas apresenta o conjunto 'KR' que é comum a quase todas as sequências. Supondo que os peptídeos FLB3a-NLS e FLB3b-NLS se liguem a Impα e comparando com a interação de outros complexos, FLB3a-NLS se ligaria ao sítio principal e FLB3b-NLS ao sítio secundário (Tabela 15), pois de acordo com as estruturas de MmImpα complexada aos peptídeos NLSs de KU80 e CBP80, é possível a ligação de resíduos RR nas posições P1'/P2' e KK nas posições P2/P3 [Tabela 15; (Dias *et. a*l., 2009; Takeda *et al.*, 2011)].

Um estudo apresentado por Wu e colaboradores (Wu *et al.*, 2017), sugeriu a hipótese de que dois peptídeos NLS com baixa afinidade atuam de forma sinérgica no processo de reconhecimento da nucleoproteína de Influenza A pela Impα humana. Como ambos os potenciais peptídeos NLS da proteína FLB3 têm elevada afinidade a apenas um dos sítios de NcImpα, uma hipótese é que esses NLSs também atuem de forma sinérgica.

**Tabela 15. Sugestão da ligação dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS aos sítios da proteína Impα.** Sugestão do possível modo de ligação dos peptídeos FLB3a-NLS e FLB3-NLS, considerando que as posições P1'/P2' e P2/P3 são ocupadas pelos resíduos de lisina e arginina, destacadas em vermelho, conforme observado na estrutura de outros complexos Impα/peptídeos NLS. Os aminoácidos que , preferencialmente, devem se ligar a Impα, estão sublinhados.

| | | | P1' | P2' | P3' | P4' | | | | | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **FLB3a-NLS** | ST | S | K | K | H | K | C | K | V | | ST | S | K | K | H | K | C | KV |
| **FLB3b-NLS** | SN | L | R | R | H | K | V | H | KPQS | S | N | L | R | R | H | K | K | V... |
| **KU80** | | | | | | | | | EDG | P | T | A | K | K | L | K | T | E |
| **CBP80** | | S | R | R | R | H | S | D | NDGG | Q | P | H | K | R | R | K | T | S |

## 7.3 Conclusão

Os peptídeos VEA-NLS e VOSA-NLS têm elevada afinidade com a proteína NcImpα. Esse trabalho sugere que esses peptídeos são responsáveis pelo transporte das proteína VEA e VOSA, adotando uma conformação monopartida e ligando apenas a um dos sítios da proteína. A ligação do peptídeo VE1-NLS com a NcImpα é afetada pela substituição do resíduo de arginina por um resíduo de leucina em P2.

Os prováveis NLSs da proteína FLB-3, FLB3b-NLS e FLB2a-NLS, têm elevada afinidade a apenas um dos sítios da proteína NcImpα e parecem interagir com a proteína em um modo de interação não-clássico. Uma hipótese é que FLB3b-NLS e FLB2a-NLS atuam de forma sinérgica.

# 8 Conclusões finais

Os fatores de transcrição NIT-2, PAC-3, FLB-3, VEA e VOSA apresentam NLSs com afinidade significativa a proteína NcImpα. Dentre estas, as NLSs de NIT-2, FLB-3, VEA e VOSA são NLSs monopartidas, enquanto a NLS de PAC-3 é bipartida.

A estrutura do complexo NcImpα/NIT2-NLS além de mostrar que o peptídeo se liga de forma clássica, também indicou que o sítio secundário da proteína é importante no reconhecimento de NLSs, diferente do sugerido em outros estudos com Impα da família α1. Também foi demonstrado que a presença de residuos de glutamina nas NLSs não interfere na ligação das sequências com a Impα.

A estrutura do complexo MmImpα/PAC3-NLS comprovou que a NLS se liga de forma bipartida tanto a proteína NcImpα quanto MmImpα. Nessa estrutura, a ligação de um resíduo de glutamina na posição P5 demonstra que essa NLS não é compatível com o consenso das NLSs clássicas, o que contribui para a amplificação desse conceito.

Por fim, a comparação das sequências dos peptídeos VEA-NLS e VE1-NLS mostrou que a substituição de um resíduo de lisina por uma leucina na posição P2 é suficiente para reduzir drasticamente a afinidade do peptídeo VE1-NLS pela NcImpα.

O peptídeo VOSA-NLS deve se ligar a NcImpα em uma conformação muito semelhante ao peptídeo NIT2-NLS, porém interagindo com apenas um dos sítios de NcImpα assim como as NLSs da proteína FLB3-NLS.

# 9 Referências Bibliográficas


ADAM, S. A.; MARR, R. S.; GERACE, L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. **J Cell Biol,** v. 111, n. 3, p. 807-16, Sep 1990. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391365 >.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in Aspergillus nidulans. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR,** v. 62, n. 1, p. 35-54, Mar 1998. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529886 >.

AHMED, Y. L. et al. The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF-kappaB. **PLoS biology,** v. 11, n. 12, p. e1001750, Dec 2013. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391470 >.

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. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491282 >.

ARAUJO-BAZAN, L. et al. Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in Aspergillus nidulans. **Fungal Genet Biol,** v. 46, n. 6-7, p. 506-15, Jun-Jul 2009. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318129 >.

BARROS, A. C. et al. Structural and Calorimetric Studies Demonstrate that Xeroderma Pigmentosum Type G (XPG) Can Be Imported to the Nucleus by a Classical Nuclear Import Pathway via a Monopartite NLS Sequence. **J Mol Biol,** v. 428, n. 10 Pt A, p. 2120-31, May 22 2016. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812207 >.

BAYRAM, O. et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science,** v. 320, n. 5882, p. 1504-6, Jun 13 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556559 >.

BAYRAM, O. et al. Neurospora crassa ve-1 affects asexual conidiation. **Fungal Genet Biol,** v. 45, n. 2, p. 127-38, Feb 2008. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631397 >.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 27, n. 11, p. 499-506, Nov 15 1941. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16588492 >.

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. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091498 >.

BERNARDES, N. E. et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin-alpha from Neurospora crassa. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun,** v. 70, n. Pt 4, p. 501-4, Apr 2014. ISSN 2053-230X (Electronic) 2053-230X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699749 >.

BERNARDES, N. E. et al. Nuclear transport of the Neurospora crassa NIT-2 transcription factor is mediated by Importin-alpha. **Biochem J**, Oct 20 2017. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054975 >.

BERTUZZI, M. et al. The pH-responsive PacC transcription factor of Aspergillus fumigatus governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathog,** v. 10, n. 10, p. e1004413, Oct 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329394 >.

BONI, A. C. et al. Neurospora crassa developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor. **Fungal biology,** v. 122, n. 6, p. 570-582, Jun 2018. ISSN 1878-6146 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29801802 >.

BREEUWER, M.; GOLDFARB, D. S. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. **Cell,** v. 60, n. 6, p. 999-1008, Mar 23 1990. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690602 >.

CALVO, A. M. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. **Fungal Genet Biol,** v. 45, n. 7, p. 1053-61, Jul 2008. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457967 >.

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. ISSN 1532-298X (Electronic) 1040-4651 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250448 >.

CHANG, C. W. et al. The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site inplantnuclear import factor importin-alpha. **Plant Signal Behav,** v. 8, n. 10, Oct 2013. ISSN 1559-2324 (Electronic) 1559-2316 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270630 >.

CHANG, C. W. et al. Structural basis of interaction of bipartite nuclear localization signal from Agrobacterium VirD2 with rice importin-alpha. **Molecular plant,** v. 7, n. 6, p. 1061-4, Jun 2014. ISSN 1752-9867 (Electronic) 1674-2052 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503158 >.

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. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611084 >.

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. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353245 >.

CHRISTIE, M. et al. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. **J Mol Biol,** v. 428, n. 10 Pt A, p. 2060-90, May 22 2016. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523678 >.

CONTI, E.; IZAURRALDE, E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. **Curr Opin Cell Biol,** v. 13, n. 3, p. 310-9, Jun 2001. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343901 >.

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. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745017 >.

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. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695948 >.

COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem,** v. 76, p. 647-71, 2007. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506639 >.

CUTRESS, M. L. et al. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **J Cell Sci,** v. 121, n. Pt 7, p. 957-68, Apr 1 2008. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319300 >.

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. Timeline: Neurospora: a model of model microbes. **Nat Rev Genet,** v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988765 >.

DIAS SM, WILSON KF, ROJAS KS, AMBROSIO AL, CERIONE RA. The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. **Nat Struct Mol Biol**. 2009;16:930–937.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? **Trends Biochem Sci,** v. 16, n. 12, p. 478-81, Dec 1991. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664152 >.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,** v. 66, n. Pt 4, p. 486-501, Apr 2010. ISSN 1399-0047 (Electronic) 0907-4449 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383002 >.

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. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806202 >.

FONTES, M. R. et al. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. **The Journal of biological chemistry,** v. 278, n. 30, p. 27981-7, Jul 25 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695505 >.

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. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764582 >.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus Neurospora crassa. **Nature,** v. 422, n. 6934, p. 859-68, Apr 24 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712197 >.

GERALDO, M. T. et al. Bending-Twisting Motions and Main Interactions in Nucleoplasmin Nuclear Import. **PloS one,** v. 11, n. 6, p. e0157162, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27258022 >.

GOLDFARB, D. S. et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends Cell Biol,** v. 14, n. 9, p. 505-14, Sep 2004. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350979 >.

GONCALVES, R. D. et al. A genome-wide screen for Neurospora crassa transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol Cell Proteomics,** v. 10, n. 11, p. M111 007963, Nov 2011. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21768394 >.

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 01 1995. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627554 >.

GORLICH, D.; KUTAY, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v. 15, p. 607-60, 1999. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611974 >.

GORLICH, D.; MATTAJ, I. W. Nucleocytoplasmic transport. **Science,** v. 271, n. 5255, p. 1513-8, Mar 15 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599106 >.

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 02 1994. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001116 >.

HAMAMOTO, T.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action of leptomycin B on Schizosaccharomyces pombe. **J Antibiot (Tokyo),** v. 38, n. 11, p. 1573-80, Nov 1985. ISSN 0021-8820 (Print) 0021-8820 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4077736 >.

HICKS, G. R.; RAIKHEL, N. V. Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 92, n. 3, p. 734-8, Jan 31 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7846044 >.

HODEL, M. R.; CORBETT, A. H.; HODEL, A. E. Dissection of a nuclear localization signal. **J Biol Chem,** v. 276, n. 2, p. 1317-25, Jan 12 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038364 >.

HU, J. et al. Novel importin-alpha family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse. **J Biol Chem,** v. 285, n. 43, p. 33113-22, Oct 22 2010. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699224 >.

KATO, N.; BROOKS, W.; CALVO, A. M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in Aspergillus nidulans is controlled by veA, a gene required for sexual development. **Eukaryot Cell,** v. 2, n. 6, p. 1178-86, Dec 2003. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665453 >.

KELLEY, J. B. et al. Karyopherin alpha7 (KPNA7), a divergent member of the importin alpha family of nuclear import receptors. **BMC Cell Biol,** v. 11, p. 63, Aug 11 2010. ISSN 1471-2121 (Electronic) 1471-2121 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701745 >.

KEMINER, O.; PETERS, R. Permeability of single nuclear pores. **Biophys J,** v. 77, n. 1, p. 217-28, Jul 1999. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388751 >.

KIM, H. et al. The veA gene activates sexual development in Aspergillus nidulans. **Fungal Genet Biol,** v. 37, n. 1, p. 72-80, Oct 2002. ISSN 1087-1845 (Print) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223191 >.

KIRBY, T. W. et al. Nuclear Localization of the DNA Repair Scaffold XRCC1: Uncovering the Functional Role of a Bipartite NLS. **Scientific reports,** v. 5, p. 13405, Aug 25 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26304019 >.

KLOCKO, A. D. et al. Neurospora importin alpha is required for normal heterochromatic formation and DNA methylation. **PLoS genetics,** v. 11, n. 3, p. e1005083, Mar 2015. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793375 >.

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 04 2009. ISSN 1568-7864 (Print) 1568-7856 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376751 >.

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. ISSN 1072-8368 (Print) 1072-8368 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201409 >.

KOHLER, M. et al. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. **FEBS Lett,** v. 417, n. 1, p. 104-8, Nov 3 1997. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395085 >.

KOHLER, M. et al. Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. **Mol Cell Biol,** v. 19, n. 11, p. 7782-91, Nov 1999. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523667 >.

KOSUGI, S. et al. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. **Chem Biol,** v. 15, n. 9, p. 940-9, Sep 22 2008. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804031 >.

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 02 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001369 >.

KOSUGI, S. et al. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 106, n. 25, p. 10171-6, Jun 23 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520826 >.

KWON, N. J. et al. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in Aspergillus nidulans. **Mol Microbiol,** v. 77, n. 5, p. 1203-19, Sep 2010. ISSN 1365-2958 (Electronic) 0950-382X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624219 >.

KWON, N. J. et al. The putative guanine nucleotide exchange factor RicA mediates upstream signaling for growth and development in Aspergillus. **Eukaryotic cell,** v. 11, n. 11, p. 1399-412, Nov 2012. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002107 >.

LADBURY, J. E. Application of isothermal titration calorimetry in the biological sciences: things are heating up! **Biotechniques,** v. 37, n. 6, p. 885-7, Dec 2004. ISSN 0736-6205 (Print) 0736-6205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15597533 >.

LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chem Biol,** v. 3, n. 10, p. 791-801, Oct 1996. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939696 >.

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. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170104 >.

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. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515464 >.

LAURILA, E. et al. KPNA7, a nuclear transport receptor, promotes malignant properties of pancreatic cancer cells in vitro. **Exp Cell Res,** v. 322, n. 1, p. 159-67, Mar 10 2014. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275456 >.

LIN, J. R.; HU, J. SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e76864, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204689 >.

LOTT, K. et al. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin alpha1. **J Biol Chem,** v. 286, n. 32, p. 28160-9, Aug 12 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690087 >.

MARFORI, M. et al. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin-alpha. **Traffic,** v. 13, n. 4, p. 532-48, Apr 2012. ISSN 1600-0854 (Electronic) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248489 >.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 61, n. 1, p. 17-32, Mar 1997. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106362 >.

MASON, D. A.; FLEMING, R. J.; GOLDFARB, D. S. Drosophila melanogaster importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. **Genetics,** v. 161, n. 1, p. 157-70, May 2002. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019231 >.

MEHDI, A. M. et al. A probabilistic model of nuclear import of proteins. **Bioinformatics,** v. 27, n. 9, p. 1239-46, May 01 2011. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372083 >.

MINGOT, J. M. et al. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the Aspergillus nidulans PacC transcription factor. **Mol Cell Biol,** v. 21, n. 5, p. 1688-99, Mar 2001. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238906 >.

NAKADA, R.; HIRANO, H.; MATSUURA, Y. Structural basis for the regulation of nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) by phosphorylation of the nuclear localization signal. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 484, n. 1, p. 113-117, Feb 26 2017. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104399 >.

NARDOZZI, J. et al. Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin alpha5. **J Mol Biol,** v. 402, n. 1, p. 83-100, Sep 10 2010. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643137 >.

NI, M.; YU, J. H. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in Aspergillus nidulans. **PLoS One,** v. 2, n. 10, p. e970, Oct 03 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912349 >.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol,** v. 276, p. 307-26, 1997. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27754618 >.

PAN, H.; FENG, B.; MARZLUF, G. A. Two distinct protein-protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in Neurospora crassa. **Molecular microbiology,** v. 26, n. 4, p. 721-9, Nov 1997. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427402 >.

PEIFER, M.; BERG, S.; REYNOLDS, A. B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. **Cell,** v. 76, n. 5, p. 789-91, Mar 11 1994. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907279 >.

PERKINS, D. D.; DAVIS, R. H. Neurospora at the millennium. **Fungal Genet Biol,** v. 31, n. 3, p. 153-67, Dec 2000. ISSN 1087-1845 (Print) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273678 >.

PUMROY, R. A. et al. Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin alpha isoforms 3 and 7. **Structure,** v. 23, n. 2, p. 374-84, Feb 03 2015. ISSN 1878-4186 (Electronic) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599645 >.

SANKHALA, R. S. et al. Three-dimensional context rather than NLS amino acid sequence determines importin alpha subtype specificity for RCC1. **Nat Commun,** v. 8, n. 1, p. 979, Oct 17 2017. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29042532 >.

SCHEDLICH, L. J. et al. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. **J Biol Chem,** v. 275, n. 31, p. 23462-70, Aug 04 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811646 >.

SMITH, H. M.; HICKS, G. R.; RAIKHEL, N. V. Importin alpha from Arabidopsis thaliana is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. **Plant Physiol,** v. 114, n. 2, p. 411-7, Jun 1997. ISSN 0032-0889 (Print) 0032-0889 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9193081 >.

SMITH, K. M. et al. Structural Basis for Importin-alpha Binding of the Human Immunodeficiency Virus Tat. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1650, May 10 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490747 >.

SOROKIN, A. V.; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. **Biochemistry. Biokhimiia,** v. 72, n. 13, p. 1439-57, Dec 2007. ISSN 0006-2979 (Print) 0006-2979 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282135 >.

STEWART, M. Structural basis for the nuclear protein import cycle. **Biochem Soc Trans,** v. 34, n. Pt 5, p. 701-4, Nov 2006. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052178 >.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 3, p. 195-208, Mar 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287812 >.

STINNETT, S. M. et al. Aspergillus nidulans VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. **Mol Microbiol,** v. 63, n. 1, p. 242-55, Jan 2007. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163983 >.

TAKEDA, A. A. et al. Structural basis of importin-alpha-mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80. **J Mol Biol,** v. 412, n. 2, p. 226-34, Sep 16 2011. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806995 >.

TAKEDA, A. A. et al. Biophysical characterization of the recombinant importin-alpha from Neurospora crassa. **Protein Pept Lett,** v. 20, n. 1, p. 8-16, Jan 2013. ISSN 1875-5305 (Electronic) 0929-8665 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789101 >.

TARENDEAU, F. et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. **Nat Struct Mol Biol,** v. 14, n. 3, p. 229-33, Mar 2007. ISSN 1545-9993 (Print) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310249 >.

TEJOMURTULA, J. et al. Role of importin alpha8, a new member of the importin alpha family of nuclear transport proteins, in early embryonic development in cattle. **Biol Reprod,** v. 81, n. 2, p. 333-42, Aug 2009. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420384 >.

TILBURN, J. et al. The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J,** v. 14, n. 4, p. 779-90, Feb 15 1995. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882981 >.

TZFIRA, T. et al. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. **Annu Rev Microbiol,** v. 54, p. 187-219, 2000. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018128 >.

VIRGILIO, S. et al. Molecular Components of the Neurospora crassa pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor. **PLoS One,** v. 11, n. 8, p. e0161659, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27557053 >.

WIRTHMUELLER, L. et al. Probing formation of cargo/importin-alpha transport complexes in plant cells using a pathogen effector. **Plant J,** v. 81, n. 1, p. 40-52, Jan 2015. ISSN 1365-313X (Electronic) 0960-7412 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25284001 >.

WU, W. et al. Synergy of two low-affinity NLSs determines the high avidity of influenza A virus nucleoprotein NP for human importin alpha isoforms. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 11381, Sep 12 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28900157 >.

WU, W. W.; SUN, Y. H.; PANTE, N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. **Virol J,** v. 4, p. 49, Jun 04 2007. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547769 >.

XU, W. et al. Ebola virus VP24 targets a unique NLS binding site on karyopherin alpha 5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1. **Cell Host Microbe,** v. 16, n. 2, p. 187-200, Aug 13 2014. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121748 >.

YASHIRODA, Y.; YOSHIDA, M. Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. **Curr Med Chem,** v. 10, n. 9, p. 741-8, May 2003. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678777 >.

YASUHARA, N. et al. Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-alpha. **Nat Cell Biol,** v. 9, n. 1, p. 72-9, Jan 2007. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7159997 >.

# APÊNDICE A

Durante o período de treinamento no exterior para aprendizado da técnica de ensaio de importação nuclear, foi elaborado um tutorial para auxiliar na divulgação e execução da técnica por outros estudantes que queiram trabalhar com a importação nuclear de NLSs pela Impα. O tutorial está em inglês, para que possa ser utilizado por laboratórios de diferentes países.

---

## Nuclear Import Assay Tutorial

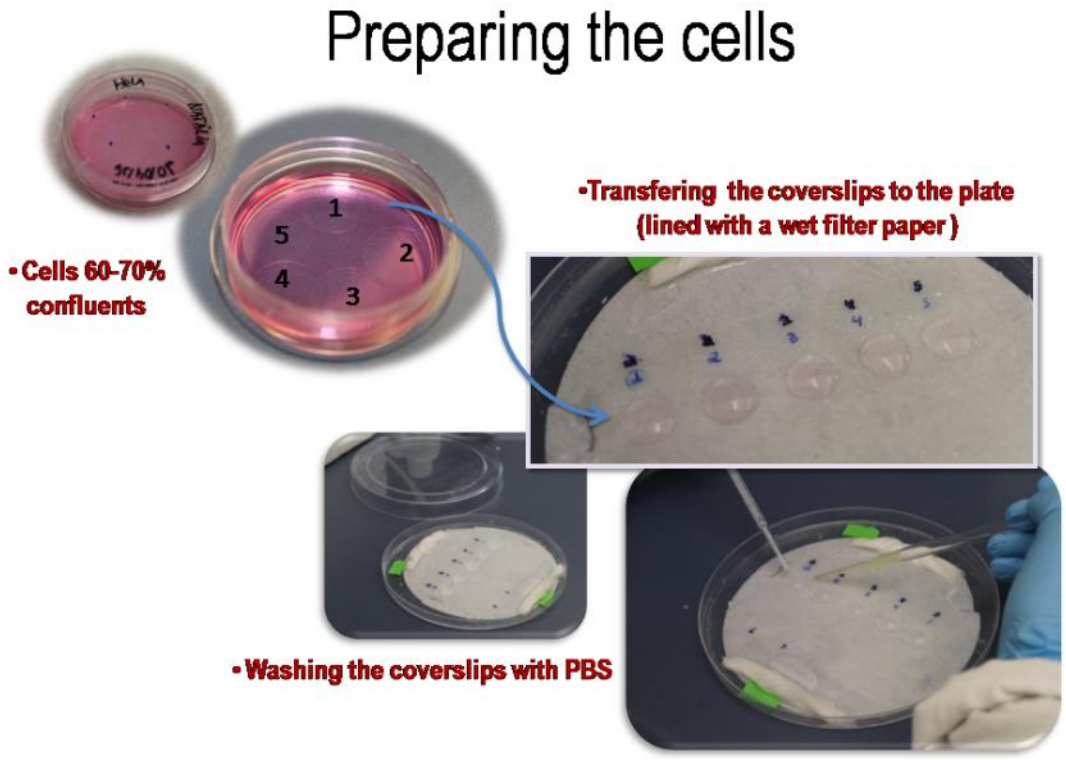



**Figure 1. Preparing the cells.** Transfer of the coverslips with HeLa cells 60-70% confluents to a plate. The plate is lined with a wet filter paper to keep the coverslips damp. The coverslips are rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) until all the media be washed out.

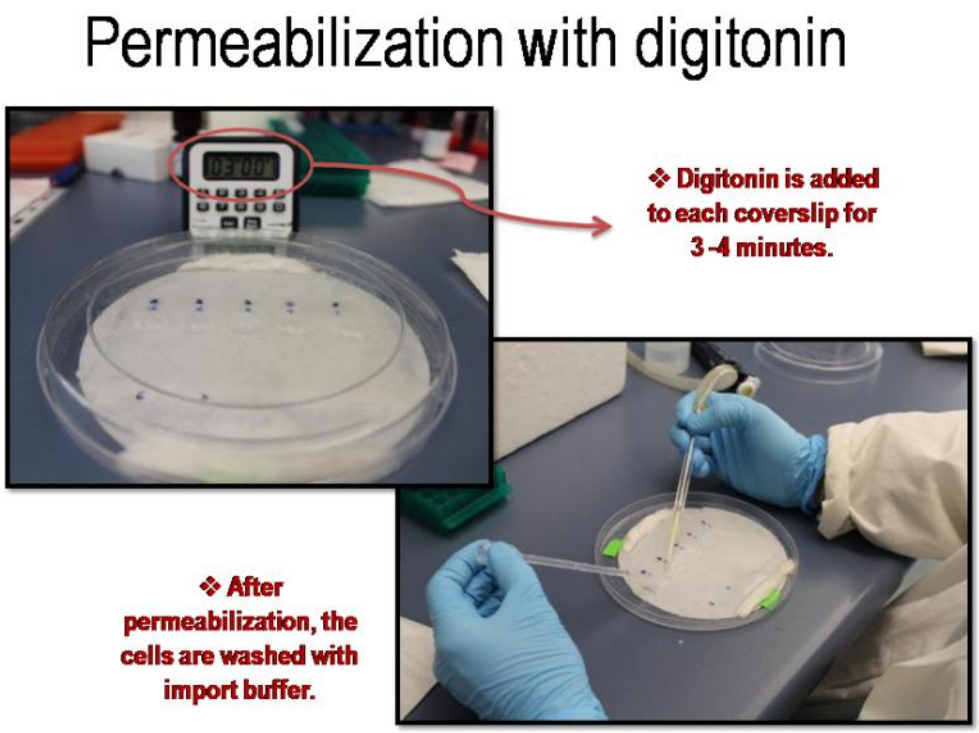



**Figure 2. Permeabilization with digitonin.** The coverslips are covered with a digitonin solution (1mM) to permeabilize the plasma membrane. After 3-4 minutes of incubation with digitonin, the coverslips are rinsed with Import buffer (IB; HEPES 20mM, potassium acetate 110mM, EGTA 1mM, sodium acetate 5mM, magnesium acetate 2mM, dithiothreitol 2mM) for three times, with 10 minutes of incubation between each washing.

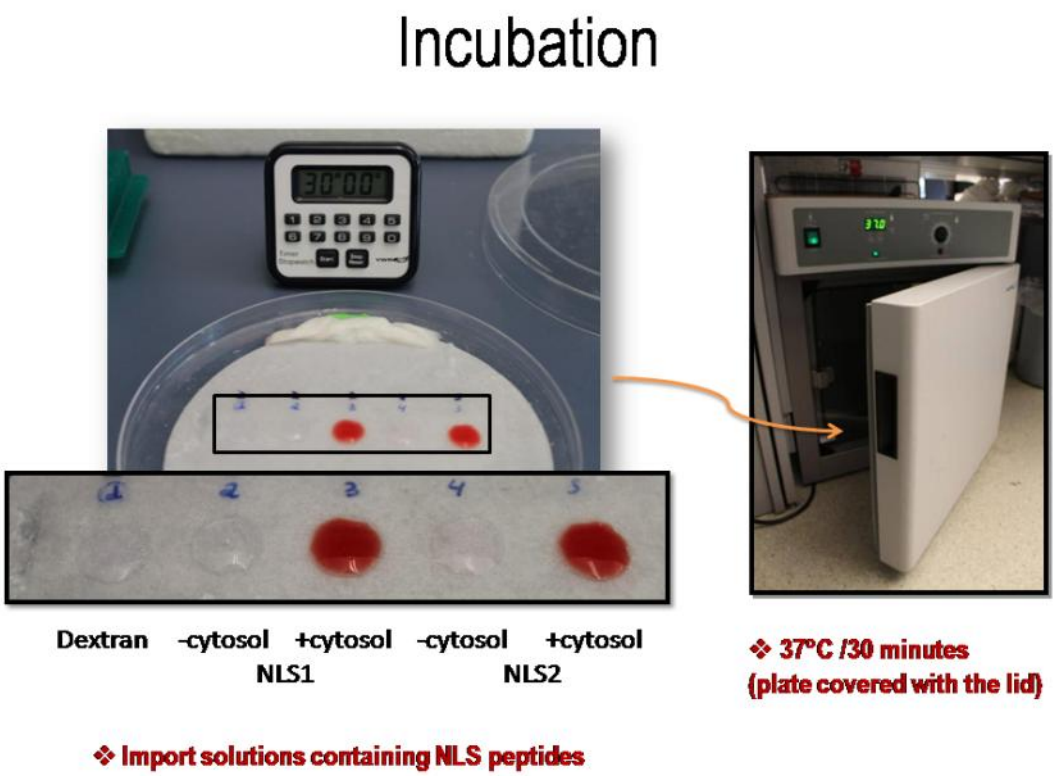



**Figure 3. Incubation.** The coverslips are covered with import solutions, each one containing different conditions and keeped in the incubator at 37°C for 30 minutes. In the picture, solution 1 represents the condition where only dextran is presented. The dextran solution is used as a control to confirm the permeabilization of the plasma membrane without damage the nuclear envelope. Solutions 2 and 4 represents conditions where the complexes NLS-BSA-Cy3 are presented but no cytosol (rabbit-reticulocite lisate, GE Helthcare) and energy solution were added. Solutions 3 and 5 represents conditions where NLS-BSA-Cy3 are added together with cytosol and energy solution.

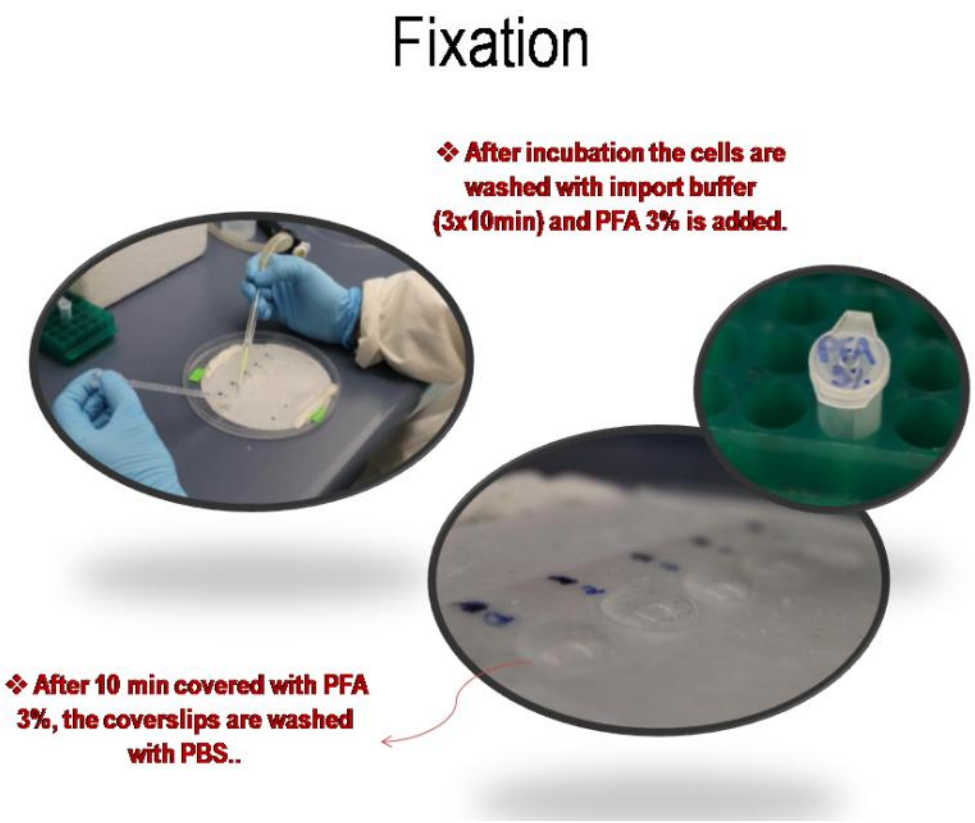



**Figure 4. Fixation.** After incubation period, the coverslips are washed with IB three times, with 10 minutes of incubation time between the washes. The cells are fixed trought the incubation of the coverslips with paraformaldehyde 3% (PFA) for 10 minutes. The plate must be kept away from the light.

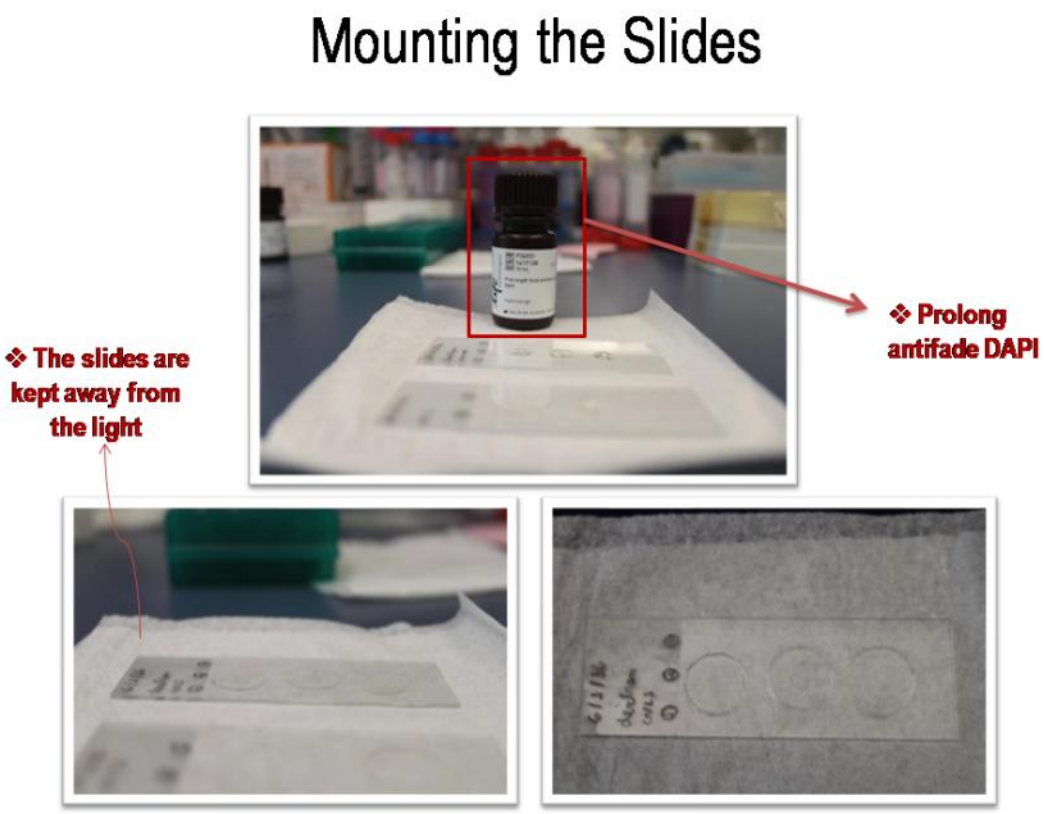



**Figure 5. Mounting the slides**. The coverslips were placed in the slides, seated with prolong antifade 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) with the side where the cells are added facing down. The slides must to be kept away from the light until be observed under fluorescence microscoype.

# APÊNDICE B

Artigo publicado no periódico *Plos One*, em 2015, onde é apresentada a primeira estrutura cristalográfica da proteína NcImpα complexada a um NLS.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

# Structure of Importin-α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal

**Natalia E. Bernardes[1☯], Agnes A. S. Takeda[1☯], Thiago R. Dreyer[1], Fernanda Z. Freitas[2], Maria Célia Bertolini[2], Marcos R. M. Fontes[1]***

**1** Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

☯ These authors contributed equally to this work.
* fontes@ibb.unesp.br

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Bernardes NE, Takeda AAS, Dreyer TR, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MRM (2015) Structure of Importin-α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. PLoS ONE 10(6): e0128687. doi:10.1371/journal.pone.0128687

**Academic Editor:** Beata G Vertessy, Institute of Enzymology of the Hungarian Academy of Science, HUNGARY

**Received:** February 19, 2015

**Accepted:** April 29, 2015

**Published:** June 19, 2015

**Copyright:** © 2015 Bernardes et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The coordinates and structure factors from the structure (impotin-alpha from N. crassa-SV40NLS) have been deposited in the protein data bank data base (www.pdb.org) under accession code 4RXH.

**Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br: MRMF, MCB, NEB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br: MRMF and MCB), and Coordenação de

## Abstract

*Neurospora crassa* is a filamentous fungus that has been extensively studied as a model organism for eukaryotic biology, providing fundamental insights into cellular processes such as cell signaling, growth and differentiation. To advance in the study of this multicellular organism, an understanding of the specific mechanisms for protein transport into the cell nucleus is essential. Importin-α (Imp-α) is the receptor for cargo proteins that contain specific nuclear localization signals (NLSs) that play a key role in the classical nuclear import pathway. Structures of Imp-α from different organisms (yeast, rice, mouse, and human) have been determined, revealing that this receptor possesses a conserved structural scaffold. However, recent studies have demonstrated that the Impα mechanism of action may vary significantly for different organisms or for different isoforms from the same organism. Therefore, structural, functional, and biophysical characterization of different Impα proteins is necessary to understand the selectivity of nuclear transport. Here, we determined the first crystal structure of an Impα from a filamentous fungus which is also the highest resolution Impα structure already solved to date (1.75 Å). In addition, we performed calorimetric analysis to determine the affinity and thermodynamic parameters of the interaction between Imp-α and the classical SV40 NLS peptide. The comparison of these data with previous studies on Impα proteins led us to demonstrate that *N. crassa* Imp-α possess specific features that are distinct from mammalian Imp-α but exhibit important similarities to rice Imp-α, particularly at the minor NLS binding site.

## Introduction

The filamentous fungus *Neurospora crassa* has been studied by classical and molecular genetics, providing several insights into cellular processes, which include cell signaling, growth and differentiation, secondary metabolism, circadian rhythm and genome defense [1]. Together

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (www.capes.br: AAST).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

with the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *N. crassa* has largely been used as a model organism to study fundamental aspects of eukaryotic biology. Nevertheless, compared to yeast, *N. crassa* has developed greater morphological and developmental complexity due its multicellular characteristics, and although *N. crassa* is not known to be a pathogen, similarities exist between the saprotrophic Neurospora and pathogenic fungi [1].

The genomic sequence of *N. crassa* exhibits an apparent lack of functional gene duplication [1], which has allowed several studies to better understand the metabolic pathways of this experimentally tractable organism. We have used *N. crassa* as a model organism to understand the regulation of basic cellular processes, such as glycogen metabolism. Many proteins and transcription factors have been identified that likely play a role in this process [2, 3]. Some of these proteins and all transcription factors possess putative nuclear localization signals (NLSs), either monopartite or bipartite, suggesting that they can be transported into the nucleus via the classical nuclear pathway [3], which is mediated by importins (importin-*α*/importin-*β*) [4, 5].

The classical NLSs (cNLSs) are the best characterized targeting signals and are typically divided into one (monopartite) or two (bipartite) clusters of basic residues [6], whose consensus sequences correspond to K[K/R]X[K/R] for monopartite cNLSs and $[K/R][K/R]X_{10_12}[K/R]_{3/5}$ for bipartite cNLSs, where $[K/R]_{3/5}$ corresponds to at least three of either lysine or arginine residues of five consecutive amino acids [6–8]. Structural studies have shown that both classes are recognized by the nuclear import receptor importin-*α* (Imp*α*) [7, 9, 10]. Imp*α* is composed of tandem armadillo (Arm) repeats that generate a curved and elongated shape. Imp*α* also contains conserved residues that form two NLS binding sites known as major (Arms 1–4) and minor (Arms 4–8) NLS binding sites [9, 10]. Monopartite NLSs primarily interact with the major binding site, whereas bipartite NLSs interact with both minor and major NLS binding sites [10–12].

The modulation of differential expression is a key feature for understanding the metabolism and growth of an organism [13, 14], and an understanding of the nuclear import mechanism of fungi may provide insights into these pathways. Although, Imp*α* structures have been elucidated, an understanding of the specificity of NLS recognition and regulation remains limited [15]. To better understand NLS recognition and gain insights into the *N. crassa* nuclear import process, we report the first crystal structure of Imp*α* from a filamentous fungus (NcImp*α*) in complex with a classical monopartite NLS (SV40 large T antigen NLS). This is also the highest resolution Imp*α* structure solved to date (1.75Å). Isothermal titration calorimetric (ITC) studies were used to determine the affinity and thermodynamic parameters of the interaction between Imp*α* and the classical SV40 NLS peptide. Both crystallographic and calorimetric analyses confirmed NcImp*α* recognition of cNLS via both major and minor binding sites. Moreover, we observed interactions in the minor binding site that are more similar to those in Imp*α* from rice (*Oryza sativa*) [16] than those in Imp*α* from yeast [9]. This study highlights the importance of the analysis of the interactions between NLSs and Imp*α* proteins from various organisms. Particularly, it may aid in the identification of specific NLSs from *N. crassa*, providing insights into the nuclear import pathway in fungi and enabling future biotechnological applications.

## Materials and Methods

### Protein expression and purification

The recombinant Imp*α* protein from *N. crassa* (NcImp*α*) was expressed as a truncated hexa-His fusion protein, consisting of residues 75–529, using the *Escherichia coli* host strain RosettaTM (DE3) pLysS (Novagen), as previously described [17]. The protein was purified using nickel affinity chromatography and eluted in a 0.15–3.0 M imidazole linear gradient, followed

by dialysis. NcImp$\alpha$ was stored under cryogenic temperatures in a buffer composed of 20 mM Tris-HCl, pH 8, and 100 mM NaCl.

## Synthesis of NLS peptides

The peptide corresponding to SV40 NLS ($^{125}$*PPKKKRKV*$^{132}$) was synthesized by Proteimax (Brazil) with a purity of higher than 99%. The peptides contained additional residues at the N- and C-termini compared with the minimally identified NLS [18].

## Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were performed using a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare) calibrated according to the manufacturer's instructions. NcImp$\alpha$ and the SV40 NLS peptide were prepared and dialyzed in buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl). The sample cell was loaded with 50 $\mu$M NcImp$\alpha$ that was titrated with the SV40 NLS peptide at a concentration of 1 mM (protein:peptide molar ratio of 1:20). Titrations were conducted at 10°C and consisted of 20 injections of 2.0 $\mu$L in an interval of 240 s with a 1000 rpm homogenization speed. The heat of dilution was determined by titration of the peptide sample into the protein sample buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl) in separate control assays and was subtracted from the corresponding titrations. The assays temperature was chosen to avoid protein aggregation displayed for higher temperatures and to permit direct comparison to previously Imp$\alpha$/SV40NLS ITC studies performed in the same condition [19]. The data were processed using MicroCal Origin Software to obtain values for stoichiometry (N), dissociation constants ($K_d$), enthalpy (ΔH), and binding-type input parameters were adjusted to obtain the best fitting model. The values of $K_d$ and ΔH were used to calculate free energy (ΔG) and entropy (ΔS) values.

## Crystallization, X-ray data collection and structure determination

NcImp$\alpha$ was concentrated to 12 mg/ml using an Amicon 30 kDa cutoff filter unit (Millipore) and stored at -20°C. Crystals of NcImp$\alpha$ in complex with SV40 NLS were obtained at a 1:8 protein:peptide molar ratio in 20 mM Bicine, pH 8.5, and 20% (w/v) polyethylene glycol 6000 at 4°C [20] using MRC2 Well Crystallization Plates and an Orix4 system (Douglas Instruments).

X-ray diffraction data were collected from a single crystal of NcImpα/SV40NLS at a wavelength of 1.0 Å using a synchrotron radiation source (X25 beamline, National Synchrotron Light Source, NSLS, Upton, NY, USA) and a PILATUS detector. A crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at -173.15°C using 20% (v/v) glycerol as the cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 270 mm with an oscillation range of 0.5°, resulting in the collection of a total of 720 images. The data were processed using the HKL2000 suite [21]. The crystal belonged to the space group $P2_12_12_1$ (Table 1) and was isomorphous to previously obtained crystals [20].

NcImpα/SV40NLS crystal structure was determined by molecular replacement using the program Phaser [22] and the coordinates of Impα from *Mus musculus* in complex with the nucleoplasmin NLS (PDB ID: 3UL1, chain B; [15]) as the search model. Rounds of manual modeling were performed using the program Coot [23] and the crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual B factors with an overall anisotropic temperature factor and bulk-solvent correction) was performed using the program phenix.refine [24], considering free R factors. Structure quality was evaluated using the program MolProbity [25], and interactions were analyzed using the program LIGPLOT [26]. Figures were generated using the program PyMOL [27]. Superposition of Impα structures was performed using LSQ algorithm [28] present in the software package CCP4 [29].

**Table 1. X-ray data-collection and refinement statistics for NcImpα/SV40NLS structure.**

| ***Values in parentheses are for the highest resolution shell.*** | |
|---|---|
| ***Diffraction data statistics*** | |
| Unit cell parameters (Å) | a = 45.1; b = 64.4; c = 185.6 |
| Space group | $P2_12_12_1$ |
| Unique reflections | 54993 (5195)[a] |
| Completeness (%) | 99.6 (95.8)[a] |
| Mosaicity | 0.40 |
| Multiplicity | 12.4 (9.3)[a] |
| $R_{merge}$† (%) | 6.8 (84.3)[a] |
| Average I/σ(I) | 37.5 (2.0)[a] |
| *Refinement statistics* | |
| Resolution (Å) | 36.98–1.75 (1.81–1.75)[a] |
| $R_{cryst}$‡ (%) | 18.3 (28.5)[a] |
| $R_{free}$§ (%) | 21.0 (30.2)[a] |
| Number of non-H atoms | |
| Protein | 3164 |
| Peptide | 113 |
| Solvent | 349 |
| Ramachandran plot †† | |
| Residues in most favored regions(%) | 99 |
| Residues in disallowed regions (%) | 0.23 |
| Mean B-factor(Å$^2$)[e] | 36.7 |

† $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl}\left(\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl}\rangle|)\right)}{\sum_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle}$, where $I_i$ (hkl) is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and hI(hkl)i is the mean intensity of this reflection. Calculated for I > -3σ (I) [21].

‡ $R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl}(||Fobs_{hkl}| - |Fcalc_{hkl}|)}{|Fobs_{hkl}|}$, where |*Fobs*| and |*Fcalc*| are the observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively.

§ $R_{free}$ is equivalent to $R_{cryst}$ but was calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process. Calculated based on the Luzzati plot with the program SFCHECK [31].

† † Calculated with the program PROCHECK [31].

[a]Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t001

## PDB accession code

Coordinates and structure factors from NcImpα/SV40NLS have been deposited in the PDB under accession code 4RXH.

# Results

## Structure of NcImpα in complex with SV40NLS

NcImpα was expressed as an N-terminal truncation lacking residues 1–74 (which corresponds to the IBB domain; [30]) that are responsible for autoinhibition. Furthermore, crystallization was performed in the presence of an NLS ligand to stabilize the truncated protein, as previously reported [17, 20], and to investigate the protein-NLS binding features.

X-ray diffraction data collection and refinement statistics of the NcImpα/SV40 NLS complex are summarized in Table 1. The crystals are not isomorphous to other Impα/SV40

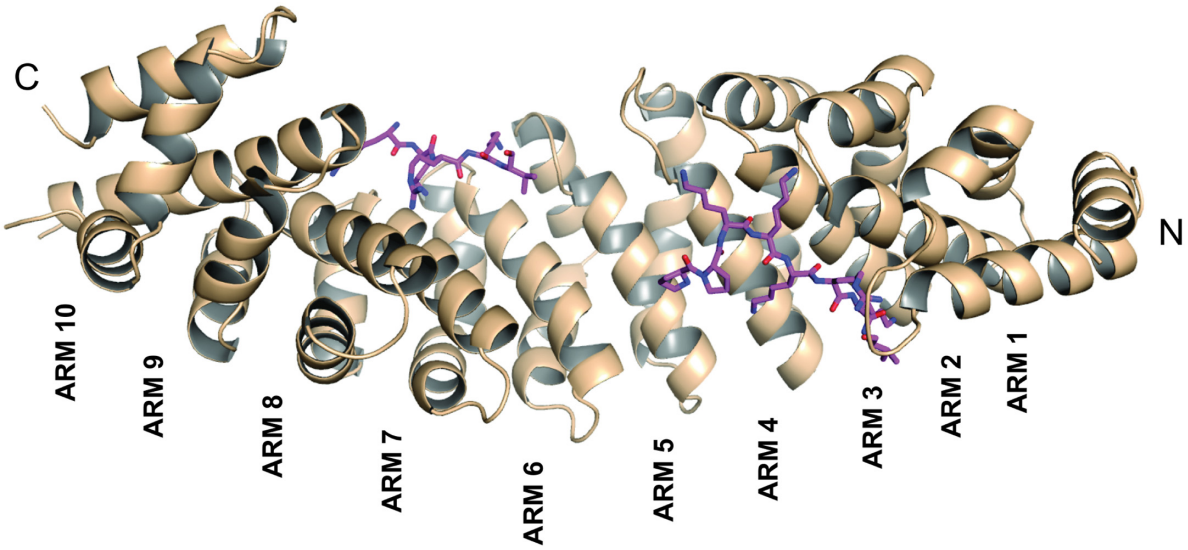



**Fig 1. Overall structure of the NcImpα in complex with the SV40 NLS peptide.** NcImpα structure represented in cartoon exhibits an elongated and curved shape composed of ten tandem Arm repeats. The SV40NLS peptides, represented in magenta sticks, are bound to the major (Arms 1–4) and minor (Arms 4–8) binding sites of NcImpα.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g001

complexes [10] and diffracted to high resolution (1.75Å), which is the highest resolution obtained for an Impα to date.

The final model of the NcImpα/SV40NLS complex consists of 428 residues of NcImpα (79–507), the peptide ligands bound to the major (seven residues) and minor (four residues) sites, and 349 water molecules (Table 1). The structure exhibits an elongated and curved shape composed of ten tandem Arm repeats, each containing three α-helices (H1, H2 and H3;), as observed in other Impα structures [9, 10, 16, 30, 32] (Fig 1). The loop containing residues 461–465 could not be modeled due an absence of electron density. The concave surface of the protein maintains the conserved array of Trp and Asn residues and negatively charged residues that interact with positively charged residues from the NLS ligands.

Superposition of the Cα atoms of NcImpα (residues 83–505) with other importin-α structures results in a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 1.78 Å for Impα from *M. musculus* (MmImpα; 3UL1; [33]), 1.77 Å for human Impα5 (HsImpα5; 4WV6; [34]), 1.22 Å for human Impα1 (HsImpα1; 2JDQ; [35]), 1.21 Å for rice Impα (OsImpα; [36]) and 1.13 Å for yeast Impα (ScImpα; [9]).

## Binding of the SV40 NLS peptide at the NcImpα major binding site

The SV40 NLS peptide binds the major binding site of NcImpα in an extended conformation with an orientation that is antiparallel to the Arm repeats. The electron density for the peptide in the major binding site is well defined, allowing for the unambiguous modeling of the eight peptide residues ($^{125}$*PPKKKRKV*$^{132}$, Fig 2a). The SV40 NLS peptide exhibits a conserved binding mode at the major binding site, which is analogous to mouse (MmImpα; [10]), yeast (ScImpα; [9]) and rice (OsImpα; [16]) Impα proteins. The N-terminal residue (P125) also exhibits a conformation that is similar to that observed in the structures of OsImpα/SV40 NLS and MmImpα in complex with an extended SV40 NLS peptide (G110-G132, referred as

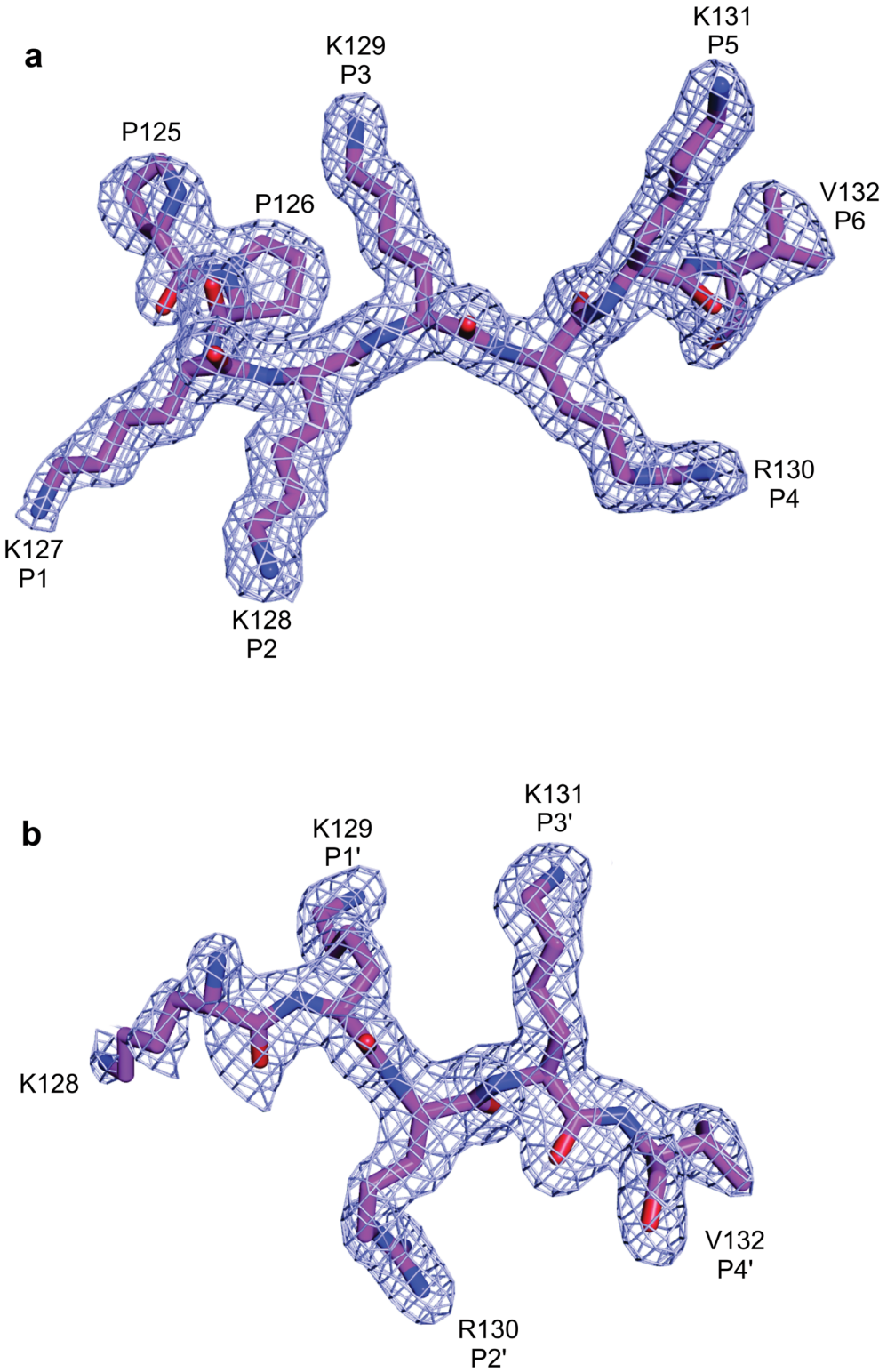



**Fig 2. Electron-density map (coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$) of the NcImpα/SV40NLS structure in the area corresponding to SV40NLS peptides (contoured at 2.0 s.d.) at major (A) and minor (B) binding sites.**

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g002

CN-SV40NLS) [37]. ScImpα/SV40 NLS and MmImpα/SV40 NLS were crystallized using truncated version of the SV40 NLS peptide (P126-V132).

The average B-factor of the peptide at the major binding site (33.2 Å$^2$) is lower than the average B-factor for the protein (37.7 Å$^2$), indicating stability for the interaction of the peptide at this site. The conserved asparagines N150, N192 and N235 of NcImpα stabilize the backbone of the SV40 NLS peptide via hydrogen bonds, whereas the residues W146, W188 and W231 form pockets for the side chains of K129 and K131 at the $P_3$ and $P_5$ positions of the SV40NLS peptide, respectively. The K127 of SV40NLS participates in hydrophobic interactions with G195 of NcImpα at the $P_1$ binding site. K128 of SV40 NLS forms hydrogen bonds with G154, A152 and T159 and a salt bridge with D196 of NcImpα, as observed for lysine residues occupying the $P_2$ position in previous structures [9, 10]. In the $P_4$ site, the side chain of R130 interacts with L109 and K111 of NcImpα via hydrogen bonds and hydrophobic interactions with P115 and S153. Finally, K131 (position $P_5$) forms hydrogen bonds with Q185 and hydrophobic interactions with F142, and V132 (position $P_6$) forms a hydrogen bond with S110 of NcImpα (Fig 3a, S1 Fig).

Interestingly, the N-terminal residue P125 of the SV40NLS peptide, that is not in the $P_1$ – $P_6$ positions, forms hydrogen bonds and hydrophobic interactions with R238 and D270 of NcImpα. P125 aids in the stabilization of interactions between the protein and a peptide NLS at the major binding site, as observed previously for MmImpα/CN-SV40NLS and OsImpα/SV40NLS structures [16, 37].

## Binding of the SV40 NLS peptide at the NcImpα minor binding site

The electron density for the SV40 NLS peptide at the minor binding site is also well defined and allows the unambiguous modeling of four residues of the peptide ($^{128}$*KRKV*$^{132}$, Fig 2b). As observed for the major binding site, asparagines residues (N319 and N361 in this case) of NcImpα define and guide the backbone of the peptide. The average B-factor for the SV40 NLS peptide bound at the minor binding site of NcImpα is higher than the average B-factor for the protein (39.3 and 37.7 Å$^2$, respectively), indicating a lower stability for the peptide at this site compared with the major site.

The interactions between the SV40NLS peptide and NcImpα in the minor site exhibit greater similarities with the interactions between this peptide and OsImpα [16](Table 2) than those with MmImpα or ScImpα [9, 10]. In the NcImpα/SV40NLS structure, K129 at the $P_1$' position forms hydrogen bonds with G323, V321 and T328 of NcImpα. R130, which occupies the $P_2$' position, is accommodated between the hydrophobic side chains of W357 and W399 and interacts with E396 via salt bridges and with S360 via hydrogen bonds, which results in the lowest B-factor value (36.2 Å$^2$) compared to the other residues of the peptide. K131 at the $P_3$' position is stabilized by helix dipoles, negatively charged residues and hydrogen bonds with N283, G281, and T322. Finally, V132 at $P_4$' interacts with D280, R315 and N319 of NcImpα via hydrophobic interactions (Fig 3b, S2 Fig).

## Affinity of the SV40 NLS peptide for NcImpα

The affinity and other thermodynamic parameters for the association of NcImpα and the SV40 NLS peptide were evaluated using ITC. A protein:peptide molar ratio of 1:20 was sufficient to yield a sigmoidal titration curve representing an exothermic process during complex formation (Fig 4). A two non-symmetrical binding site interaction model was selected based on the determined structure, which indicates the presence of two NLS binding sites in the Impα protein with different binding modes. The equilibrium dissociation constants of $K_d$ = 1.23±0.22 μM and $K_d$ = 1.69±0.46 μM (Table 3) indicated that the SV40NLS peptide may bind to both sites

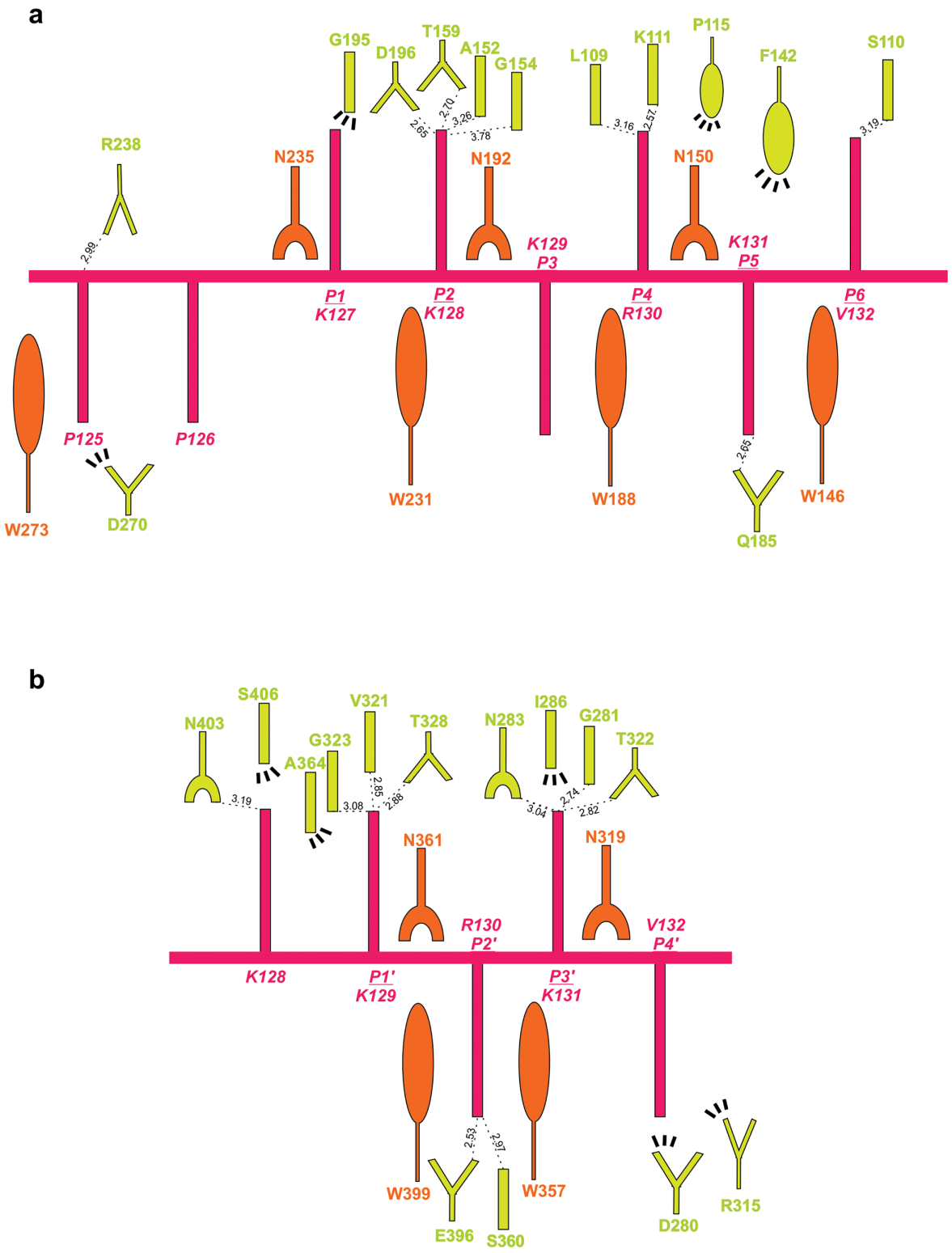



**Fig 3. Schematic diagram of the interactions between SV40NLS and NcImpα for major (A) and minor (B) binding sites.** The SV40NLS peptide main and side-chains are drawn in magenta. NcImpα residues interacting with the peptide are indicated by yellow (side-chain) and orange (main-chain). Polar contacts are shown as dashed lines and arcs with radiating spokes indicate hydrophobic contacts.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g003

**Table 2. Binding to specific pockets of Impα/NLS structures from different organisms.**

| | | | | | | | | Minor Site | | | | | | | Linker | | | | | | Major Site | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Impα/NLS* | | | | | | | | $P'_1$ | $P'_2$ | $P'_3$ | $P'_4$ | | | | | | | | | | $P_1$ | $P_2$ | $P_3$ | $P_4$ | $P_5$ | $P_6$ | |
| NcImpα/SV40 | | | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | | | | | | | | | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | |
| OsImpα/SV40 | | | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | G | G | | | | | | S | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | G |
| MmImpα/SV40 | | | | | | P | K | **K** | **K** | **R** | **K** | V | | | | | | | | | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | |
| ScImpα/SV40 | | | | | S | P | K | **K** | **K** | **R** | **K** | | | | | | | | | S | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | |
| MmImpα/CN–SV40 | | | | | | | **K** | **K** | **R** | **K** | **V** | | | | | | | ... | **A** | **P** | **P** | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | **V** | |
| MmImpα/hPLSCR4 | | | | | **G** | **S** | **I** | **I** | **R** | **K** | **W** | **N** | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MmImpα/TPX2 | | | | | | | G | **K** | **R** | **K** | **H** | G | P | S | P | V | **K** | **M** | **I** | **K** | L | | | | | | | |
| MmImpα/Nucleoplasmin | | | | | | | | **K** | **R** | **P** | **A** | **A** | **T** | K | **K** | **A** | **G** | **Q** | **G** | **A** | **K** | **K** | **K** | **K** | | | | |
| MmImpα/N1N2 | | | | C | G | R | K | **K** | **R** | **K** | **T** | **E** | **E** | **E** | **S** | **P** | **L** | **K** | **D** | **K** | **A** | **K** | **K** | **S** | **K** | G | Y |
| MmImpα/RB | | | | | | C | G | **K** | **R** | **S** | **A** | **E** | **G** | **S** | **N** | **P** | **P** | **K** | **P** | | **L** | **K** | **K** | **L** | **R** | G | Y |
| MmImpα/FEN1 | | | | | S | **S** | **A** | **K** | **R** | **K** | **E** | **P** | **E** | **P** | **K** | **G** | **S** | | **T** | | **K** | **K** | **K** | **A** | **K** | **T** | |
| MmImpα/Bimax1 | | R | R | R | R | **P** | **R** | **K** | **R** | **P** | **L** | **E** | **W** | **D** | **E** | **D** | **E** | **E** | **P** | **P** | **R** | **K** | **R** | **K** | **R** | **L** | **W** |
| MmImpα/Bimax2 | | R | R | R | **R** | **R** | **R** | **K** | **R** | **K** | **R** | **E** | **W** | **D** | **D** | **D** | **D** | **D** | **P** | **P** | **K** | **K** | **R** | **R** | **R** | **L** | **D** |
| OsImpα/A89 | V | H | K | **T** | **V** | **L** | **G** | **K** | **K** | **K** | Y | M | | | | | | | | | | | | | | | |
| OsImpα/B54 | | | | **S** | **V** | **L** | **G** | **K** | **R** | **K** | **R** | **H** | P | K | V | | | | | | | | | | | | |
| ScImpα/c–Myc | | | | | P | A | A | **K** | **R** | **V** | **K** | L | D | | | | | | **P** | **A** | **A** | **K** | **R** | **V** | **K** | **L** | **D** |
| HsImpα5/Nup50 | | **P** | **L** | **G** | **S** | **M** | **A** | **K** | **R** | **N** | **A** | **E** | **K** | **E** | **L** | **T** | **D** | ... | | | | | | | | | |

* Binding to specific binding pockets of Impα based on structural data are shown in bold. The NLSs are aligned as observed to bind to the NLS-binding sites ($P'_1$ –$P'_4$, minor binding site; $P_1$—$P_6$, major binding site, as defined in [11]). The suspension points corresponds to the extension of the NLS peptides that not bind into the linker region. NcImpα/SV40NLS; OsImpα/SV40NLS [16]; MmImpα/SV40NLS [10]; ScImpα/SV40NLS [9];MmImpα/CN-SV40NLS [37]; MmImpα/hPLSCR4 [38]; MmImpα/TPX2 [39]; MmImpα/Nucleoplasmin [10]; MmImpα/N1N2 [7]; MmImpα/RB [7]; MmImpα/FEN1 [40]; MmImpα/Bimax1 [41]; MmImpα/Bimax2 [41]; OsImpα/A89 [16]; OsImpα/B54 [16]; ScImpα/c-Myc [11]; HsImpα5/Nup50 [42].

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t002

but with higher affinity for one site. These results are consistent with previous structural and functional results that indicate the presence of the major and minor binding sites in Impα in complex with the SV40NLS peptide [9, 10] and are comparable with ITC experiments performed with MmImpα/SV40NLS complex [19]. Furthermore, the negative contribution for the enthalpy (ΔH) and positive value for the entropy (ΔS) suggest that both hydrogen bonds and hydrophobic interactions play a role in this interaction, whereas conformational changes are unfavorable. These data corroborate with the structural information obtained in the present study.

## Discussion

### Comparison of NcImpα with other Impα structures

The crystal structure of NcImpα resembles other Impα structures [9, 10, 16] but exhibits a conformation that is more concave compared with MmImpα (Fig 5a). Its superposition (residues 83–504) with other Impα proteins reveals a higher r.m.s.d. for Cα atoms for MmImpα (residues 78–496; PDB ID: 3UL1; r.m.s.d.: 1.78 Å) and HsImpα1 (residues 78–493; PDB ID: 4WV6; r.m.s.d.: 1.77 Å) (Fig 5a) compared with ScImpα (residues 89–507; PDB ID: 1BK5; r.m.s.d.: 1.13 Å), OsImpα (residues 74–493; PDB ID: 4BQK; r.m.s.d.: 1.21 Å) and HsImpα5 (residues 84–502; PDB ID: 2JDQ; r.m.s.d.: 1.22 Å) (Fig 5b). The primary sequence identities between

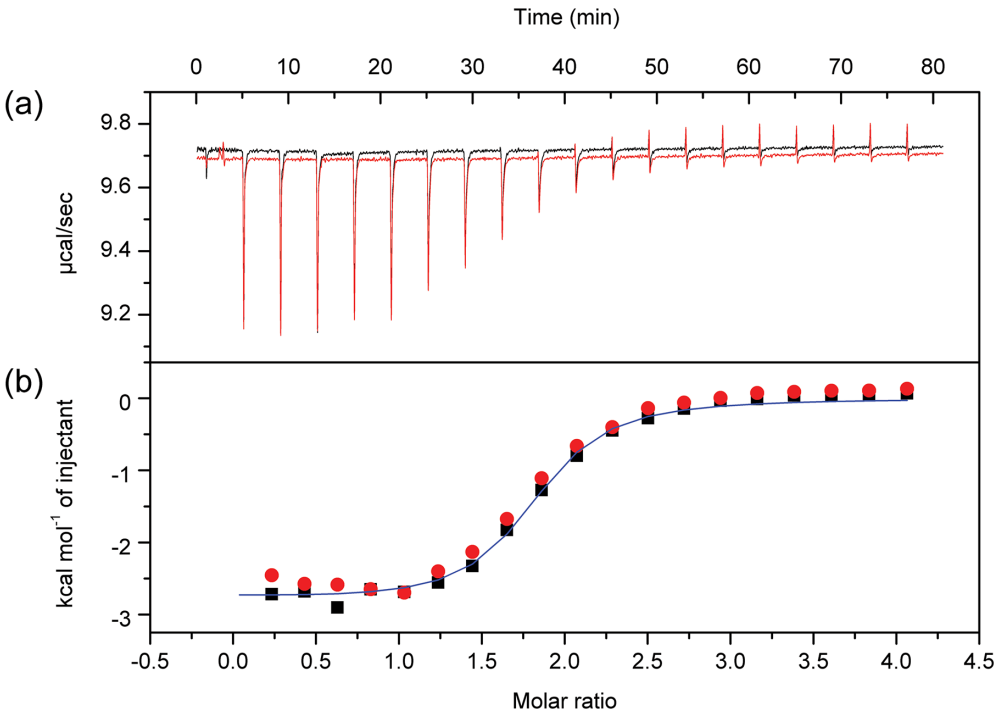



**Fig 4. Isothermal calorimetric data for SV40NLS peptide binding to NcImpα. (a)** Raw power output (μcal/s) per unit time (min) of replicate titrations **(b)** Integrated data (kcal.mol$^{-1}$ of injectant versus molar ratio of SV40NLS to NcImpα). These data were obtained from the raw power output as the area underneath each peak, which is then corrected for baseline heat injections and SV40NLS dilution heat and mixing. The solid line represents the best fit of the data.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g004

**Table 3. Isothermal titration calorimetry data for SV40NLS binding to NcImpα.**

| | Major site | Minor Site |
|---|---|---|
| N | 0.89 ± 0.02 | 0.86 ± 0.02 |
| $K_d$ (μM) | 1.23 ± 0.22 | 1.69 ± 0.46 |
| ΔH (kcal/mol) | -2.47 ± 0.06 | -3.21 ± 0.12 |
| ΔS (cal/mol/deg) | 18.3 | 15.1 |

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t003

NcImpα and other Impα proteins directly reflect the r.m.s.d. values for Cα atoms: ScImpα (64.69% identity; r.m.s.d.: 1.13 Å), OsImpα (63.16% identity; r.m.s.d.: 1.21 Å), HsImpα5 (60.22% identity; r.m.s.d.: 1.22 Å), MmImpα (46.26% identity; r.m.s.d.: 1.78 Å), HsImpα1 (45.01%; r.m.s.d.: 1.77 Å). Furthermore, ScImpα, OsImpα and HsImpα5 belong to the same phylogenetic family as NcImpα (α1 family; [43, 44]), whereas MmImpα and HsImpα1 belongs to a different family (α2 family). These sequence and structural comparisons raise an important question concerning Impα from different organisms or isoforms from the same organism. How different is the binding mode of an NLS ligand to a particular Impα?

Several studies have shown that Impα proteins from different families exhibit preferences for specific NLSs [45–48]. Thus, examining the binding mode of the SV40NLS peptide, which has been crystallized with various Impα proteins, may provide insights into the binding specificities of these proteins. Crystal structures of Impα/SV40NLS complexes have been

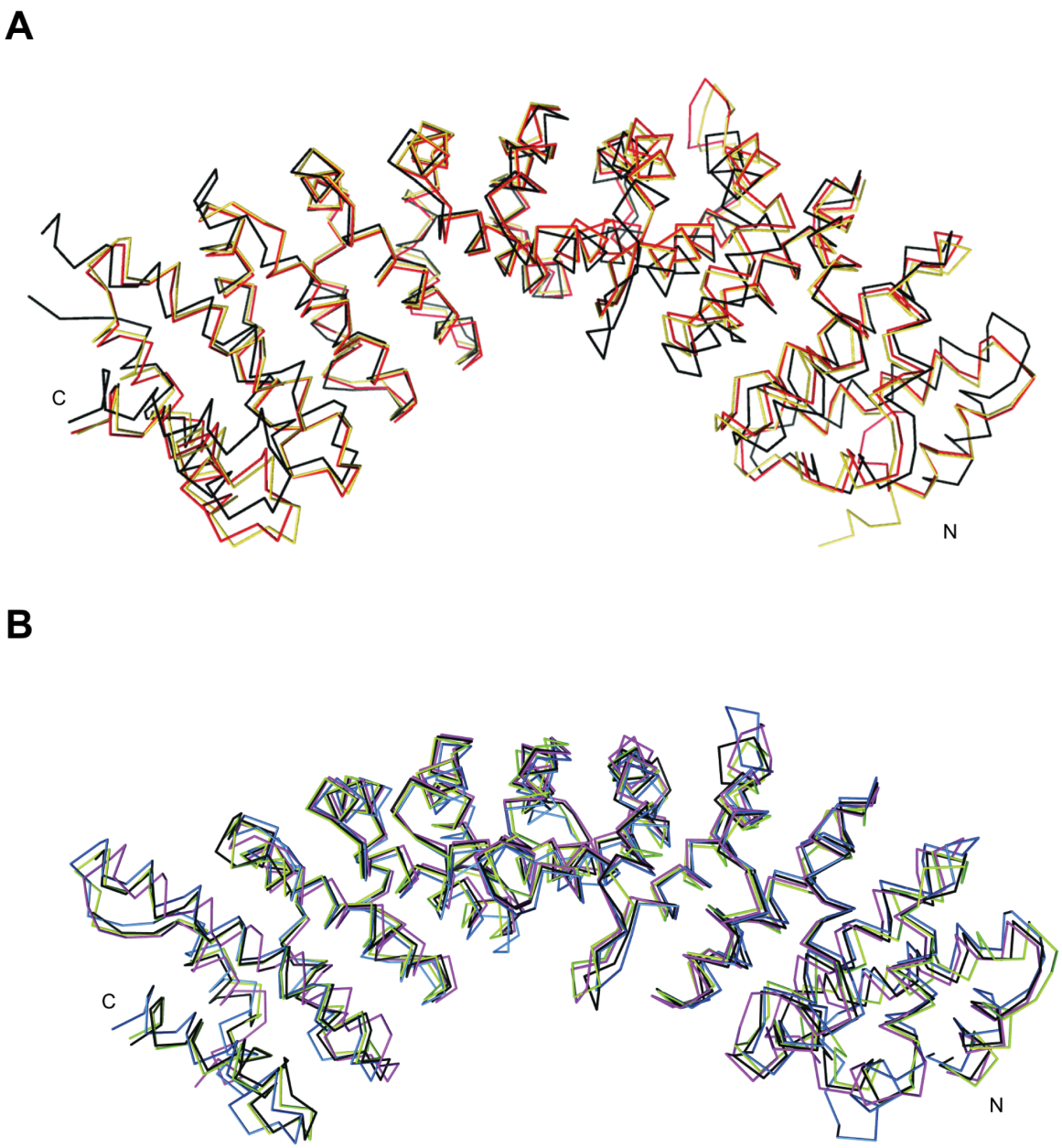



**Fig 5. Comparison among Imp*α* crystal structures from different organisms.** The Imp*α* proteins were superimposed using the C*α* atoms of each protein (residues 83 -505) **(a)** NcImp*α*, MmImp*α* (PDB ID: 3UL1) and HsImp*α*1 (PDB ID: 4WV6) are represented in black, red and orange, respectively. **(b)** NcImp*α*, OsImp*α* (PDB ID: 4BQK), ScImp*α* (PDB ID: 1BK5) and HsImp*α*5 (PDB ID: 2JDQ) are represented in black, blue, green and pink, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g005

determined for ScImp*α* [9], MmImp*α* (in complex with SV40NLS and with an extended SV40NLS peptide, referred to as CN-SV40— [10, 37]), OsImp*α* [16] and NcImp*α* (the present study). In all of these structures, the SV40NLS peptide binds strongly to the major site via several interactions, resulting in well-defined electron density and B-factor values that are similar to or lower than the average B-factor value for the protein. These results are consistent with the determined affinities for the MmImp*α*/SV40NLS [19] and NcImp*α*/SV40NLS complexes using ITC, in which both studies demonstrated the presence of two binding sites for the peptide

exhibiting with different affinities. In all of these structures, SV40NLS binding to the major site is essentially identical, in which all six positions ($P_1 - P_6$) of the peptide ($^{127}KKKRKV^{132}$, Table 2) are occupying similar regions at the protein. The main differences are related to the number of peptide residues bound before the $P_1$ position (OsImp*α* exhibits 4 residues before $P_1$, NcImp*α* exhibits 2 residues, MmImp*α* exhibits 1 residue and MmImp*α*/CN-SV40NLS exhibits 4 residues). However, these differences result from the length of the SV40NLS peptide used in these structural studies rather than differences in Imp*α* proteins from different organisms.

## The role of the minor binding site for NcImp*α* specificity

The major site was usually associated with the binding of monopartite NLSs, whereas the minor site was associated with a secondary binding site for bipartite NLSs [7, 10, 40]. Recently, studies have demonstrated that some monopartite NLSs may bind to only the minor site [16, 38], indicating the importance of this binding site for Imp*α* specificity for cargo proteins.

In contrast to the binding of SV40NLS to the major site (Fig 6a), the binding mode of the peptide at the minor binding site is different among different Imp*α* proteins. As shown in Table 2 and Fig 6b, SV40NLS binds to ScImp*α* and MmImp*α* via Lys and Arg residues at the $P_1$' and $P_2$' positions, whereas the peptide binds OsImp*α* and NcImp*α* via Lys residues at both $P_1$' and $P_2$' positions, i.e., the binding of the peptide is shifted one position in the OsImp*α* and NcImp*α* structures.

Interestingly, Lys and Arg residues at the $P_1$' and $P_2$' positions, respectively, are observed for the majority of monopartite (hPLSCR1, hPLSCR4, c-Myc, and TPX2 [11, 38, 39, 49]) and bipartite NLS complexes (nucleoplasmin, N1N2, RB and FEN1 [10, 37, 40]), and it is also the predominant binding mode for MmImp*α*/CN-SV40NLS [37]. Furthermore, the authors of MmImp*α*/SV40NLS structure [10] also observed staggering of peptide one position N-terminally which may lead to an alternative binding mode with Lys and Arg residues at the $P_1$' and $P_2$' positions. The binding of KK residues at the $P_1$' and $P_2$' positions for SV40NLS in MmImp*α* and ScImp*α* seems to be exceptions in these particular cases.

An additional interesting characteristic of SV40NLS binding to Imp*α* is the presence of additional interactions between both the N- and the C-termini of the peptide and MmImp*α* in the minor site: two positions before $P_1$' (P126, N-terminus) and in the $P_5$' position (V132). These interactions are observed in only the mammalian receptor despite all SV40NLS peptides used for crystallization with Imp*α* proteins have these same residues. Structural studies on OsImp*α* have indicated that the plant-specific NLS peptide preferentially binds at the minor site in OsImp*α* and at the major site in MmImp*α* [16]. The similarity of SV40NLS binding at the minor site between OsImp*α* and NcImp*α* raises questions concerning the importance of this NLS binding site for the import mechanism of *N. crassa*.

Chang and colleagues [16] observed the presence of non-conserved residues between OsImp*α* and MmImp*α* (S394, R427, E434, E480, and K484 for OsImp*α*) in the region near the minor site (Arm repeats 8 and 9) and toward the C-terminus may be responsible for the specificity of NLS binding for OsImp*α*. Multiple sequence alignment of Imp*α* proteins (Fig 7a) indicates that some of these residues that are present in OsImp*α* (S394, E480 and K484) are also present in NcImp*α* (S402, E493, and K497) and in other Imp*α* proteins from the *α*1 family (S408, R443 and K500 in ScImp*α* and E491 and K495 in HsImp*α*). Structural comparison between NcImp*α* and MmImp*α* (Fig 7b) shows that these three residues (S402, E493, and K497 in NcImp*α*) are substituted by T402, S483 and A487 for MmImp*α* indicating that favorable interaction of particular peptides may occur. Particularly, T402 in MmImp*α* (S402 in NcImp*α*) has been reported to lie in an identical position as S394 in the OsImp*α* structure, sterically

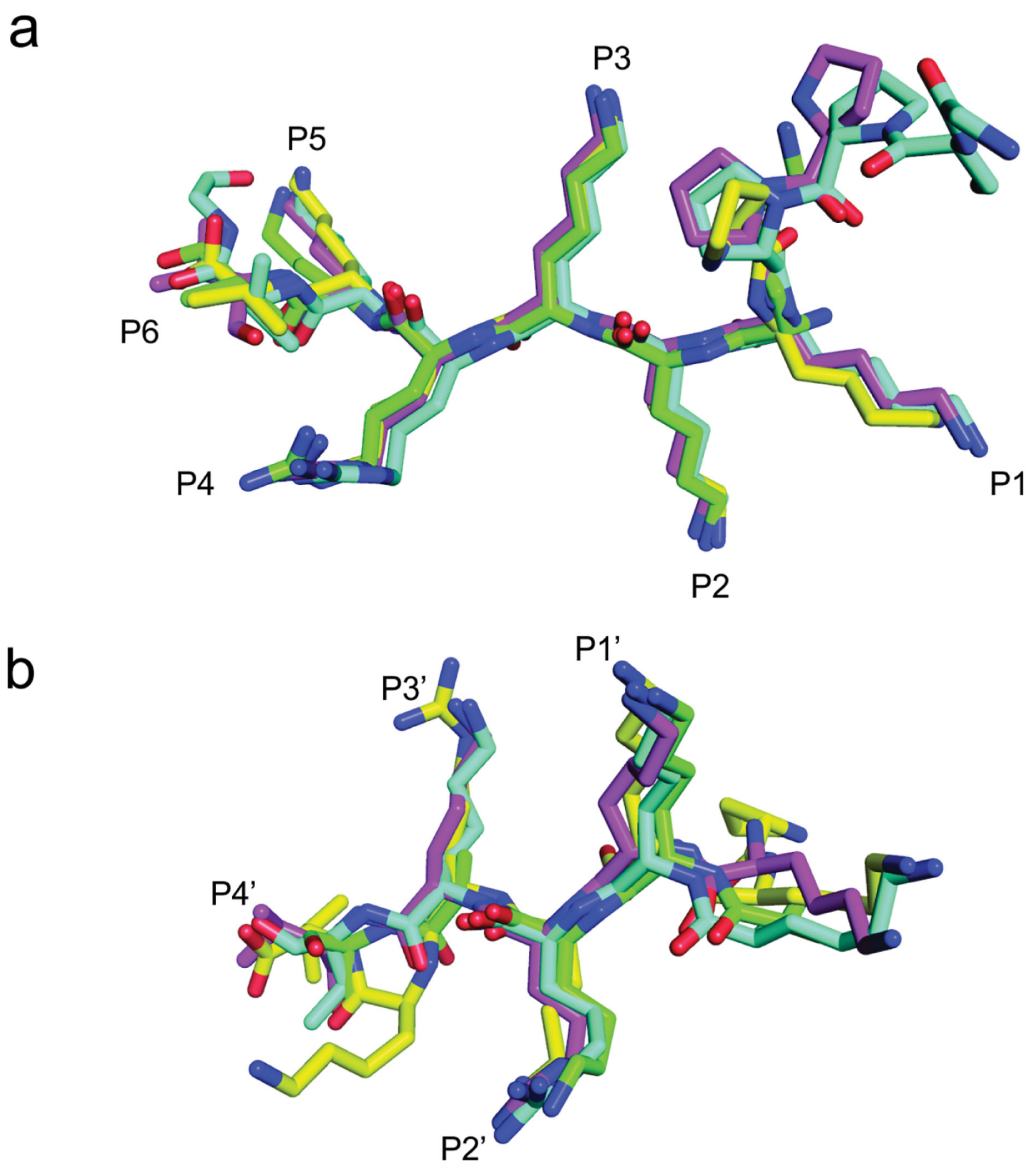



**Fig 6. Comparison of SV40NLS peptides binding to the major (a) and minor (b) binding sites for Impα structures from different organisms.** SV40NLS peptides in complex with NcImpα (magenta), ScImpα (green), OsImpα (blue) and MmImpα (yellow) were superimposed using the Cα atoms of the peptides. Positions binding corresponding to the major ($P_1$-$P_5$) and minor ($P_1'$-$P_4'$) sites are identified along the chains (binding pocket labels were based on peptide binding with NcImpα).

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g006

preventing the binding of the plant-specific NLS peptide to MmImpα [16]. However, these substitutions may also prevent the binding of K127 of SV40NLS to NcImpα and OsImpα, explaining the presence of this interaction in MmImpα, which belongs to the α2 family, and the absence of this interaction in NcImpα, which belongs to the α1 family.

The majority of monopartite (hPLSCR4, c-Myc, and TPX2 [11, 38, 39]) and bipartite NLS complexes (nucleoplasmin, N1N2, RB and FEN1 [7, 10, 40]) presented KR residues at the $P_1'$ and $P_2'$ positions which seems to be the most favorable residues to occupy these positions. The binding of KK residues atthe $P_1'$ and $P_2'$ positions for SV40NLS in MmImpα seems to be an exception which probably occurs because it is also favorable [10] to bind additional residues at

a

```
NcImpα   NIVTGDDVQTQVIINCGALPCLLSLLSS-NKDGIRKEACWTISNITAGNS 367
ScImpα   NIVTGNDLQTQVVINAGVLPALRLLLSS-PKENIKKEACWTISNITAGNT 373
OsImpα   NIVTGDDAQTQCIIDHQALPCLLSLLTQNLKKSIKKEACWTISNITAGNK 359
HsImpα5  NIVTGDDIQTQVILNCSALQSLLHLLSS-PKESIKKEACWTISNITAGNR 370
HsImpα1  NIVTGTDEQTQVVIDAGALAVFPSLLTN-PKTNIQKEATWTMSNITAGRQ 367
MmImpα   NIVTGTDEQTQKVIDAGALAVFPSLLTN-PKTNIQKEATWTMSNITAGRQ 367

NcImpα   AQIQSVIDANIIPPLIHLLSHADLKTRKEACWAISNATSGGLQKPDQIRY 417
ScImpα   EQIQAVIDANLIPPLVKLLEVAEYKTKKEACWAISNASSGGLQRPDIIRY 423
OsImpα   DQIQAVINAGIIGPLVNLLQTAEFDIKKEAAWAISNATSGGSH--DQIKY 407
HsImpα5  AQIQTVIDANIFPALISILQTAEFRTRKEAAWAITNATSGGSA--EQIKY 418
HsImpα1  DQIQQVVNHGLVPFLVSVLSKADFKTQKEAVWAVTNYTSGGTV--EQIVY 415
MmImpα   DQIQQVVNHGLVPFLVGVLSKADFKTQKEAAWAITNYTSGGTV--EQIVY 415

NcImpα   LVAQGCIKPLCDLLACPDNKIIQVALDGLENILKVGELDKNAAGDGPDSI 467
ScImpα   LVSQGCIKPLCDLLEIADNRIIEVTLDALENILKMGEADKEARG---LNI 470
OsImpα   LVSEGCIKPLCDLLICPDIRIVTVCLEGLENILKVGETDKTLAAG---DV 454
HsImpα5  LVELGCIKPLCDLLTVMDSKIVQVALNGLENILRLGEQEAKRNGT---GI 465
HsImpα1  LVHCGIIEPLMNLLTAKDTKIILVILDAISNIFQAAEK----LG----ET 457
MmImpα   LVHCGIIEPLMNLLSAKDTKIIQVILDAISNIFQAAEK----LG----ET 457

NcImpα   NRYALFIEECGGMEKIHDCQTNANEEIYMKAYNIIEKYFSDEDEAGDEAM 517
ScImpα   NENADFIEKAGGMEKIFNCQQNENDKIYEKAYKIIETYFG---------- 510
OsImpα   NVFSQMIDEAEGLEKIENLQSHDNNEIYEKAVKILEAYWMDEEDD----- 499
HsImpα5  NPYCALIEEAYGLDKIEFLQSHENQEIYQKAFDLIEHYFGTEDEDSS--- 512
HsImpα1  EKLSIMIEECGGLDKIEALQNHENESVYKASLSLIEKYFSVEEEE----- 502
MmImpα   EKLSIMIEECGGLDKIEALQRHENESVYKASLNLIEKYFSVEEEE----- 502
```

b

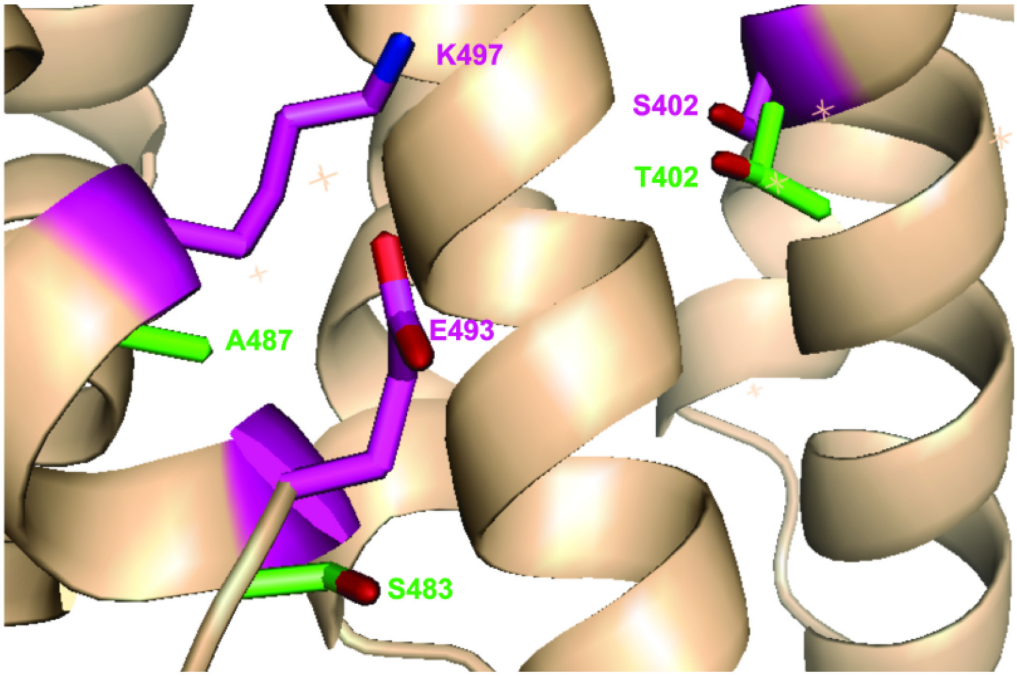



**Fig 7. Non-conserved residues between Impα proteins near to the minor NLS binding region.** (a)Partial alignment of amino acid sequences of Impα proteins from different organisms. Conserved residues are shown in black. The residues S402, K497 and E493 for NcImpα and their equivalent residues for Impα proteins are shown in red. **(b)** Superposition between Cα of NcImpα and MmImpα structures (performed as described in Fig 5) highlights the residues S402, K497 and E493 of NcImpα (magenta) and the residues T402, S483 and A487 of MmImpα (green). These particular residues may be associated to NLS binding specificity to the minor NLS binding site. E493 side-chain is shown in a hypothetical conformation in this figure because this residue presents lack of electron density in this structure due to its high flexibility.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g007

the N- and C-terminal regions of the peptide for some Imp*α* proteins. For OsImp*α*/SV40NLS and NcImp*α*/SV40NLS complexes, KR binding at the $P'_1$ and $P'_2$ positions is more favorable because fewer interactions occur with the N- and C-terminal regions of the peptide. This observation accounts for the shift in the binding of SV40NLS to OsImp*α* and NcImp*α* compared with MmImp*α*.

Affinity assays between NLS peptides and Imp*α* proteins have been performed based in indirect affinity measurements [16, 40, 49–54], using Surface Plasmon Resonance (SPR) [32], and ITC [19, 38, 55]. Indirect affinity measurements between NLSs and Imp*α* proteins reported dissociation constants in the nM range and permitted the comparison among these molecules. SPR experiments was only able to estimate the peptide-protein affinity in the $\mu$M range which was lately confirmed by ITC experiments. The comparison between ITC analysis of MmImp*α*/SV40NLS [19] and NcImp*α*/SV40NLS is consistent with the features of the minor binding site observed in the structure. The higher affinity of the peptide at the minor binding site for MmImp*α* ($K_d$ = 0.98±0.08 $\mu$M) compared with NcImp*α* ($K_d$ = 1.69±0.46 $\mu$M) may be associated with the presence of additional interactions at N- and C-termini in the MmImp*α*/SV40NLS complex. The crystal structure of this complex [10] has revealed that the residues K131 and V132 of the SV40 NLS peptide form salt bridges with the conserved E354 and R315 of MmImp*α*, respectively. Additionally, a hydrogen bond between V132 and R135 aids in the stabilization of the backbone of the SV40 NLS C-terminus. The importance of additional interactions N- and C-termini has been also observed with ITC assays for a phosphorylated NLS peptide which enhanced by 10-fold its affinity to MmImp*α* compared to unphosphorylated version [54]. Furthermore, it has been observed that the full length nucleoplasmin protein binds to Imp*α*/Imp*β* complex with a 2-fold increase in affinity compared to just nucleoplamin NLS peptide [53]. Interesting, ITC studies with the hPLSCR4 NLS peptide ($^{273}$*GSIIRKWN*$^{280}$) which binds only the minor site of MmImp*α* [38] showed lower affinity ($K_d$ = 48.7±6.5 $\mu$M) compared with that of the SV40NLS peptide. This fact may be mainly attributed to the absence of a positively charged residue in the hPLSCR4 peptide at the $P_1$' position.

In conclusion, despite the structural similarities among Imp*α* proteins, this study and other recent studies with this receptor from different organisms or different isoforms from the same organism clearly demonstrated differences in the binding specificities for cargo proteins. The differences between NcImp*α* and MmImp*α* may result from the phylogenetic distance among the proteins and the functions of each protein family in organism development, which results in differences in affinities for NLSs. The elucidation of NcImp*α* in complex with specific NLSs peptides from fungi may provide an explanation for the differences between these proteins.

## Supporting Information

**S1 Fig. Schematic diagram of the interactions between the SV40NLS peptide (purple) and NcImp*α* (orange) at the major binding site.** Polar contacts are shown with dashed lines, and hydrophobic contacts are indicated bay arcs with radiating spokes. Carbon, nitrogen and oxygen atoms are shown in black, blue and red, respectively. Generated with the program LIGPLOT [26].
(EPS)

**S2 Fig. Schematic diagram of the interactions between the SV40NLS peptide (purple) and NcImp*α* (orange) at the minor binding site.** Polar contacts are shown with dashed lines, and hydrophobic contacts are indicated bay arcs with radiating spokes. Carbon, nitrogen and oxygen atoms are shown in black, blue and red, respectively. Generated with the program LIGPLOT [26].
(EPS)

## Acknowledgments

This work was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and PNPD/ CAPES providing research grants and fellowships.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRMF AAST MCB. Performed the experiments: NEB TRD FZF AAST. Analyzed the data: MRMF AAST MCB NEB TRD FZF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRMF MCB. Wrote the paper: MRMF AAST MCB NEB TRD FZF.

## References

1. Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, et al. The genome sequence of the filamentous fungus Neurospora crassa. Nature. 2003 Apr; 422(6934):859–868. PMID: 12712197
2. Freitas FZ, Chapeaurouge A, Perales J, Bertolini MC. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the gsn glycogen synthase gene promoter in Neurospora crassa. Proteomics. 2008 May; 8 (10):2052–2061. doi: 10.1002/pmic.200700921 PMID: 18425733
3. Gonçalves RD, Cupertino FB, Freitas FZ, Luchessi AD, Bertolini MC. A genome-wide screen for Neurospora crassa transcription factors regulating glycogen metabolism. Mol Cell Proteomics. 2011 Nov; 10(11):M111.007963. doi: 10.1074/mcp.M111.007963 PMID: 21768394
4. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Mar; 8(3):195–208. doi: 10.1038/nrm2114 PMID: 17287812
5. Chook YM, Blobel G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. Nature. 1999 May; 399(6733):230–237. doi: 10.1038/20375 PMID: 10353245
6. Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences-a consensus? Trends Biochem Sci. 1991 Dec; 16(12):478–481. doi: 10.1016/0968-0004(91)90184-W
7. Fontes MRM, Teh T, Jans D, Brinkworth RI, Kobe B. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. J Biol Chem. 2003 Jul; 278(30):27981–27987. doi: 10.1074/jbc.M303275200 PMID: 12695505
8. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. J Biol Chem. 2009 Jan; 284(1):478–485. doi: 10.1074/jbc.M807017200 PMID: 19001369
9. Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. Cell. 1998 Jul; 94(2):193–204. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81419-1 PMID: 9695948
10. Fontes MR, Teh T, Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. J Mol Biol. 2000 Apr; 297(5):1183–1194. doi: 10.1006/jmbi.2000.3642 PMID: 10764582
11. Conti E, Kuriyan J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. Structure. 2000 Mar; 8(3):329–338. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00107-6 PMID: 10745017
12. Rexach M, Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. Cell. 1995 Dec; 83(5):683–692. doi: 10.1016/0092-8674(95)90181-7 PMID: 8521485
13. Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo-Bazán L, Calvo AM. Aspergillus nidulans VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. Mol Microbiol. 2007 Jan; 63(1):242–255. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x PMID: 17163983
14. Cupertino FB, Freitas FZ, de Paula RM, Bertolini MC. Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in Neurospora crassa. New insights into the pH signaling pathway. PLoS One. 2012; 7(8):e44258. doi: 10.1371/journal.pone.0044258 PMID: 22952943
15. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NFW, Curmi PM, et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. Biochim Biophys Acta. 2011 Sep; 1813 (9):1562–1577. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.013 PMID: 20977914

16. Chang CW, Couñago RLM, Williams SJ, Bodén M, Kobe B. Crystal structure of rice importin-α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. Plant Cell. 2012 Dec; 24 (12):5074–5088. doi: 10.1105/tpc.112.104422 PMID: 23250448

17. Takeda AAS, Freitas FZ, Magro AJ, Bernardes NE, Fernandes CAH, Gonçalves RD, et al. Biophysical characterization of the recombinant importin-α from Neurospora crassa. Protein Pept Lett. 2013 Jan; 20(1):8–16. doi: 10.2174/09298665130103 PMID: 22789101

18. Knudsen NØ, Andersen SD, Lützen A, Nielsen FC, Rasmussen LJ. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. DNA Repair (Amst). 2009 Jun; 8(6):682–689. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.03.005

19. Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. J Cell Sci. 2008 Apr; 121(Pt 7):957–968.

20. Bernardes NE, Takeda AAS, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MRM. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin-α from Neurospora crassa. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2014 Apr; 70(Pt 4):501–504. doi: 10.1107/S2053230X14005068 PMID: 24699749

21. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Charles W Carter J, editor. Macromolecular Crystallography Part A. vol. 276 of Methods in Enzymology. Academic Press; 1997. p. 307–326.

22. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Storoni LC, Read RJ. Likelihood-enhanced fast translation functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2005 Apr; 61(Pt 4):458–464. doi: 10.1107/S0907444905001617 PMID: 15805601

23. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 Dec; 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132. doi: 10.1107/S0907444904019158 PMID: 15572765

24. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Feb; 66(Pt 2):213–221. doi: 10.1107/S0907444909052925 PMID: 20124702

25. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Jan; 66(Pt 1):12–21. doi: 10.1107/S0907444909042073 PMID: 20057044

26. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein Eng. 1995 Feb; 8(2):127–134. doi: 10.1093/protein/8.2.127 PMID: 7630882

27. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System; 2002. Available from: http://www.pymol.org.

28. Kabsch W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. Acta Crystallographica Section A. 1976 Sep; 32(5):922–923. doi: 10.1107/S0567739476001873

29. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011 Apr; 67(Pt 4):235–242. doi: 10.1107/S0907444910045749 PMID: 21460441

30. Kobe B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. Nat Struct Biol. 1999 Apr; 6(4):388–397. doi: 10.1038/7625 PMID: 10201409

31. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography. 1993 Apr; 26(2):283–291. doi: 10.1107/S0021889892009944

32. Catimel B, Teh T, Fontes MR, Jennings IG, Jans DA, Howlett GJ, et al. Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import. J Biol Chem. 2001 Sep; 276(36):34189–34198. doi: 10.1074/jbc.M103531200 PMID: 11448961

33. Marfori M, Lonhienne TG, Forwood JK, Kobe B. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin-α. Traffic. 2012 Apr; 13(4):532–548. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x PMID: 22248489

34. Trowitzsch S, Viola C, Scheer E, Conic S, Chavant V, Fournier M, et al. Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed submodules. Nat Commun. 2015; 6:6011. doi: 10.1038/ncomms7011 PMID: 25586196

35. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. Nat Struct Mol Biol. 2007 Mar; 14(3):229–233. doi: 10.1038/nsmb1212 PMID: 17310249

36. Chang CW, Williams SJ, Couñago RM, Kobe B. Structural basis of interaction of bipartite nuclear localization signal from Agrobacterium VirD2 with rice importin-α. Mol Plant. 2014 Jun; 7(6):1061–1064. doi: 10.1093/mp/ssu014 PMID: 24503158

37. Fontes MRM, Teh T, Toth G, John A, Pavo I, Jans DA, 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. 2003 Oct; 375(Pt 2):339–349. doi: 10.1042/BJ20030510 PMID: 12852786

38. Lott K, Bhardwaj A, Sims PJ, Cingolani G. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin alpha1. J Biol Chem. 2011 Aug; 286(32):28160–28169. doi: 10.1074/jbc.M111.228007 PMID: 21690087

39. 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. 2010 Jun; 285(23):17628–17635. doi: 10.1074/jbc.M110.102343 PMID: 20335181

40. de Barros AC, Takeda AAS, Chang CW, Kobe B, Fontes MRM. Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2012 Jul; 68(Pt 7):743–750. doi: 10.1107/S0907444912010281 PMID: 22751659

41. Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, Yanagawa H. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. Chem Biol. 2008 Sep; 15(9):940–949. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.07.019 PMID: 18804031

42. Pumroy RA, Nardozzi JD, Hart DJ, Root MJ, Cingolani G. Nucleoporin Nup50 stabilizes closed conformation of armadillo repeat 10 in importin α5. J Biol Chem. 2012 Jan; 287(3):2022–2031. doi: 10.1074/jbc.M111.315838 PMID: 22130666

43. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. Trends Cell Biol. 2004 Sep; 14(9):505–514. doi: 10.1016/j.tcb.2004.07.016 PMID: 15350979

44. Köhler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. FEBS Lett. 1997 Nov; 417(1):104–108. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01265-9 PMID: 9395085

45. Köhler M, Haller H, Hartmann E. Nuclear Protein Transport Pathways. Nephron Experimental Nephrology. 1999; 7:290–294. doi: 10.1159/000020616

46. Sekimoto T, Imamoto N, Nakajima K, Hirano T, Yoneda Y. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. EMBO J. 1997 Dec; 16(23):7067–7077. doi: 10.1093/emboj/16.23.7067 PMID: 9384585

47. Fang X, Chen T, Tran K, Parker CS. Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin-alpha3. Development. 2001 Sep; 128(17):3349–3358. PMID: 11546751

48. Mason DA, Fleming RJ, Goldfarb DS. Drosophila melanogaster importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. Genetics. 2002 May; 161(1):157–170. PMID: 12019231

49. Chen MH, Ben-Efraim I, Mitrousis G, Walker-Kopp N, Sims PJ, Cingolani G. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. J Biol Chem. 2005 Mar; 280(11):10599–10606. doi: 10.1074/jbc.M413194200 PMID: 15611084

50. Wirthmueller L, Roth C, Banfield MJ, Wiermer M. Hop-on hop-off: importin-α-guided tours to the nucleus in innate immune signaling. Front Plant Sci. 2013; 4:149. doi: 10.3389/fpls.2013.00149 PMID: 23734157

51. Yang SNY, Takeda AAS, Fontes MRM, Harris JM, Jans DA, Kobe B. Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin-alpha using oriented peptide library screening. J Biol Chem. 2010 Jun; 285(26):19935–19946. doi: 10.1074/jbc.M109.079574 PMID: 20406804

52. Takeda AAS, de Barros AC, Chang CW, Kobe B, Fontes MRM. Structural basis of importin-α-mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80. J Mol Biol. 2011 Sep; 412(2):226–234. doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.038 PMID: 21806995

53. Falces J, Arregi I, Konarev PV, Urbaneja MA, Svergun DI, Taneva SG, et al. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin α/β: insights into a complete import complex. Biochemistry. 2010 Nov; 49(45):9756–9769. doi: 10.1021/bi101179g PMID: 20925424

54. Róna G, Marfori M, Borsos M, Scheer I, Takács E, Tóth J, et al. Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013 Dec; 69(Pt 12):2495–2505. PMID: 24311590

55. Ge Q, Nakagawa T, Wynn RM, Chook YM, Miller BC, Uyeda K. Importin-alpha protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). J Biol Chem. 2011 Aug; 286(32):28119–28127. doi: 10.1074/jbc.M111.237016 PMID: 21665952

# APÊNDICE C

Artigo publicado no periódico *Plos One*, em 2016, onde são apresentados os resultados de ITC do complexo NcImpα/PAC3-NLS .

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

# Molecular Components of the *Neurospora crassa* pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor

**Stela Virgilio[1], Fernanda Barbosa Cupertino[1], Natália Elisa Bernardes[2], Fernanda Zanolli Freitas[1], Agnes Alessandra Sekijima Takeda[2], Marcos Roberto de Mattos Fontes[2], Maria Célia Bertolini[1]***

**1** Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14.800-060, Araraquara, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil

* mcbertol@iq.unesp.br

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Virgilio S, Cupertino FB, Bernardes NE, Freitas FZ, Takeda AAS, Fontes MRdM, et al. (2016) Molecular Components of the *Neurospora crassa* pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor. PLoS ONE 11(8): e0161659. doi:10.1371/journal.pone.0161659

**Editor:** Michael Freitag, Oregon State University, UNITED STATES

**Received:** March 30, 2016

**Accepted:** August 9, 2016

**Published:** August 24, 2016

**Copyright:** © 2016 Virgilio et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The work was supported by the following: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, 2013/24705-3, 2012/09435-7, www.fapesp.br; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, 444068/2014-7.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Environmental pH induces a stress response triggering a signaling pathway whose components have been identified and characterized in several fungi. *Neurospora crassa* shares all six components of the *Aspergillus nidulans* pH signaling pathway, and we investigate here their regulation during an alkaline pH stress response. We show that the *N*. *crassa pal* mutant strains, with the exception of Δ*pal-9*, which is the *A*. *nidulans palI* homolog, exhibit low conidiation and are unable to grow at alkaline pH. Moreover, they accumulate the pigment melanin, most likely via regulation of the tyrosinase gene by the pH signaling components. The PAC-3 transcription factor binds to the tyrosinase promoter and negatively regulates its gene expression. PAC-3 also binds to all *pal* gene promoters, regulating their expression at normal growth pH and/or alkaline pH, which indicates a feedback regulation of PAC-3 in the *pal* gene expression. In addition, PAC-3 binds to the *pac-3* promoter only at alkaline pH, most likely influencing the *pac-3* expression at this pH suggesting that the activation of PAC-3 in *N*. *crassa* results from proteolytic processing and gene expression regulation by the pH signaling components. In *N*. *crassa*, PAC-3 is proteolytically processed in a single cleavage step predominately at alkaline pH; however, low levels of the processed protein can be observed at normal growth pH. We also demonstrate that PAC-3 preferentially localizes in the nucleus at alkaline pH stress and that the translocation may require the *N*. *crassa* importin-α since the PAC-3 nuclear localization signal (NLS) has a strong *in vitro* affinity with importin-α. The data presented here show that the pH signaling pathway in *N*. *crassa* shares all the components with the *A*. *nidulans* and *S*. *cerevisiae* pathways; however, it exhibits some properties not previously described in either organism.

## Introduction

All organisms adapt and survive under different environmental conditions using cellular mechanisms that integrate environmental sensing and signal transduction pathways. Extracellular pH is an environmental condition to which microorganisms need to adapt, and the signal transduction pathway mediating this adaptation has been extensively characterized in model organisms, such as the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. More recently, additional contributions to the role of the pH signaling pathway have been made from studies on *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Yarrowia lipolytica* and also plant pathogens, such as *Ustilago maydis*. As a consequence, their similarities and divergences and the cellular processes influenced by this signaling pathway in different organisms have been described [1, 2]. The involvement of the pH signaling pathway and the influence of the pH response for pathogenesis and virulence in pathogenic fungi have also been described, and this was first reported in *C. albicans* [3]. Additional studies have established that this signaling pathway plays an important role in the virulence of organisms such as *A. fumigatus* [4] and *C. neoformans* [5].

The PacC/Rim101 transcription factor in *A. nidulans* [6] and in *S. cerevisiae* [7], respectively, is the major effector that mediates the pH response. Upon a neutral to alkaline pH transition, a signaling pathway is activated leading to the activation of this transcription factor by proteolysis (reviewed in [1, 8, 9]). The Pal/Rim protein components of the pH signaling pathway are conserved among different fungal species, and three components are involved in the ambient pH sensing, the PalI/Rim9, PalH/Rim21 and PalF/Rim8 proteins in *A. nidulans* and *S. cerevisiae*, respectively. In *A. nidulans*, the activation of the $PacC^{72}$ protein precursor occurs by two successive proteolytic cleavage steps [10], resulting in the active $PacC^{27}$ protein, which translocates to the nucleus to activate alkaline-regulated genes and to repress acid-regulated genes [11]. The first step is pH dependent and is activated by the products of the six *pal* genes, while the second is proteasome-mediated and pH independent [10, 12]. Alkaline pH triggers the pH signaling pathway at cortical structures in the plasma membrane by recruiting all Pal proteins and several ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) proteins, leading to the activation of PacC by proteolysis [1, 13–15] in a process that does not involve endocytosis, as has been recently demonstrated [16].

Although the major components of the pH signaling pathway are conserved among different organisms, there are differences between the PacC and Rim101 pathways, and one major difference is that the Rim101 transcription factor requires only a single proteolytic cleavage step to be activated in *S. cerevisiae* [17] and *C. albicans* [18]. Additionally, in *A. nidulans* and *S. cerevisiae*, PalF/Rim8, respectively, are post-translationally modified by ubiquitination, while *C. albicans* Rim8 is phosphorylated in response to a neutral-alkaline pH transition, and this modification correlates with Rim101 activation [19]. In *A. nidulans*, ubiquitination of PalF plays a key role in pH signaling, promoting the downstream events of the pathway [20]. More recently, new components in the pH response pathway have been described. Thus, in *A. nidulans*, the zinc binuclear DNA binding protein PacX was identified and characterized, and the authors suggested that PacX plays a role in *pacC* gene repression and in $PacC^{27}$ activity [21]. Interestingly, this protein is absent in Saccharomycotina [21]. In *C. neoformans*, the RRA1 protein, which has a predicted structure similar to PalH/Rim21, was shown to be required for Rim101 activation [22].

In *Neurospora crassa*, the influence of the pH signaling pathway in metabolism was first described by demonstrating that the PACC transcription factor affects glycogen levels, more likely by controlling the expression of the gene encoding glycogen synthase (*gsn*), the regulatory enzyme involved in glycogen synthesis [23]. The PACC pathway was reported to be

involved in glycosylation of Pi-repressible acid phosphatase [24], the transcription of the *hsp70* gene [25] and the requirement for female development [26] in *N. crassa*. Although this signaling pathway influences several cellular processes in *N. crassa*, no studies have evaluated the components of this signaling pathway in the pH response. In this work, we describe the characterization of the protein components of this signaling pathway in *N. crassa*, and we demonstrate that all mutant strains, with the exception of Δ*pal-9*, overproduce melanin, most likely due to high expression of the tyrosinase gene in these mutant strains. We further describe the modulation of the expression of the *pal* genes by alkaline pH and by the PAC-3 transcription factor and demonstrate the existence of feedback regulation involving PAC-3 at alkaline pH. Finally, we show that PAC-3 migrated to the nucleus at alkaline pH and that this translocation may occur by the classical nuclear import pathway [27] through the interaction between the *N. crassa* importin-α and a specific basic region of PAC-3, which has a nuclear localization signal (NLS).

## Materials and Methods

### *Neurospora crassa* strains and culture conditions

*Neurospora crassa* FGSC#9718 (*mat a*, *mus-51*::*bar*), the wild-type background strain, and the FGSC#21931 (Δ*pal-1*, *mat a*), FGSC#15867 (Δ*pal-2*, *mat A*), FGSC#16419 (Δ*pal-3*, *mat a*), FGSC#22412 (Δ*pal-6*, *mat a*), FGSC#16099 (Δ*pal-8*, *mat a*) and FGSC#13378 (Δ*pal-9*, *mat a*) mutant strains were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, University of Missouri, Kansas City, MO, USA, http://www.fgsc.net) [28]. The Δ*pac-3* strain was generated as described in Cupertino et al. [23]. Details for all mutant strains can be found in S1 Table. The gene knockout in all mutant strains was confirmed by PCR using specific oligonucleotides (S2 Table, real-time PCR primers) by comparing to the amplification of genomic DNA from the wild-type strain. The strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium, pH 5.8 [29] containing 2% sucrose at 30°C. Conidia from 10-day old cultures of wild-type and mutant strains were suspended in sterile water and counted. For morphology analyses, $10^7$ conidia/mL were inoculated into flasks containing solid VM medium plus 2% sucrose, pH 5.8. For radial growth analyses, $10^7$ conidia/mL were inoculated onto Petri dishes containing solid VM medium plus 2% sucrose at pH 5.8 and 7.8 for 24 h at 30°C. Images of colony morphology were captured after 24 h.

For pH stress, $10^9$ conidia/mL were first germinated in 1 L of VM medium, pH 5.8, at 30°C and 200 rpm for 24 h. After this period, the culture was filtered and the mycelia were divided into two samples. One was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further processing (control sample, not submitted to stress), while the remaining sample was transferred to 500 mL of fresh VM medium containing 0.5% sucrose at pH 7.8 (for alkaline pH stress). Sample from mycelia submitted to pH stress was harvested after 1 h incubation. The mycelial samples were used for RNA extraction and gene expression assays.

### Construction of the Δ*pac-3* complemented strain

For complementation, the strain Δ*pac-3*::*bar* [23] was crossed with the *his-3* mutant strain (FGSC#6103, *A his-3*) to generate the Δ*pac-3 his-3* double mutant strain. A DNA fragment of 2,041 bp was amplified by PCR with the primers N-mChPACC-F and N-mChPACC-R (S2 Table) using genomic DNA from the wild-type strain as a template. The N-mChPACC-F oligonucleotide contains the sequence that codifies for 6-Gly between the nucleotide sequences encoding mCherry and the PAC-3 protein. PCR was performed using a Phusion High-Fidelity PCR kit (Finzymes), and the DNA fragment was purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA fragment was

cloned into the *Spe*I and *Xba*I sites of the pTSL48-B plasmid (a donation from N. L. Glass, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA), generating the pTSL48-B-*pac-3* plasmid. The pTSL48-B plasmid allows the constitutive expression of the N-terminus mCh-PAC-3 fusion protein, as the *ccg-1* promoter drives the *pac-3* gene expression. The pTSL48-B-*pac-3* construction was used to transform competent conidia from the recipient Δ*pac-3 his-3* double mutant strain. The transformants (Δ*pac-3 his-3*::*ccg-1-mCh-pac-3*) were selected on VM media containing basta without histidine and confirmed by PCR using the primers N-mChPACC-F and N-mChPACC-R (S2 Table). The progeny were analyzed by fluorescence microscopy and by evaluating the growth on Petri dishes and tubes for the production of melanin. The complemented strain (Δ*pac-3 pac-3*$^{+}$) was evaluated by growing on solid VM medium containing 2% sucrose at pH 5.8 and 7.8 and comparing to the wild-type and *pac-3* mutant strains.

## RNA extraction and gene expression assays

For the RT-qPCR analysis, total RNA from the wild-type strain and the Δ*pac-3*, Δ*pal-1*, Δ*pal-2*, Δ*pal-3*, Δ*pal-6*, Δ*pal-8* and Δ*pal-9* mutants was prepared using mycelia samples cultured at pH 5.8 for 24 h at 30°C and mycelia grown at pH 5.8 and shifted to pH 7.8 for 1 h, according to Sokolovsky et al. [30]. Expression of the tyrosinase (NCU00776) gene and the *pal-1* (NCU05876), *pal-2* (NCU00317), *pal-3* (NCU03316), *pal-6* (NCU03021), *pal-8* (NCU00007), *pal-9* (NCU01996) and the *pac-3* (NCU00090) genes was evaluated by RT-qPCR using specific oligonucleotides (S2 Table). For this, total RNA (10 μg) samples were first treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and subjected to cDNA synthesis by using SuperScript III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen) and an oligo (dT) primer, according to manufacturer's instructions. The cDNA libraries were subjected to RT-qPCR on a StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for each gene amplicon (S2 Table). Reactions were performed under the following conditions: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min to calculate cycle threshold (Ct) values, followed by 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and then 95°C for 15 s to obtain melt curves. Data analysis was performed by the StepOne Software (Applied Biosystems) using the comparative CT (ΔΔCT) method [31]. At least three biological replicates, with three experimental replicates per sample were performed, and reactions with no template were used as a negative control. The fluorescent dye ROX™ was used as the passive reference to normalize the SYBR green reporter dye fluorescence signal. The PCR products were subjected to melting curves analysis to verify the presence of a single amplicon. All reaction efficiencies varied from 94 to 100%. We used the expression of the beta-tubulin gene as the reference gene (β-*tub-2* gene, NCU04054).

## Protein expression

Conidia ($10^{8}$/mL) from the Δ*pac-3* complemented and wild-type strains were grown in 500 mL of VM liquid medium containing 2% sucrose, pH 5.8 at 30°C and 200 rpm for 24 h. After that, the culture was filtered, and the mycelia were divided into three samples. The control sample was not subjected to pH stress and was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The remaining samples were transferred into 250 mL of fresh VM medium containing 0.5% sucrose either at pH 4.2 (for acid stress) or 7.8 (for alkaline stress). Samples were harvested after 1 h incubation at 30°C and 200 rpm and frozen at -80°C. Mycelia pads were disrupted by grinding in a mortar with liquid nitrogen, and proteins were extracted with extraction buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidine, and 1 μg/ml of each pepstatin and antipain) [32] plus 200 μL of glass beads (710–1180 μm, Sigma) and quantified by the Hartree method [33] using BSA as standard. The

amounts of 50 and 70 μg of total protein were separated by 10% SDS-PAGE gels [34] and electro-transferred to nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare). Immunoblotting was performed with a polyclonal anti-mCherry antibody (BioVision). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent.

## Chromatin immunoprecipitation-PCR assays

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described by Tamaru et al. [35], with modifications. Briefly, conidia from the Δ*pac-3* complemented strain were grown in 250 mL of VM liquid medium containing 2% sucrose pH 5.8 at 30°C and 200 rpm for 24 h. After that, mycelium from half of the culture was collected by filtration and transferred into 125 mL of fresh VM medium containing 0.5% sucrose pH 7.8 and incubated at 30°C and 200 rpm for 1 h. The remaining sample (control, not subjected to pH stress) and the sample subjected to pH stress were fixed by adding formaldehyde (Sigma) to final concentration of 1%, followed by incubation for 30 min at 30°C and 200 rpm. Formaldehyde was quenched using 125 mM glycine at 30°C and 200 rpm during 10 min. Both samples were subsequently harvested by filtration and suspended in ChIP lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.9, 90 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidine, and 1 μg/ml of each pepstatin and antipain). The chromatin was sheared to an average size of 0.3–0.8 kb using Vibra Cell Sonics ultrasonic processor (10 cycles: 1 min, 40% amplitude, 8.0 s pulse ON, 9.9 s pulse OFF on ice). Extracts were clarified by centrifugation, and the sonicated chromatin was pre-cleared with Dynabeads Protein A (Novex) pre-blocked with 0.5% BSA in PBS 1x and then immunoprecipitated with the anti-mCherry polyclonal antibody (BioVision) and Dynabeads Protein A. The DNA was quantified using NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare), and 25 ng of input DNA (I), no Ab (N, reaction without antibody) and IP (immunoprecipitated DNAs with anti-mCherry antibody) samples were amplified by PCR using primers specific for each promoter (S2 Table). Input DNA was used as a positive control of the experiment, and no Ab was used as a negative control.

PCR was performed using a Phusion High-Fidelity PCR kit (Finzymes) and specific oligonucleotides (S2 Table) for the tyrosinase (tyrp-F/tyrp-R), *pal-1* (pal1p-F/pal1p-R), *pal-2* (pal2p-F/pal2p-R), *pal-3* (pal3p-F/pal3p-R), *pal-6* (pal6p-F/pal6p-R), *pal-8* (pal8p-F/pal8p-R), *pal-9* (pal9p-F/pal9p-R) and *pac-3* (pac3p-F/pac3p-R) promoters. An ubiquitin gene fragment (NCU05995) amplified by the primers qUbi-F/qUbi-R was used as a negative control for binding. The ubiquitin fragment does not have the PAC-3 motif. Reactions were performed under the following conditions: 98°C for 10 s, 25 cycles of 98°C for 1 s, 60°C for 5 s and 72°C for 30 s, and then 72°C for 5 min. The reaction products were analyzed on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide. Densitometry was performed using ImageJ software [36], and the IP signals were compared to the negative control (no Ab).

## Subcellular localization

To determine the subcellular localization of the fluorescent mCh-PAC-3 protein at different pH conditions, 40 μL of a 3 x $10^8$ conidia/mL suspension from the Δ*pac-3* complemented strain was inoculated onto coverslips, covered with VM liquid plus 1% sucrose, pH 5.8 and incubated at 30°C for 12 h. After this period, the coverslips were transferred to fresh VM media containing 1% sucrose, pH 7.8 at 30°C and incubated for 30 min and 1 h. For nuclei analysis, mycelia were fixed [1% phosphate buffered saline (PBS), 3.7% formaldehyde, 5% DMSO], washed twice with PBS and stained with 100 μl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.5 mg/mL) for 5 min. DAPI fluorescence was visualized using a fluorescence microscope with excitation and

emission wavelengths of 358 nm and 463 nm, respectively, and mCherry fluorescence was visualized using excitation and emission wavelengths of 563 nm and 581 nm, respectively. The images were captured using an AXIO Imager.A2 Zeiss microscope, at a magnification of 100 X, coupled to an AxioCam MRm camera and processed using the AxioVision software, version 4.8.2. Further processing was performed using Corel® PHOTO-PAINT™ X7.

### Expression and purification of importin-α and synthesis of PAC-3 NLS

The gene (NCU01249) encoding importin-α was cloned into the pET28a expression vector, and the recombinant protein was expressed as a truncated protein consisting of residues 75–529 fused to a 6-His tag at N-terminus, as previously described [37]. The protein was expressed in the *Escherichia coli* host strain RosettaTM (DE3) pLysS (Novagen) and purified by affinity chromatography [37]. The protein was eluted with a 0.15–3.0 M imidazole linear gradient, followed by dialysis in buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 100 mM NaCl) and stored at cryogenic temperatures. The PAC-3 NLS peptide (281FDARKRQFDDLNDFFGSVKRRQIN304) used in the experiments was synthesized with purity higher than 95% (GenOne). The peptide contained additional residues at the N- and C-termini compared with the minimally identified NLS to avoid artifactual binding at the termini [38].

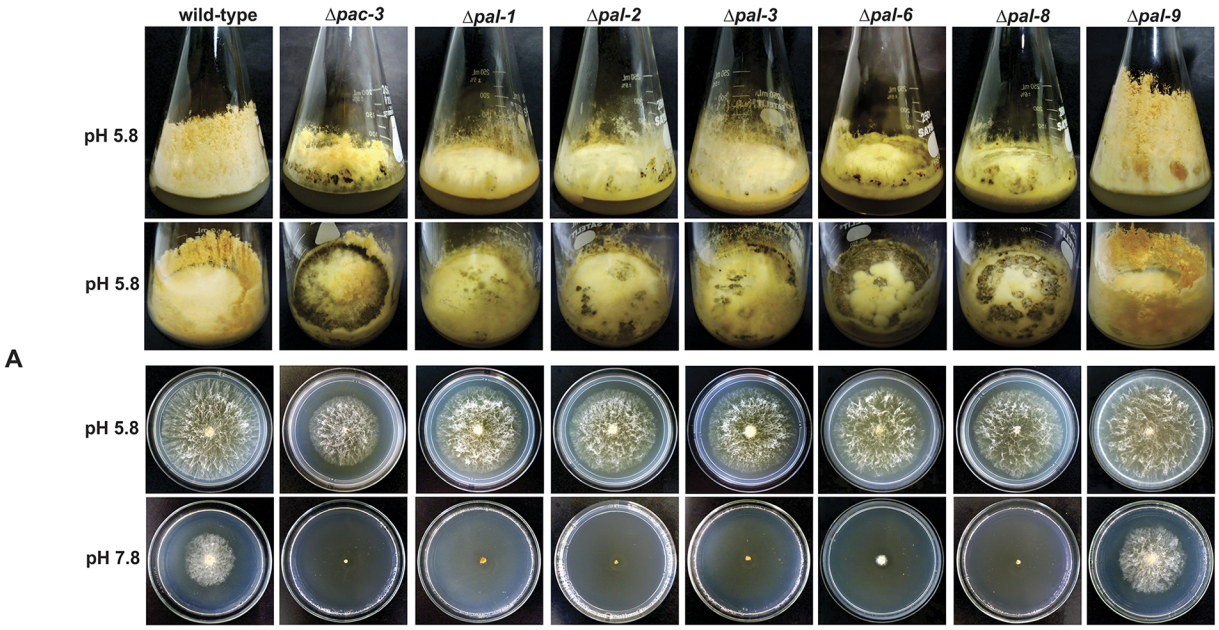
### Isothermal titration calorimetry (ITC)

ITC experiments were carried out to verify the binding affinity of importin-α to the putative NLS peptide of PAC-3 (PAC-3 NLS). The experiments were performed with a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare). The protein and the PAC-3 NLS peptide were diluted in buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 100 mM NaCl) at a concentration of 50 μM and 500 μM for protein and peptide (protein:peptide molar ratio of 1:10), respectively. The protein sample was added to the cell, and the peptide was titrated into the cell with a syringe. Titrations were conducted at 20°C and consisted of 20 injections of 2.0 μL in an interval of 240 s with an 800 rpm homogenization speed. The heat of the dilution was determined in a control assay by titration of the peptide sample into the protein sample buffer and was subtracted from the corresponding titrations. The data were processed using MicroCal Origin Software to obtain values for stoichiometry (N), dissociation constants ($K_d$), and enthalpy (ΔH). The binding-type input parameters were adjusted to obtain the best fitting model. The values of $K_d$ and ΔH were used to calculate free energy (ΔG) and entropy (ΔS) values.

## Results

### The Δ*pal* and Δ*pac-3* mutant strains show impaired growth at alkaline pH and high production of melanin

In *A. nidulans*, the pH signaling pathway includes the central regulator PacC, which undergoes proteolytic processing at a neutral to alkaline pH transition in a process mediated by the pH-dependent *pal* gene cascade and the proteasome [11]. *N. crassa* has the six *A. nidulans pal* gene homologs, and to characterize the putative *N. crassa* PAL proteins, we first analyzed the morphology of the Δ*pal* mutant strains. The gene knockout in all strains was confirmed by PCR using the oligonucleotides described in S2 Table (Real-time PCR primers). All *N. crassa pal* and *pacC* mutant strains were renamed here considering the Neurospora nomenclature [39], replacing the letters on the *A. nidulans* gene names by numbers (S1 Table, last column). S1 Table also shows the FGSC number and the mating type of the mutant strains, the ORF number, the theoretical MW and pI, the protein family or domain of the PAL and PAC-3 proteins and the annotation of ortholog proteins in fungi and yeast.




B

**Apical extension at different pH[a]**

| | wild-type | Δpac-3 | Δpal-1 | Δpal-2 | Δpal-3 | Δpal-6 | Δpal-8 | Δpal-9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pH 5.8** | 8.0 ± 0.32 | 5.2 ± 0.07 * | 6.2 ± 0.47 * | 6.5 ± 0.14 * | 6.2 ± 0.28 * | 7.0 ± 0.14 * | 6.9 ± 0.28 * | 8.5 ± 0.40 |
| **pH 7.8** | 4.5 ± 0.29 | 0.7± 0.21 * | 0.8 ± 0.28 * | 0.7 ± 0.35 * | 0.5 ± 0.14 * | 1.1 ± 0.07 * | 0.8 ± 0.07 * | 5.0 ± 0.38 |

**a.** Apical extension of basal hyphae was represented by the radial growth of the colonies (cm).

**Fig 1. Morphological analyses of the *pal* mutant strains. (A)** The strains ($10^7$ conidia/mL) were cultured in Erlenmeyer flasks containing solid VM medium plus 2% sucrose at pH 5.8 for 8–10 days. Basal hyphae growth was examined after cultivating the strains on Petri dishes containing solid VM medium plus 2% sucrose at pH 5.8 and 7.8 for 24 h at 30°C. **(B)** Radial growth of the colonies measured in cm. The results represent at least two independent experiments. *Indicates significant difference between wild-type and mutant strains at the same pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g001

To assess the effects of the knockout genes, we analyzed the Δ*pal*-1, Δ*pal-2*, Δ*pal-3*, Δ*pal-6*, Δ*pal-8*, Δ*pal-9* and Δ*pac-3* strains morphology at normal (5.8) and alkaline (7.8) pH. Ten-day old flask cultures at pH 5.8 exhibited reduced aerial growth, low conidiation and high production of a dark pigment, except Δ*pal-9* (the *palI* homolog), compared to the wild-type strain (Fig 1A). The Δ*pac-3* (the *pacC* homolog) and Δ*pal-6* (the *palF* homolog) strains showed the highest pigmentation among all the Δ*pal* mutants. Basal hyphae growth was examined after cultivating the strains on Petri dishes at pH 5.8 and 7.8 for 24 h. All mutant strains, except Δ*pal-9* (the *palI* homolog), were able to growth at pH 5.8; however, they were unable to grow at alkaline pH (7.8) (Fig 1A). Notably, all mutant strains showed reduced radial growth compared to the wild-type strain. The apical extension of the colonies at different pH values was measured and is presented in Fig 1B. These results suggest that PAC-3 and the PAL proteins, except PAL-9 (the PalI homolog), are required for growth under alkaline conditions, confirming that the *N. crassa pal* genes are involved in the response to alkaline pH stress as in *A. nidulans*. As most of the mutant strains showed high production of a dark pigment, likely melanin, we analyzed the levels of the tyrosinase gene (NCU00776) in the strains at pH 5.8 and 7.8 by RT-qPCR. Tyrosinase is a rate-limiting enzyme that controls the production of melanin [40]. The β-tubulin gene (*tub-2*, NCU04054) was used as the endogenous control. The tyrosinase gene was expressed in all mutant strains at normal growth pH (5.8) and over-expressed at alkaline pH ($P < 0.01$), except in Δ*pal-9*, which did not produce the dark pigment. These results indicate that the

expression of the gene was also regulated by alkaline pH (Fig 2A) and that the PAC-3 and PAL proteins may control the melanin biosynthesis by negatively regulating the tyrosinase expression. It is important to observe the high tyrosinase gene expression in the Δ*pac-3* strain, indicating that PAC-3, the final component of the pH signaling pathway, plays a key regulatory role in the tyrosinase expression.

An *in silico* analysis of the tyrosinase gene promoter revealed the existence of four *N. crassa* PAC-3 DNA binding preference (5'-BGCCVAGV-3') [41] in its 5'-flanking region (Fig 2B). ChIP-PCR assays were performed to confirm the regulation of the tyrosinase gene by PAC-3. One PAC-3 motif was analyzed for *in vivo* binding (the dashed box in Fig 2B). In these experiments, we used the Δ*pac-3* complemented strain (Δ*pac-3 his-3*::*Pccg-1-mCh-pac-3*) and an anti-mCherry antibody. Chromatin was collected from the mycelial samples grown for 24 h at pH 5.8 for 1 h after transfer to pH 7.8. The input DNA (I) and the reactions without antibody (no Ab) were used as positive and negative controls of the experiment, respectively. The results showed that PAC-3 bound to the tyrosinase promoter *in vivo*, under normal and alkaline pH conditions (Fig 2B). This DNA-protein binding may explain the high expression of the tyrosinase gene and most likely the high melanin biosynthesis by the mutant strains.

## *pac-3* complementation rescues the wild-type phenotype

To confirm that the morphological changes in the Δ*pac-3* (the *pacC* homolog) strain were due to the *pac-3* knockout, we constructed the Δ*pac-3* complemented strain (Δ*pac-3 his-3*::*Pccg-1-mCh-pac-3*) by inserting the *pac-3* genomic sequence from the wild-type strain into the *his-3* locus. When cultured under the same conditions as the mutant and the wild-type strains, the complemented strain (Δ*pac-3 pac-3*$^{+}$) restored the wild-type phenotype, confirming that the morphological aspects observed in the mutant strain are indeed due to the *pac-3* deletion (S1 Fig). We first analyzed growth of the Δ*pac-3* and the Δ*pac-3* complemented strains in tubes of 10-day cultures at pH 5.8. The complemented strain did not show melanin pigmentation and exhibited a similar phenotype to the wild-type strain (S1A Fig). To investigate the pH response in the complemented strain, we evaluated its sensitivity to pH stress in cultures after 24 h of growth at 30°C and compared the results to the Δ*pac-3* and wild-type strains. The Δ*pac-3* mutant strain was sensitive to both pH analyzed, exhibiting lower radial growth than the wild-type strain at pH 5.8 and an inability to grow at alkaline pH (7.8), while the rescued strain exhibited a wild-type phenotype at both pH values (S1B Fig). The results confirm that the effects of pH on the growth sensitivity and melanin production were indeed due to the lack of the active PAC-3 transcription factor.

## PAC-3 processing is pH-dependent

The *A. nidulans* PacC undergoes two proteolytic cleavage steps, while the *S. cerevisiae* Rim101p undergoes only one cleavage step for activation after transfer to alkaline pH. Therefore, we investigated whether PAC-3 undergoes proteolytic cleavages, resulting in isoforms with different molecular masses, and we used the Δ*pac-3* complemented strain in this experiment. The presence of PAC-3 was analyzed in cellular extracts from mycelia from wild-type and complemented strains cultivated at pH 5.8 (not subjected to pH stress) and from mycelia collected after transferring to pH 4.2 and 7.8 (for acid and alkaline stress, respectively) for 1 h. The protein was detected using the anti-mCherry antibody. In the complemented strain, PAC-3 is fused to mCherry having a final molecular weight of approximately 100 kD, which corresponds to 67.3 kD of the full-length PAC-3 protein (621 amino acid residues) along with 28.8 kD of mCherry (237 amino acid residues). The mCh-PAC-3 protein was predominantly detected in 50 μg of total protein from crude cellular extracts prepared from cultures grown at pH 5.8 and 4.2 and

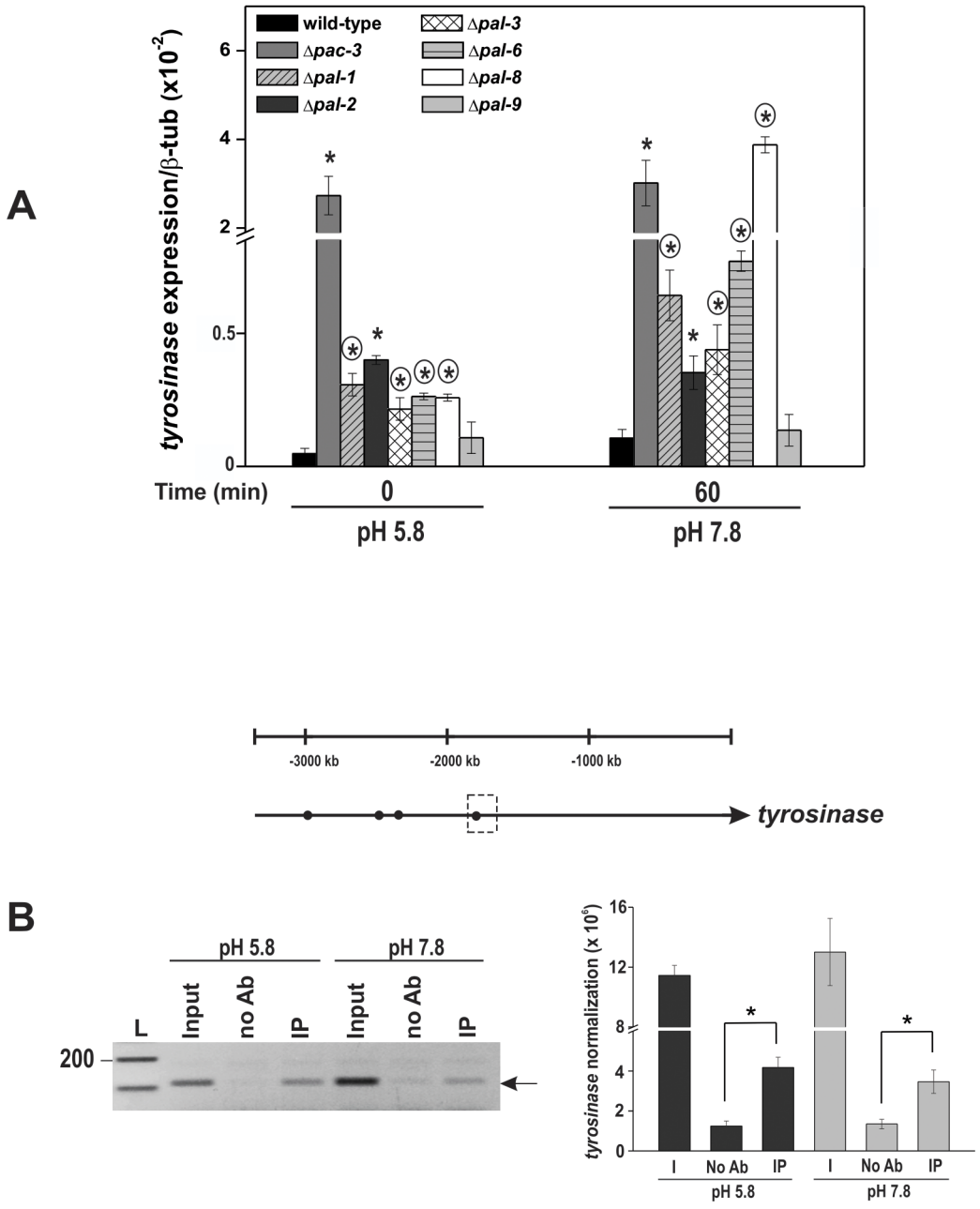



**Fig 2. Expression of the tyrosinase gene in the wild-type and the Δ*pal* mutant strains at normal (5.8) and alkaline (7.8) pH. (A)** Mycelial samples from the wild-type and Δ*pal* mutant strains cultured at pH 5.8 for 24 h and shifted to pH 7.8 for 1 h were used to extract total RNA. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR on the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using Power SYBR® Green and specific primers. The *tub-2* gene was used as the reference gene. The asterisks indicate significant differences compared to the wild-type strain at the same pH, and circles indicate significant differences between the same mutant strain cultured at a different pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$). **(B)** Representation of the PAC-3 motifs (black circles) in the tyrosinase gene promoter. Dashed boxes indicate the region analyzed by ChIP-PCR. Genomic DNA samples from the Δ*pac-3* complemented strain subjected to pH stress or not were immunoprecipitated with an anti-mCherry antibody and subjected to PCR using specific primers. The input DNA (I) was used as the positive control, and the reactions without any antibody (no Ab) were used as the negative control. The intensity of the DNA bands in the gel (left side, arrow) was quantified by ImageJ and the results are shown in the right figure. L, 1 kb DNA ladder. *Asterisks indicate significant differences between the no Ab and IP samples at the same pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$). All results represent the average of at least three independent experiments. Bars indicate the standard deviation from the biological experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g002

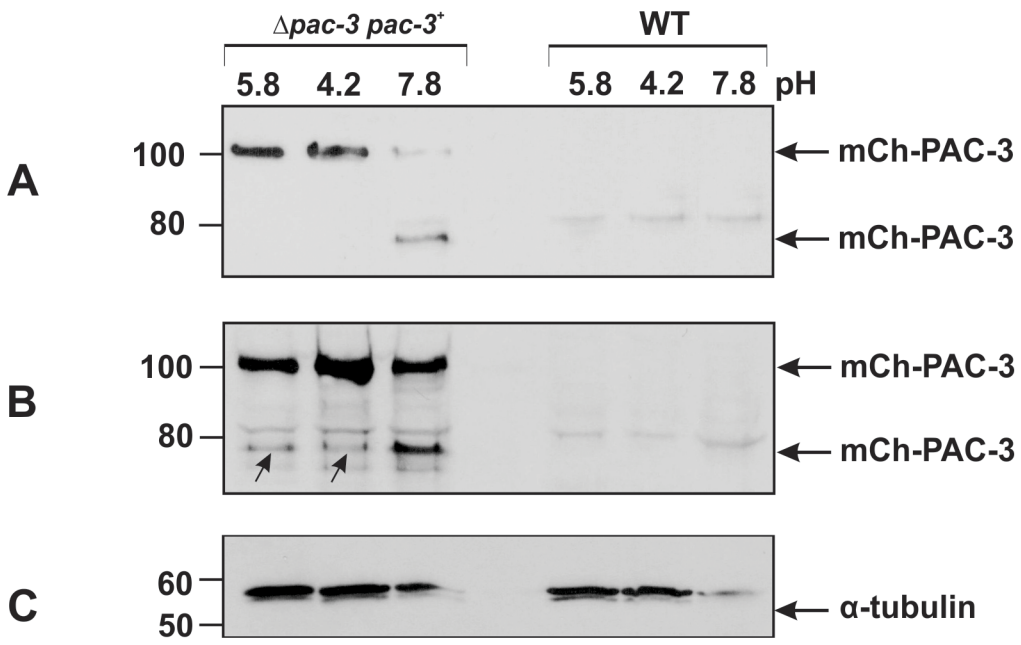



**Fig 3. PAC-3 proteolytic processing at alkaline pH.** PAC-3 protein levels were detected by western blot using the polyclonal anti-mCherry antibody and cell extracts from the wild-type and complemented (Δ*pac-3 pac-3*$^{+}$) strains cultivated at pH 5.8 at 30°C for 24 h and then shifted to pH 4.2 and 7.8 at 30°C for 1 h. **(A)** Aliquots of 50 μg of total protein were loaded onto the gel. **(B)** Aliquots of 70 μg of total protein were loaded onto the gel. The arrows indicate the processed mCh-PAC-3 form at pH 5.8 and 4.2. **(C)** The protein α-tubulin was used as the loading control. The plots represent one of the three independent experiments. The numbers on the left represent the molecular weight in kD.

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g003

was barely detected at pH 7.8 (Fig 3A). A single proteolytic cleavage was observed only at pH 7.8, leading to the production of a fused protein showing a molecular mass close to 80 kD (Fig 3A), indicating that the size of the PAC-3 processed form is similar to the intermediate PacC form from *A. nidulans* grown at alkaline pH (53 kD). It is important to mention that the *N. crassa* PAC-3 processed form was detected in cell extracts prepared from mycelium subjected to alkaline pH stress for 1 h, the time necessary for full PacC processing in *A. nidulans*. The second processed PacC form (PacC$^{27}$) described in *A. nidulans* was not detected in *N. crassa*.

We also analyzed 70 μg of total protein and observed the predominant full-length form of mCh-PAC-3 and one proteolytically processed form at pH 7.8 (Fig 3B). However, the same PAC-3 processed form was also observed at lower levels at pH 5.8 and 4.2 (arrows), indicating that PAC-3 may be proteolytically processed independent of the alkaline pH signaling pathway (Fig 3B). As expected, the mCh-PAC-3 protein was not detected in the wild-type cellular extracts. The blot probed with anti-α-tubulin antibody was used as loading control (Fig 3C). Based on these results, we conclude that PAC-3 undergoes only one pH-dependent proteolytic cleavage, similar to what is described for the *S. cerevisiae* and *C. albicans* Rim101 processing at alkaline pH. Interestingly, our results also show that PAC-3 could be processed in a pH-independent manner (pH 5.8 and pH 4.2), most likely independent of the *pal* signaling cascade.

## The PAC-3 transcription factor binds to all *pal* gene promoters *in vivo* and influences their expression

To investigate whether PAC-3 feedback controls the pH signaling by regulating the *pal* and *pac-3* genes, we analyzed the expression of all genes in mycelia from Δ*pac-3* and wild-type

strains grown at pH 5.8 for 24 h and in mycelia shifted to pH 7.8 for 1 h. The expression of all genes was analyzed by RT-qPCR using specific oligonucleotides described in S2 Table. The *tub-2* gene was used as the reference gene and the wild-type sample at pH 5.8 as the reference sample. Expression of the *pac-3* gene in the wild-type strain was significantly higher at alkaline pH ($P < 0.01$), as expected (Fig 4) and consistent with previous results obtained by Cupertino et al. [23]. Additionally, the *pal-1* (the *palA* homolog), *pal-2* (the *palB* homolog), and *pal-9* (the *palI* homolog) genes were over-expressed at alkaline pH in the wild-type strain, and their expression was dependent on the PAC-3 transcription factor since they were down-regulated in Δ*pac-3* strain under the same pH (Fig 4). Curiously, the Δ*pal-9* strain grew well at pH 7.8 and did produce melanin, although the *pal-9* expression was regulated by alkaline pH. On the other hand, the expression of the *pal-6* (the *palF* homolog) gene was significantly down-regulated in the wild-type strain at pH 7.8 ($P < 0.01$) and dependent on the PAC-3 transcription factor. Finally, the expression of the *pal-3* (the *palC* homolog) gene however, was not influenced by PAC-3 or pH 7.8, and while the expression of *pal-8* (the *palH* homolog, the pH sensor) gene was dependent on PAC-3, it was not influenced by pH 7.8 in the wild-type strain (Fig 4). In summary, the expression of *pal* genes was differentially regulated by alkaline pH and by the PAC-3 transcription factor.

An *in silico* analysis of the *pal* gene promoters revealed the existence of the *N. crassa* PAC-3 motif in all promoters, either adjacent to or distant from each other (Fig 5A), suggesting that the *N. crassa* PAC-3 transcription factor could directly regulate the expression of these genes. Many PAC-3 motifs were also identified within the *pac-3* gene promoter. A ChIP-PCR assay was performed to analyze whether PAC-3 could bind to DNA fragments containing some of these motifs *in vivo*. The PAC-3 motifs analyzed are shown in the dashed boxes in Fig 5A. In these experiments, we used the Δ*pac-3* complemented strain and the anti-mCherry antibody. Chromatin was collected from mycelia subjected to alkaline pH stress or not, and the binding of PAC-3 to all gene promoters was analyzed by PCR using the oligonucleotides described in S2 Table. As a positive control of the experiments, the input DNA (I) was analyzed, and as negative controls, a fragment of the ubiquitin gene lacking the PAC-3 motif and the non-immunoprecipitated reactions (N) were used. The DNA fragments amplified in the ChIP-PCR assays (Fig 5B) were quantified by ImageJ and the results are shown in the graphs (Fig 5C). PAC-3 was able to significantly bind to all motifs analyzed both before and after pH stress, with the exception of the motifs in the *pal-2* (the *palB* homolog) and *pac-3* (the *pacC* homolog) promoters, which were bound only at alkaline pH (Fig 5B and 5C). Notably, PAC-3 bound to its own gene promoter suggesting a feedback regulation of PAC-3 under this pH (Fig 5C).

The comparison of the *pal* gene expressions with PAC-3 binding to their promoters allowed us to observe that the promoters of genes whose expression was dependent on PAC-3, such as *pal-1* (the *palA* homolog), *pal-2* (the *palB* homolog), *pal-6* (the *palF* homolog), *pal-8* (the *palH* homolog), and *pal-9* (the *palI* homolog) genes, as shown in Fig 4, were bound *in vivo* by PAC-3 at alkaline pH. Although the expression of the *pal-3* (the *palC* homolog) gene was not influenced by alkaline pH or by PAC-3 (Fig 4), the transcription factor bound to its gene promoter under both conditions (Fig 5C). In this case, PAC-3 was able to bind to the promoter although did not influence its expression. Finally, PAC-3 did not bind to the ubiquitin gene fragment, which has no PAC-3 motif (Fig 5B and 5C) ($P < 0.01$), showing the specificity of the transcription factor binding. All these results show that PAC-3 binds to most of the *pal* promoters *in vivo*, including its own gene promoter, and may influence their expression at normal and alkaline pH.

Since the PAC-3 transcription factor bound to *pac-3* and to the *pal* promoters at alkaline pH, and that *pac-3* was highly expressed in the wild-type strain grown under the same condition, we asked whether the *pac-3* expression could be influenced by the PAL components of the signaling pathway. To investigate this, we analyzed the expression of the *pac-3* gene in mycelia samples

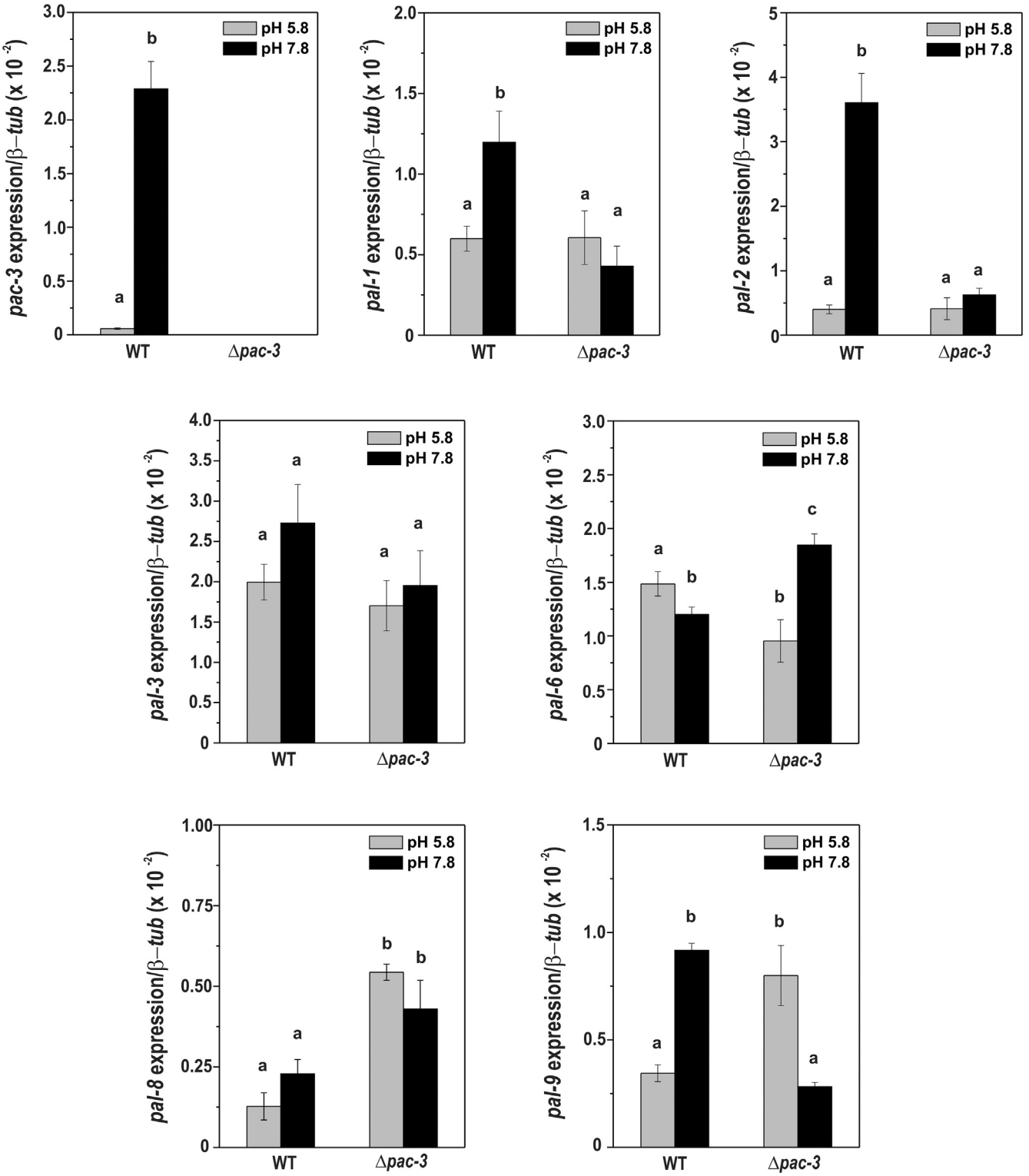



**Fig 4. Expression of the *pal* genes in the wild-type and Δ*pac-3* strains at normal and alkaline pH.** Cells from the wild-type and Δ*pac-3* strains were cultured at pH 5.8 for 24 h and shifted to pH 7.8 for 1 h. Mycelial samples were collected and used to extract total RNA. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR in the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green and specific primers. The *tub-2* gene was used as the reference gene, and the pH 5.8 wild-type was used as the reference sample. At least three biological replicates were performed, and the data were analyzed using the relative quantification standard curve method. Bars

indicate the standard deviation from the biological experiments. **a, b, c:** Letters above the bars indicate statistical significance; different letters indicate significant differences between two samples and similar letters indicate no significant difference between two samples at the same or different pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g004

from the wild-type and all Δ*pal* strains grown at pH 5.8 for 24 h (control) and in mycelia grown at pH 5.8 and shifted to pH 7.8 for 1 h (Fig 6). We observed very high expression of *pac-3* in the wild-type strain at pH 7.8, in agreement with the results shown in Fig 4. However, very low expression was observed in most of the Δ*pal* mutants at both pH, indicating a negative effect of the PAL components on the *pac-3* expression. These results also suggest that a functional pH signaling pathway is required for proper *pac-3* expression. Thus, we hypothesized that PAC-3 activation in *N. crassa* results from proteolytic processing and gene expression regulation by the PAL and PAC-3 components. Interestingly, PAL-9 (the PalI homolog), which did not influence growth at pH 7.8, as shown in Fig 1, also did not influence the *pac-3* expression. However, it was bound by PAC-3 (see Fig 5C) and its expression was influenced by PAC-3 at both pH values.

## PAC-3 shuttles between the nucleus and cytoplasm and may require importin-α

Since the PAC-3 transcription factor binds to the *pal* and *pac-3* promoters at normal and/or alkaline pH and likely regulates their gene expression under the same conditions, we decided to analyze the subcellular localization of PAC-3 under pH stress. To assess this, we used the Δ*pac-3* complemented strain, in which PAC-3 is produced as an N-terminus mCherry-tagged fusion protein under the control of the *ccg-1* promoter. For this, conidia were germinated at pH 5.8 for 12 h and then transferred to pH 7.8 for 30 min and 1 h. The mCh-PAC-3 was predominantly located in the cytoplasm at pH 5.8; however, after 1 h of transfer to pH 7.8, PAC-3 was detected predominantly in the nuclei (Fig 7A). These data are consistent with the results of PAC-3 binding to the *pal* and *pac-3* promoters and the expression modulation of these genes at alkaline pH, a condition where PAC-3 should be predominantly located in the nucleus. Our results are also in agreement with those described for *A. nidulans* by Peñalva et al. [8], who observed a preferential nuclear localization of the $PacC^{27}$ and $PacC^{53}$ forms under the same condition.

Since importin-α, together with importin-β, recognizes cargo proteins that contain nuclear localization sequences (NLS) and translocates into nucleus, we investigated the PAC-3 translocation by analyzing *in vitro* the interaction between importin-α and a peptide corresponding to the putative nuclear localization signal (NLS) of PAC-3. For this assay, recombinant *N. crassa* importin-α from *E. coli* was produced, and its interaction with the PAC-3 NLS peptide was analyzed by ITC to obtain the dissociation constant and the thermodynamic values for the formation of this complex. ITC data analyses resulted in a single binding site model indicating that one peptide binds to one protein with strong affinity (Fig 7B), with a dissociation constant ($K_d$) of 0.39 ± 0.074 μM, enthalpy (ΔH) of -12.10 ± 0.17 kcal $mol^{-1}$ and entropy (ΔS) of -12.20 cal $mol^{-1}$. The negative enthalpy and entropy suggest that the hydrogen bonds play an important role in this interaction and that conformational changes are unfavorable, which are consistent with the interaction between the NLS sequences and importin-α [42] and in other organisms [27]. The data obtained from the titration of the PAC-3 NLS peptide to importin-α showed similar $K_d$ values to ITC assays of importin-α and NLS peptides from other analyses [42–44].

# Discussion

All microorganisms need to develop the ability to adapt to environmental pH since it strongly impacts cell growth and development. The Pac/Rim in filamentous fungi and yeast is the best-

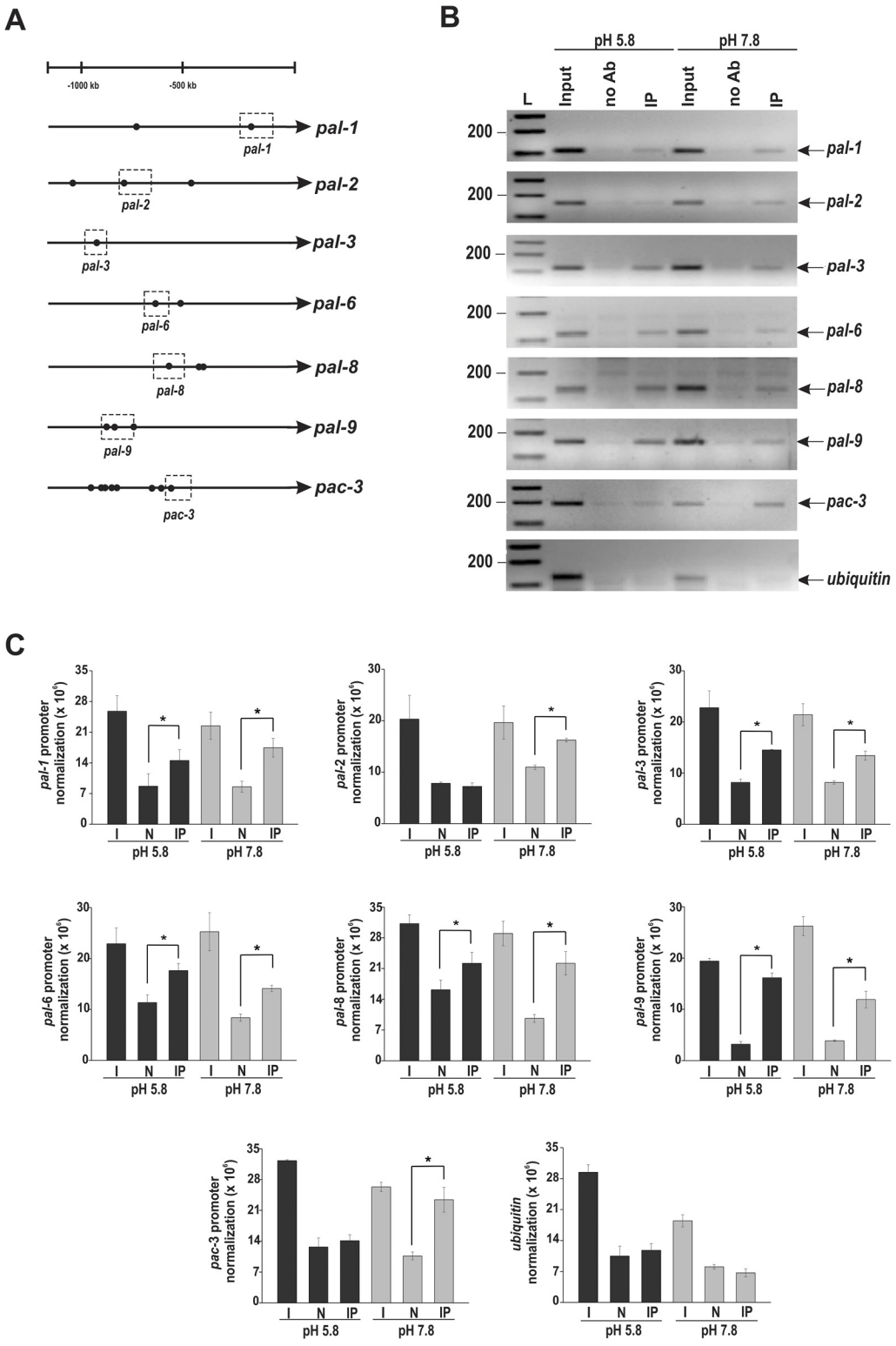



**Fig 5. Binding of PAC-3 to the *pal* gene promoters at normal and alkaline pH. (A)** Representation of the PAC-3 motifs in the *pal* gene promoters. The black dots indicate the position of the PAC-3 motifs, and the dashed boxes indicate regions that were analyzed by ChIP-PCR. **(B)** Genomic DNA samples from the Δ*pac-3* complemented strain both subjected to alkaline pH stress or not were immunoprecipitated with the anti-mCherry antibody and subjected to PCR to amplify DNA fragments containing the PAC-3 motif. A DNA

fragment from the ubiquitin gene, which does not have a PAC-3 motif, was used as a negative control of binding. The input DNA (I) was used as a positive control and the non-immunoprecipitated reaction (no Ab) as the negative control. L, 1 kb DNA ladder. **(C)** The DNA bands after ChIP-PCR were quantified by ImageJ and the results are shown in the graphs. *Asterisks indicate significant differences between no Ab and IP at the same pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$). All results represent the average of at least two independent experiments. Bars indicate the standard deviation from the biological experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g005

characterized signaling pathway involved in the pH stress response, and numerous reports have described its importance in different cellular processes. *N. crassa* shares all six *A. nidulans* Pal orthologs along with the ESCRT proteins required for signal sensing and proteolytic activation of PAC-3 in response to ambient alkaline pH. In this work, we investigated the components of the *N. crassa* pH signaling pathway regarding their characterization upon transition from neutral to alkaline pH conditions. All Δ*pal* mutant strains showed reduced growth and low conidiation at normal growth pH, consistent with previously reported results [26]. In addition, the mutant strains showed an inability to grow at alkaline pH, the same phenotype described for the *A. nidulans pal* mutants [45]. The Δ*pal-9* strain, however, exhibited a wild-type phenotype. PAL-9 is the *A. nidulans* PalI component, which is located in the plasma membrane and together with PalH and PalF establishes the ambient pH signal. Although unnecessary for growth at alkaline pH, *pal-9* expression is regulated by the PAC-3 transcription factor following transition from normal to alkaline pH in *N. crassa*. This is quite surprising because in *A. nidulans* the PalI component is required for normal growth at pH 8 compared to the wild-type strain under the same condition [45].

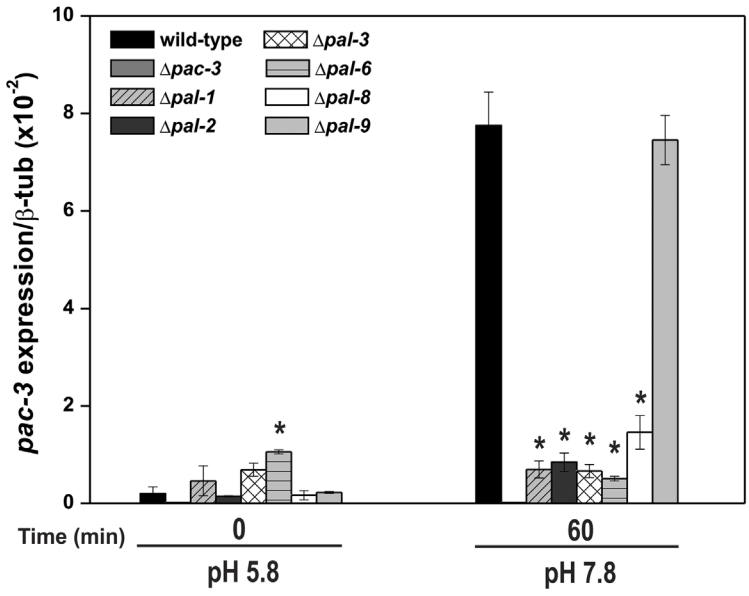



**Fig 6. The expression of the *pac-3* gene at normal and alkaline pH.** Samples from the wild-type and from all *pal* mutant strains cultured at pH 5.8 for 24 h and then shifted to pH 7.8 for 1 h were used to extract total RNA. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR in the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green and specific primers. At least three biological replicates were carried out, and the data were analyzed using the relative quantification standard curve method. Bars indicate the standard deviation from the biological experiments. The *tub-2* gene was used as the reference gene, and the pH 5.8 wild-type was used as the reference sample. *Asterisks indicate significant differences compared to the wild-type at the same pH (Student's *t*-test, $P < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g006

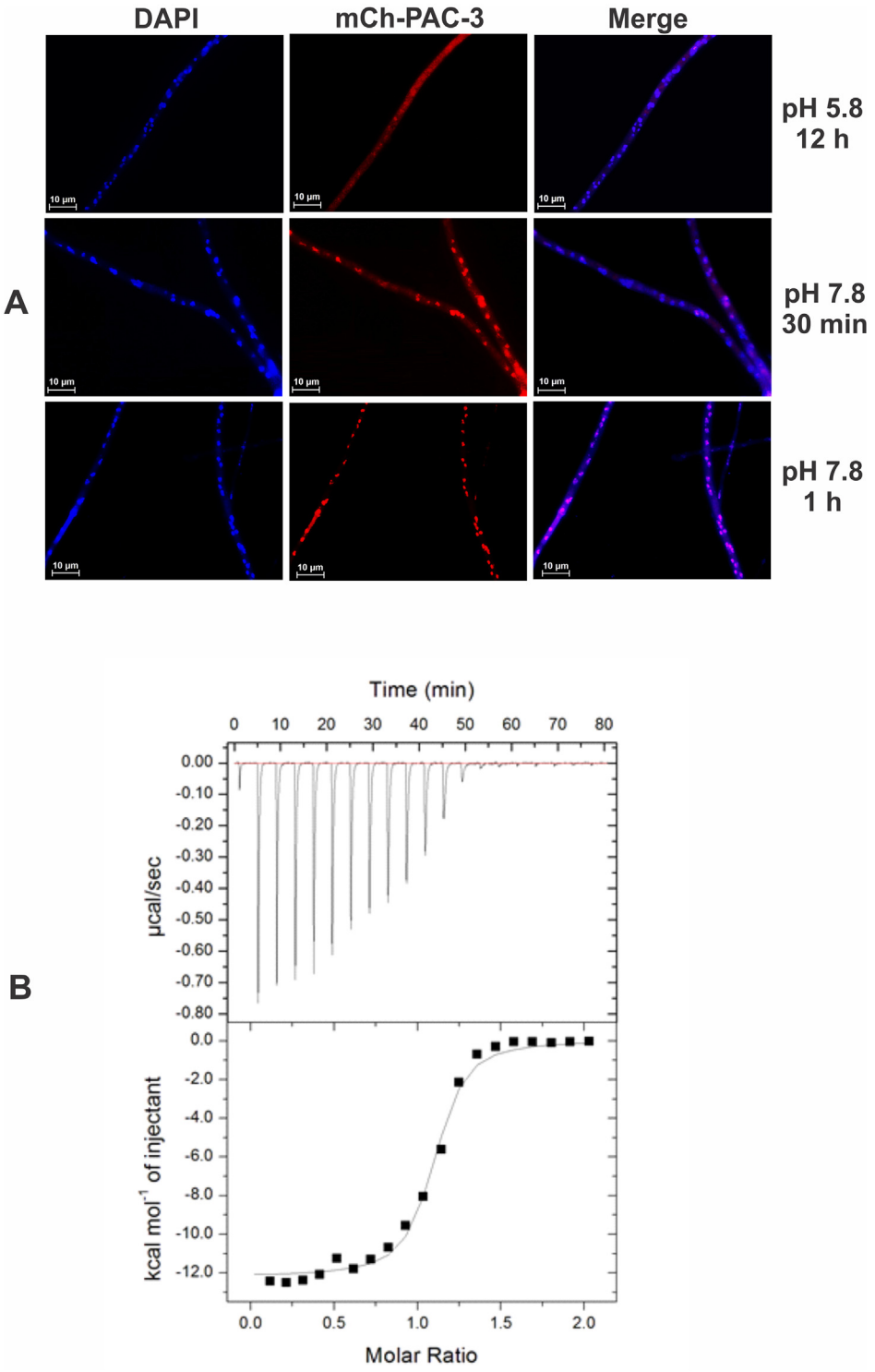



**Fig 7. Subcellular localization of PAC-3. (A)** The PAC-3 protein translocates to the nucleus at alkaline pH. Conidia from the Δ*pac-3* complemented strain were grown onto coverslips in liquid VM medium containing 1% sucrose, pH 5.8 at 30°C for 12 h. After this period, mycelia were transferred to VM medium containing 1% sucrose, pH 7.8 at 30°C (alkaline pH) for 30 min and 1 h. The mycelia were fixed with formaldehyde in PBS, the nuclei were stained with DAPI, and the fluorescence was visualized. Fluorescence was evaluated using the microscope AXIO Imager.A2 (Zeiss) at a magnification of 100 X. The results from one of three independent experiments are shown. **(B)** Isothermal Titration Calorimetry analysis of the PAC-3 NLS peptide

binding to importin-α at 20°C. The upper panel corresponds to the thermogram of the replicate titrations (thermal power as a function of time). The lower panel displays the binding isotherm integrated data (kcal $mol^{-1}$ of injectant versus molar ratio of PAC-3 NLS to importin-α).

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g007

An interesting characteristic of the *N. crassa* mutant strains, which has not been reported in any of the mutant strains of the pH signaling pathway, is the high production of the pigment melanin, which is important for cell protection in diverse microorganisms and is associated with virulence in many human pathogenic fungi [46, 47]. In *N. crassa*, melanin accumulation by most of the mutant strains in the pH signaling pathway could not be attributed to cell protection under adverse conditions, since the pigment accumulation was high at normal growth pH. This result suggests that the components of the signaling pathway, either directly or indirectly, affect the melanin production under normal growth conditions. To identify a regulatory mechanism connecting both processes, pH signaling and melanin accumulation, we demonstrated that the tyrosinase gene was over-expressed in all mutant strains, mainly in the Δ*pac-3* (the *pacC* homolog) strain, but not in Δ*pal-9* (the *palI* homolog) strain. Thus, PAC-3 appears to be the main regulator of tyrosinase expression; it is the final component of the signaling pathway whose activation results from an active signaling cascade. All data are coincident with the high number of PAC-3 motifs in the tyrosinase promoter and with the ability of PAC-3 to bind to the promoter in a pH-independent manner. Melanin is an insoluble compound and is associated with virulence in numerous fungal pathogens, such as *C. neoformans* [48] and *Paracoccidioides brasiliensis* [49], among others. In *N. crassa*, protoperithecia differentiation was previously correlated with tyrosinase activity and melanin formation [50]. More recently, Park et al. [51] suggested a role for the MAK-1 pathway in melanin production in *N. crassa* by modulating the tyrosinase gene expression under nitrogen starvation. Mutant strains in two components of this pathway (Δ*mek-1* and Δ*mak-1*) exhibited high tyrosinase gene expression and accumulated melanin [51]. In addition to the MAK-1 pathway, the pH signaling pathway, among other pathways, was also reported to be required for protoperithecia formation [26], indicating the requirement of different signaling pathways for female development in *N. crassa*. The results presented in this work connect all these data by demonstrating that the pH signaling pathway controls tyrosinase gene expression and, as a consequence, the melanin accumulation, which is required for female development. However, the influence of the pH signaling pathway in both processes, protoperithecia formation and melanin production, may be modulated by different regulatory mechanisms because the mutant strains in this pathway are unable to develop protoperithecia but they over-express tyrosinase and accumulate melanin. Additional signaling pathways could play a role in connecting both processes.

We showed here that most of the pH signaling pathway components, but not all, were regulated at the gene expression level by ambient pH, which suggests the existence of feedback regulation on these genes. Such regulation in the pH pathway components was previously reported only for the *C. albicans RIM8* gene, which was described as transcriptionally repressed at alkaline pH [19, 52]. In *N. crassa*, the expression of the *pal-6* homolog was also negatively regulated by alkaline pH, consistent with the results described in *C. albicans*. However, alkaline pH also positively regulates several *pal* genes (*pal-1*, *pal-2*, and *pal-9*) in *N. crassa*, suggesting that opposing regulatory mechanisms affect the pH signaling components. Interestingly, while the *pal-9* expression was regulated by alkaline pH, the PAL-9 protein appears to play a minor role in pH signaling transduction in *N. crassa* since the Δ*pal-9* mutant strain did not display growth defects at alkaline pH. This is in contrast to what was reported in *S. cerevisiae* and *C. albicans*, where the Rim9 homolog is necessary for Rim101 cleavage and therefore fully required for pH

signaling transduction [17, 53]. The expression of several *pal* genes, including *pal-6*, *pal-8* and *pal-9*, was also dependent on the PAC-3 transcription factor, which indicates that they require an active signaling pathway for normal expression. This result may be a consequence of the ability of PAC-3 to bind to all *pal* promoters at both pH conditions, likely regulating the expression of most *pal* genes.

The *pac-3* expression was also negatively modulated irrespective of both pH by the PAL components in *N. crassa*, with the exception of PAL-9, indicating the existence of a cross-regulation among all components of this signaling pathway and a self-regulation on *pac-3* expression. Considering this result, we may suggest that this regulation may be a consequence of the lack of an active PAC-3 in the *pal* mutant strains, which, once activated, could bind to its own promoter at alkaline pH, activating its expression. In *A. nidulans*, Trevisan et al. [54] described the existence of alternative RNA splicing of the *palB* gene, depending on the growth conditions, which could affect the PacC protein activity. We also cannot preclude the existence of additional proteins involved in such cross-regulation, similar to what was recently described for the PacX protein in *A. nidulans* [21], which was identified to play a role in *pacC* gene repression.

We demonstrated here that PAC-3 may be processed in a single proteolytic step, similar to what was described for *S. cerevisiae* [17] and *C. albicans* [18]. In addition, as in *C. albicans*, PAC-3 processing was also observed at acidic pH, which could explain the localization of PAC-3 to the nucleus at normal pH growth conditions and its regulatory function at the same pH. The results presented here regarding the protein processing at acidic pH confirm previous results obtained by our group [23] using different experimental approaches. However, we previously were unable to detect the unprocessed PAC-3 [23]. We also showed here that PAC-3 translocates to the nucleus at alkaline pH and that this process may occur by the classical nuclear import pathway, in which importin-α binds to a specific NLS, known as classical NLSs. ITC assays between PAC-3 NLS and importin-α demonstrated that these molecules have an affinity compatible with the interaction between a classical NLS peptide and importin-α [42]. A classical bipartite NLS presents two basic clusters that binds to different regions of the importin-α [38] with a stoichiometry of 1:1, and its consensus sequence is generally accepted as **KR**$X_{10\text{-}12}$**K**(K/R)X(K/R), where X corresponds to any residue, and residues in bold indicate critical residues [55]. PAC-3 NLS displays all these critical requirements, except for the last position (K/R) (Fig 8A), for its sequence to be classified as a classical bipartite NLS. ITC results also supported this identification because a stoichiometry of 1:1 for the NLS peptide/importin-α complex is characteristic of a bipartite NLS, while most classical monopartite NLSs bind with a stoichiometry of 1:2 (protein:peptide). Thus, the data presented here indicate that this NLS region is responsible for the recognition of the PAC-3 transcription factor by importin-α, and these components may form a complex that permits PAC-3 to be translocated to the nucleus under specific conditions. The *N. crassa* importin-α used in our work was first identified by Foss et al. [56] as important for DNA methylation, and later described as required for heterochromatic formation and DNA methylation [57, 58].

Finally, we may conclude that the *N. crassa* PAC-3 transcription factor cycles between the cytoplasm and nucleus under pH alkaline stress, either up- or down-regulating the expression of pH-responsive genes. Based on our findings, we propose a model of the pH signaling pathway in *N. crassa* (Fig 8B). According to the results, the pathway requires the same Pal/Rim components described in *A. nidulans* and *S. cerevisiae*, sharing characteristics with both organisms. We suggest that the PAC-3 transcription factor, once activated, regulates the *pal* gene expression and that this regulation may be directly mediated by PAC-3 because it binds to all *pal* promoters.

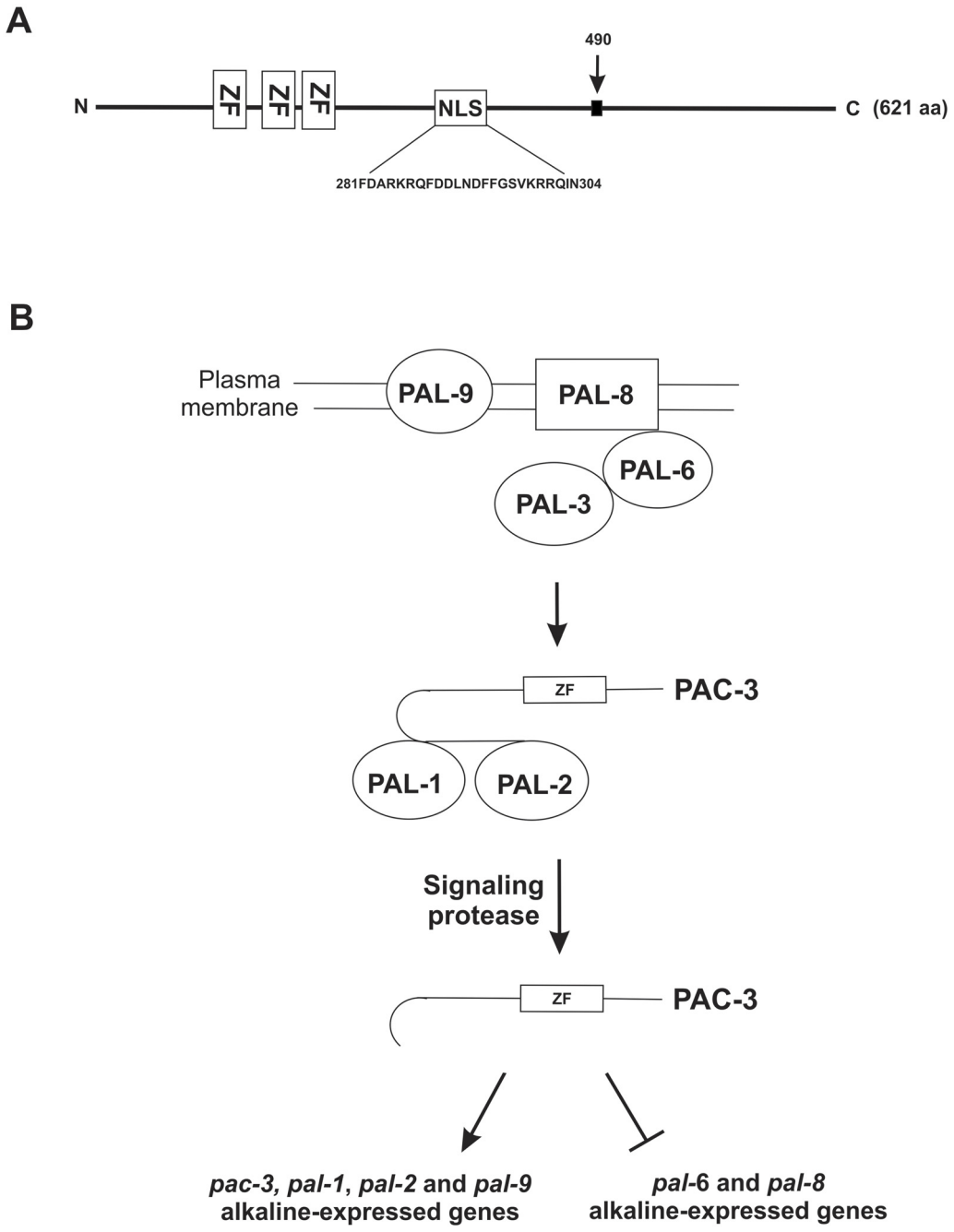



**Fig 8. Proposed model for the alkaline pH signaling in *N. crassa*. (A)** The PAC-3 protein contains 621 amino acid residues and has three $C_2H_2$ zinc-finger domains encompassing the amino acid from 95 to 183. The NLS sequence is shown between amino acid residues 281 and 304. The black arrow indicates the putative protease-processing site at amino acid 490. **(B)** *N. crassa* has the six *A. nidulans* Pal homologues. External pH signaling may involve the PAL-8, PAL-9, PAL-6 and PAL-3 complex. PAL-1 may act together with PAL-2 and may recruit the PAC-3 protein. PAC-3 undergoes only one proteolytic processing and is likely involved in the activation of the *pal-1*, *pal-2*, *pal-9*, and *pac-3* genes and the repression of the *pal-6* and *pal-8* genes at alkaline conditions. aa, amino acid; ZF, $C_2H_2$ zinc finger; NLS, nuclear localization signal.

doi:10.1371/journal.pone.0161659.g008

## Supporting Information

**S1 Fig. Morphological analysis of the Δ*pac-3* complemented strain. (A)** Growth of the wild-type, Δ*pac-3* and Δ*pac-3* complemented (Δ*pac-3 pac-3*$^{+}$) strains in tubes containing solid VM medium plus 2% sucrose at pH 5.8. **(B)** Growth of the same strains in Petri dishes containing solid VM medium plus 2% sucrose at pH 5.8 and 7.8 for 24 h.
(TIF)

**S1 Table. Protein family or domain classification, annotation, and biochemical and structural characteristics of the proteins.**
(DOC)

**S2 Table. Oligonucleotides used in this study.**
(DOC)

## Acknowledgments

We thank Dr. Trevor Lee Starr, University of California at Berkeley, Laboratory of Plant and Microbial Biology, Berkeley, CA, USA, for the plasmid pTSL48-B and the Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, MO) for the Neurospora strains. We thank Jonatas E. M. Campanella for helping with the microscopy analysis and Antonio Tarcisio Delfino for technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** SV MRMF MCB.

**Funding acquisition:** MRMF MCB.

**Investigation:** SV NEB FBC FZF AAST.

**Methodology:** SV NEB FBC MRMF MCB.

**Resources:** MRMF MCB.

**Writing – original draft:** SV NEB MRMF MCB.

**Writing – review & editing:** SV MRMF MCB.

## References

1. Peñalva MA, Lucena-Agell D, Arst HN Jr. Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. Curr Opin Microbiol. 2014; 22:49–59. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.005 PMID: 25460796
2. Cornet M, Gaillardin C. pH signaling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies. Eukaryot Cell. 2014; 13(3):342–352. doi: 10.1128/EC.00313-13 PMID: 24442891
3. Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. Curr Genet. 2003; 44(1):1–7. PMID: 12819929
4. Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns TC, Muñoz A, Walker LA, et al. The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. PLoS Pathog. 2014; 10(10):e1004413 doi: 10.1371/journal.ppat.1004413 PMID: 25329394
5. O'Meara TR, Xu W, Selvig KM, O'Meara MJ, Mitchell AP, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Rim101 transcription factor directly regulates genes required for adaptation to the host. Mol Cell Biol. 2014; 34(4):673–684. doi: 10.1128/MCB.01359-13 PMID: 24324006
6. Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, et al. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. EMBO J. 1995; 14(4):779–790. PMID: 7882981

7. Su SS, Mitchell AP. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. Genetics 1993; 133(1):67–77. PMID: 8417990
8. Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. Trends Microbiol. 2008; 16(6):291–300. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.006 PMID: 18457952
9. Ariño J. Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. OMICS. 2010; 14(5):517–523. doi: 10.1089/omi.2010.0044 PMID: 20726779
10. Díez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, et al. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. EMBO J. 2002; 21(6):1350–1359. PMID: 11889040
11. Arst HNJr, Peñalva MA. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. Trends Genet. 2003; 19(4):224–231. PMID: 12683976
12. Peñas MM, Hervás-Aguilar A, Múnera-Huertas T, Reoyo E, Peñalva MA, Arst HN Jr, et al. Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. Eukaryot Cell. 2007; 6(6): 960–970. PMID: 17416893
13. Rodríguez-Galán O, Galindo A, Hervás-Aguilar A, Arst HN Jr, Peñalva MA. Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of Aspergillus PalB cysteine protease to ESCRT-III. J Biol Chem. 2009; 284(7):4404–4412. doi: 10.1074/jbc.M808645200 PMID: 19056728
14. Calcagno-Pizarelli AM, Hervás-Aguilar A, Galindo A, Abenza JF, Peñalva MA, Arst HN Jr. Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. J Cell Sci. 2011; 124(Pt 23):4064–4076. doi: 10.1242/jcs.088344 PMID: 22135362
15. Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN Jr, Peñalva MÁ. An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. J Cell Sci. 2012; 125(Pt 7):1784–1795 doi: 10.1242/jcs.098897 PMID: 22344261
16. Lucena-Agell D, Galindo A, Arst HN Jr, Peñalva MA. *Aspergillus nidulans* ambient pH signaling does not require endocytosis. Eukaryot Cell. 2015; 14(6):545–553. doi: 10.1128/EC.00031-15 PMID: 25841020
17. Li W, Mitchell AP. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. Genetics. 1997; 145(1):63–73. PMID: 9017390
18. Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. Eukaryot Cell. 2004; 3(3):741–751. PMID: 15189995
19. Gomez-Raja J, Davis DA. The β-arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH. Eukaryot Cell. 2012; 11(5): 683–693. doi: 10.1128/EC.05211-11 PMID: 22427429
20. Hervás-Aguilar A, Galindo A, Peñalva MA. Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. J Biol Chem. 2010; 285(23):18095–18102. doi: 10.1074/jbc.M110.114371 PMID: 20368671
21. Bussink HJ, Bignell EM, Múnera-Huertas T, Lucena-Agell D, Scazzocchio C, Espeso EA, et al. (2015) Refining the pH response in *Aspergillus nidulans*: a modulatory triad involving PacX, a novel zinc binuclear cluster protein. Mol Microbiol. 2015; 98(6):1051–1072. doi: 10.1111/mmi.13173 PMID: 26303777
22. Ost KS, O'Meara TR, Huda N, Esher SK, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel rim pathway activator. PLoS Genet. 2015; 11(4):e1005159 doi: 10.1371/journal.pgen.1005159 PMID: 25859664
23. Cupertino FB, Freitas FZ, de Paula RM, Bertolini MC. Ambient pH controls glycogen gevels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway. Plos One. 2012; 7(8):e44258 doi: 10.1371/journal.pone.0044258 PMID: 22952943
24. Nozawa SR, Ferreira-Nozawa MS, Martinez-Rossi NM, Rossi A. The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. Fungal Genet Biol. 2003; 39(3): 286–295. PMID: 12892641
25. Squina FM, Leal J, Cipriano VT, Martinez-Rossi NM, Rossi A. Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. Cell Stress Chaperones 2010; 15(2):225–231. doi: 10.1007/s12192-009-0131-z PMID: 19618296
26. Chinnici JL, Fu C, Caccamise LM, Arnold JW, Free SJ. *Neurospora crassa* female development requires the PACC and other signal transduction pathways, transcription factors, chromatin remodeling, cell-to-cell fusion, and autophagy. PLoS One. 2014; 9(10):e110603 doi: 10.1371/journal.pone.0110603 PMID: 25333968
27. Christie M, Chang CW, Róna G, Smith KM, Stewart AG, Takeda AAS, et al. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. J Mol Biol. 2016; 428: doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.023

28. McCluskey K. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. Adv Appl Microbiol. 2003; 52: 245–262. PMID: 12964247

29. Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). Microbiol Genet Bull. 1956; 13:42–43.

30. Sokolovsky V, Kaldenhoff R, Ricci M, Russo VEA. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. Fungal Genet Newsl. 1990; 37:41–43.

31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods. 2001; 25(4):402–408. PMID: 11846609

32. Garceau NY, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. Cell. 1997; 89(3):469–476. PMID: 9150146

33. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 1972; 48(2):422–427. PMID: 4115981

34. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680–685. PMID: 5432063

35. Tamaru H, Zhang X, McMillen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, et al. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. Nat Genet. 2003; 34(1):75–79. PMID: 12679815

36. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. Biophotonics Intern. 2004; 11 (7):36–42.

37. Takeda AAS, Freitas FZ, Magro AJ, Bernardes NE, Fernandes CAH, Gonçalves RD, et al. Biophysical characterization of the recombinant importin-α from *Neurospora crassa*. Protein Pept Lett. 2013; 20 (1):8–16. PMID: 22789101

38. Fontes MR, Teh T, Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. J Mol Biol. 2000; 297(5):1183–1194. PMID: 10764582

39. Perkins DD, Radford A, Newmeyer D, Björkman M. Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. Microbiol Rev. 1982; 46(4):426–570. PMID: 6219280

40. Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim Biophys Acta. 1995; 1247(1):1–11. PMID: 7873577

41. Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Montenegro-Montero A, Drewe P, et al. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. Cell. 2014; 158(6):1431–1443. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.009 PMID: 25215497

42. Bernardes NE, Takeda AAS, Dreyer TR, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MRM. Structure of Importin-α from a filamentous fungus in complex with a classical nuclear localization signal. PLoS One. 2015; 10: e0128687 doi: 10.1371/journal.pone.0128687 PMID: 26091498

43. Lott K, Bhardwaj A, Sims PJ, Cingolani G. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin alpha1. J Biol Chem. 2011; 286(32):28160–28169. doi: 10.1074/jbc.M111.228007 PMID: 21690087

44. Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. J Cell Sci. 2008; 121(Pt 7):957–968. doi: 10.1242/jcs.022103 PMID: 18319300

45. Peñalva MA, Arst HN Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66(3):426–446. PMID: 12208998

46. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. Curr Opin Infect Dis. 2003; 16(2):91–96. PMID: 12734441

47. Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A. Fungal melanin: What do we know about structure? Front Microbiol. 2015; 6: 1463 doi: 10.3389/fmicb.2015.01463 PMID: 26733993

48. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol. 2000; 3(4):354–358. PMID: 10972493

49. Silva MB, Thomaz L, Marques AF, Svidzinski AE, Nosanchuk JD, Casadevall A, et al. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (4):644–648. PMID: 19722091

50. Hirsch HM. Environmental factors influencing the differentiation of protoperithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in *Neurospora crassa*. Physiol Plant. 1954; 7(1):72–97.

51. Park G, Pan S, Borkovich KA. Mitogen-activated protein kinase cascade required for regulation of development and secondary metabolism in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 2008; 7(12):2113–2122. doi: 10.1128/EC.00466-07 PMID: 18849472

52. Porta A, Ramon AM, Fonzi WA. PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. J Bacteriol. 1999; 181(24):7516–7523. PMID: 10601209

53. Cornet M, Richard ML, Gaillardin C. The homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM9 gene is required for ambient pH signaling in *Candida albicans*. Res Microbiol. 2009; 160(3):219–293. doi: 10.1016/j.resmic.2009.02.002 PMID: 19230847

54. Trevisan GL, Oliveira EH, Peres NT, Cruz AH, Martinez-Rossi NM, Rossi A. Transcription of *Aspergillus nidulans pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. FEBS Lett. 2011; 585(21):3442–3445. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.037 PMID: 21985967

55. Marfori M, Lonhienne TG, Forwood JK, Kobe B. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin-α. Traffic. 2012; 13(4):532–548. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x PMID: 22248489

56. Foss HM, Roberts CJ, Claeys KM, Selker EU. Abnormal chromosome behavior in Neurospora mutants defective in DNA methylation Science. 1993; 262(5140):1737–1741. PMID: 7505062

57. Klocko AD, Rountree MR, Grisafi PL, Hays SM, Adhvaryu KK, Selker EU. Neurospora importin α is required for normal heterochromatic formation and DNA methylation. PLoS Genet. 2015; 11(3): e1005083. doi: 10.1371/journal.pgen.1005083 PMID: 25793375

58. Galazka JM, Klocko AD, Uesaka M, Honda S, Selker EU, Freitag M. Neurospora chromosomes are organized by blocs of importin alpha-dependent heterochromatin that are largely independent of H3K9me3. Genome Res. 2016; 26(8):1069–1080. doi: 10.1101/gr.203182.115 PMID: 27260477

# APÊNDICE D

Artigo publicado no periódico *Biochemical Journal*, em 2017, onde é apresentada a estrutura cristalográfica do complexo NcImpα/NIT2-NLS .

*Biochemical Journal* (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

Research Article

# Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin-α

**Natália E. Bernardes[1,2], Agnes A.S. Takeda[1], Thiago R. Dreyer[1], Fernanda B. Cupertino[3], Stela Virgilio[3], Nelly Pante[2], Maria Célia Bertolini[3] and Marcos R.M. Fontes[1]**

[1]Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil; [2]Department of Zoology, Life Sciences Centre, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; [3]Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

**Correspondence:** Marcos R.M. Fontes (fontes@ibb.unesp.br)

The *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor belongs to the GATA transcription factor family and plays a fundamental role in the regulation of nitrogen metabolism. Because NIT-2 acts by accessing DNA inside the nucleus, understanding the nuclear import process of NIT-2 is necessary to characterize its function. Thus, in the present study, NIT-2 nuclear transport was investigated using a combination of biochemical, cellular, and biophysical methods. A complemented strain that produced an sfGFP–NIT-2 fusion protein was constructed, and nuclear localization assessments were made under conditions that favored protein translocation to the nucleus. Nuclear translocation was also investigated using HeLa cells, which showed that the putative NIT-2 nuclear localization sequence (NLS; $^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) was recognized by importin-α and that subsequent transport occurred via the classical import pathway. The interaction between the *N. crassa* importin-α (NcImpα) and the NIT-2 NLS was quantified with calorimetric assays, leading to the observation that the peptide bound to two sites with different affinities, which is typical of a monopartite NLS sequence. The crystal structure of the NcImpα/NIT-2 NLS complex was solved and revealed that the NIT-2 peptide binds to NcImpα with the major NLS-binding site playing a primary role. This result contrasts other recent studies that suggested a major role for the minor NLS-binding site in importin-α from the α2 family, indicating that both sites can be used for different cargo proteins according to specific metabolic requirements.

## Introduction

Fungal development involves functional coordination of regulatory genes, which are required for the proper utilization of nutritional sources according to environmental conditions. In filamentous fungi, quick responses to environmental changes are essential for survival and depend on the availability of carbon and nitrogen sources. Nitrogen metabolism is regulated by various genes, which are expressed according to the availability of nitrogen sources, and has been extensively studied in model filamentous fungi, such as *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans*. In general, filamentous fungi preferentially utilize ammonia and glutamine/glutamate as preferred nitrogen sources, and limitation of these sources leads to the synthesis of various enzymes required for the utilization of less-preferred nitrogen sources, such as nitrates, nitrites, purines, amino acids, and proteins [1]. This process is governed by a global regulatory system, termed nitrogen metabolic regulation, in which the NIT-2 and AreA transcription factors in *N. crassa* and *A. nidulans*, respectively, play central roles as the major regulators of nitrogen metabolism. In addition to NIT-2, the regulatory protein NMR (nitrogen metabolic regulation) acts in a negative manner. In the presence of ammonia and glutamine, NMR interacts with

Accepted Manuscript online: 20 October 2017
Version of Record published: 6 December 2017

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

NIT-2 [2] and prevents the synthesis of enzymes involved in the less-preferred nitrogen sources. In the presence of less-preferred nitrogen sources, NMR dissociates from NIT-2 allowing the expression of genes encoding enzymes involved in the usage of alternative nitrogen sources.

The NIT-2 protein has a single zinc-finger DNA-binding domain and is a member of the GATA family of transcription factors [3,4], a family only found in eukaryotic organisms. Only six GATA factors have been identified in the *N. crassa* genome [5], and NIT-2 is one of the most extensively characterized factors in this fungus. When the primary nitrogen source is not available (ammonia and glutamine), NIT-2 together with NIT-4 regulates the expression of the *nit-3* and *nit-6* genes, which encode enzymes for nitrate utilization [6].

The NIT-2 protein exerts its function by accessing DNA inside the nucleus. Thus, due to its size (1036 residues, 109.294 kDa) [3], active carrier-mediated transport is required to allow its translocation through the nuclear pore complex (NPC), which depends on additional carrier proteins or transport factors [7]. Different nuclear transport mechanisms have already been identified in filamentous fungus [8], including the classical nuclear import pathway. In this process, the Importin-α (Impα) protein recognizes a nuclear localization sequence (NLS) in a protein that will be transported and forms a complex with the transporter protein Importin-β (Impβ). Impβ interacts with the NPC and enables the passage of the trimeric complex into the nucleus, where the NLS-containing protein is released.

Characterizations of NLSs that are recognized by Impα have been performed by several researchers to better understand the mechanism of recognition in nuclear import pathways [7]. Some of those studies have focused on the NLS motifs, in which the NLS can be monopartite, binding preferentially to one site of Impα (major binding site — [9–11] or minor binding site — [12–14]), or bipartite, binding to both the major and minor binding sites of Impα [15–17]. The classical NLSs are the best-characterized sequences: K[K/R]X[K/R] and $KRX_{10-12}K[K/R]X[K/R]$, where [K/R] represents Lys or Arg and X represents any amino acid [7,18,19]. The non-classical sequences have variations in their basic residue content [12,14,20]. Other studies have investigated the relationship between phosphorylation of the NLS neighboring residues and the control of nucleocytoplasmic traffic [21,22]. The distribution of Impα among eukaryotes to indicate intra- and inter-specific characteristics that may influence nuclear import efficiency was also investigated [7,23,24].

The *N. crassa* Impα (NcImpα) was the first Impα in filamentous fungi to be structurally characterized [25], and its crystal structure was elucidated in complex with a classical NLS [26]. This protein is present as a single copy in the *N. crassa* genome and belongs to the Impα α1 family. Potential NLSs were identified in *N. crassa* transcription factors, including a sequence corresponding to a putative NLS in the NIT-2 transcription factor [27], suggesting that the nuclear import of NIT-2 may follow the classical nuclear import pathway.

In the present study, using a combination of functional, structural, and calorimetric techniques, we performed a comprehensive study that aimed to characterize the NIT-2 nuclear translocation. The results confirmed that the NLS sequence identified in the NIT-2 protein interacts with NcImpα and that this complex is imported into the cell nucleus.

# Materials and methods

## Strains and growth conditions

The *N. crassa* wild-type (FGSC#2489) and Δ*nit-2* (FGSC#11392 *a nit-2*::*hyg*) strains were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC) [28]. To complement a Δ*nit-2* mutant that produced the NIT-2–sfGFP protein, the strain was crossed with a *his-3* mutant strain (FGSC#6103 *A his-3*) to generate the Δ*nit-2 his-3* double-mutant strain. A 3288 bp DNA fragment (NCU09068) was amplified by PCR with the following primer pairs: C-sfGFP/mChNIT-2-F (5′-CTAGTCTAGACAAAACATGGCGGCCAGCACCACAACC-3′) and C-sfGFP/mChNIT-2-R (5′-CCGCTTAATTAATCCTCCTCCTCCTCCTCCGAGACTCATTGTGAGCCATTC-3′) using genomic DNA from the wild-type strain as a template. The purified DNA fragment was cloned into the *Xba*I/*Pac*I sites of the pTSL91-A plasmid (kindly provided by Dr L. Glass, UC Berkeley, CA, U.S.A.), leading to the plasmid pTSL91A-*nit*-2. This plasmid allows the constitutive expression of the C-terminus tagged NIT-2-sfGFP fluorescent fusion protein under the control of the *ccg-1* promoter. The plasmid was used to transform competent conidia from the Δ*nit-2 his-3* double-mutant strain, and the transformants were selected on media containing hygromycin and/or histidine. Correct integration at the *his-3* locus was confirmed by PCR. Progeny was selected by GFP fluorescence and screened for *nit-2* complementation by evaluating growth on N-free, N-free plus glutamine, and N-free plus $KNO_3$ media. The complemented strain was named Δ*nit-2 his-3*::p*ccg-1-nit-2-sfgfp* (Δ*nit-2 nit-2*$^+$).



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

The strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium (pH 5.8) [29] containing 2% sucrose. Conidia from 10-day cultures were collected, suspended in sterile water, and counted. For biomass analysis, $2 \times 10^7$ conidia/ml from the wild-type, Δ*nit-2*, and Δ*nit-2 nit-2*$^+$ strains were cultured either in 30 ml of N-free VM medium (VM without a nitrogen source) N-free plus 20 mM glutamine (Gln) or N-free plus 20 mM $KNO_3$ containing 2% sucrose at 30°C, 200 rpm for 24 h. Cultures were harvested and filtered, and the mycelia were dried at 98°C for 16 h. The biomass was expressed as the dry weight (g).

## Microscopic analysis

For microscopy, $1 \times 10^7$ conidia from the Δ*nit-2 nit-2*$^+$ strain were inoculated in liquid VM medium containing 1% sucrose in glass plates containing coverslips and incubated for 16 h at 30°C. After this time, the medium was replaced by the following media containing 1% sucrose: N-free VM medium for 1 h, N-free plus 20 mM glutamine for 1 h, and N-free plus 20 mM $KNO_3$ for 1 h at 30°C. Before transfer, the cells were washed in the same transfer media to remove traces of nitrogen. After incubation, mycelia on the coverslips were fixed [3.7% formaldehyde, 50 mM $NaH_2PO_4$ (pH 7.0), and 0.2% (v/v) Tween 80], washed with phosphate-buffered saline (PBS), and stained with 0.5 μg/ml DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) for 5 min. Fluorescence was visualized using a fluorescence microscope with excitation and emission wavelengths of 359 and 461 nm, respectively. The images were captured using a Zeiss AXIO Imager.A2 microscope coupled to an AxioCamMRm camera and processed using the AxioVision software, version 4.8.2.

## Nuclear import assay in digitonin-permeabilized HeLa cells

The NIT-2 NLS ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) [27] and the peptide inhibitor of nuclear import BIMAX1 (RRRRPRKRPLEWDEDEEPPRKRKRLW) [30] were custom-synthesized, conjugated to bovine serum albumin (BSA; GenOne), and labeled with the fluorescing dye Indocarbocyanine (Cy3 [Amersham-Biosciences]; NIT-2_NLS-BSA-Cy3 and BIMAX1-BSA-Cy3) by adding 0.1 M sodium bicarbonate, pH 9.3, to a solution containing Cy3 (1 mg/ml), and the NLS–BSA-conjugated peptides with an initial concentration of 2 mg/ml for 1 h at room temperature. The final concentration of the labeled peptides was quantified using a UV–Vis spectrophotometer.

The nuclear import assays were performed as described in Wu et al. [31]. Briefly, after the adherent HeLa cells (American Type Culture Collection) reached ∼70% of confluence, the cells were washed with import buffer and permeabilized with 20 μg/ml digitonin in import buffer at room temperature for 3 min [31]. Permeabilized cells were incubated with the import mixture containing Cy3-labeled NIT2_NLS-BSA or BIMAX1-BSA for 30 min at 37°C in the presence or absence of exogenous 20% cytosol (rabbit reticulocyte lysate, Promega) and an energy-regenerating system [0.4 mM ATP, 0.45 mM GTP, 4.5 mM phosphocreatine, and 18 U/ml phosphocreatine kinase (all from Sigma)] [31]. Dextran Texas Red (Invitrogen) was used as a control, to ensure that permeabilization of the plasma membrane, but not the nuclear membrane, had occurred. The cells were then washed with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde in import buffer, and mounted with the Prolong Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen) [31].

The cells were visualized using a Zeiss Axioplan 2 upright fluorescent microscope. To quantify the nuclear import of the fluorescently labeled cargo, the nuclear-to-cytoplasmic fluorescence signal ratio was determined. For this purpose, the intensity of the nuclear and cytoplasmic fluorescence was measured using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) according to Schedlich et al. [32].

## Protein expression and purification

The cDNA encoding the importin-α protein from *N. crassa* (NcImpα) was cloned into a pET28a expression vector and transformed into the *Escherichia coli* host strain Rosetta (DE3) pLysS (Novagen), as previously described [9]. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and eluted in an imidazole gradient of 15–300 mM. The protein was dialyzed in buffer containing 20 mM Tris–HCl (pH 8) and 100 mM NaCl and stored at −80°C.

## Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were carried out with a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare) to obtain the affinity constants related to the interaction of the NcImpα with the NIT-2 NLS peptide. The experiments were performed in duplicate at 20°C by titration of the peptide sample at a concentration of 800 μM in the cell containing the protein at 40 μM. Titrations consisted of twenty 2.0 μl injections at

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

240 s intervals with an 800 rpm homogenization speed. A separate control assay was performed with the titration of the peptide sample in the protein sample buffer, which was then subtracted from the experimental titrations. The data were processed with Origin 7.0.

### Crystallization, X-ray data collection, modeling, and refinement of the *N. crassa* importin-α with the NIT-2 NLS peptide

The crystallization experiments of NcImpα complexed with the NIT-2 NLS peptide were performed under the same conditions used for the complex NcImpα/SV40TAg NLS [33], namely, 0.2 mM Bicine (pH 8.5) and 20% (w/v) polyethylene glycol 6000. The crystallization assays were performed using MRC2 Well Crystallization plates and an Oryx4 system (Douglas Instruments) using 0.5 μl of the reservoir solution, 0.5 μl of a 5 mg/ml peptide solution, and 1 μl of a 12 mg/ml protein solution (1 : 8 protein : peptide molar ratio). After 1 week, crystals were obtained and subsequently subjected to X-ray diffraction experiments at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (MX2 beamline) using a PILATUS 2 M detector (Dectris) and the MXCube software. The data were indexed and integrated using HKL2000 [34]. The structure of the NcImpα/SV40 NLS complex (PDB: 4RXH) [26] with the cNLS peptide omitted was used for the initial refinement using PHENIX [35], leading to the observation of the electron density at both NcImpα sites. Modeling of the NIT-2 NLS peptides was performed using Coot [36], followed by refinement steps using PHENIX [35]. The final structure was verified with MolProbity [37], and figures were generated using PyMOL (http://www.pymol.org).

# Results

## NIT-2 complementation rescues the ability to metabolize nitrate

To confirm that NIT-2 is translocated into the nucleus, the Δ*nit-2 his-3*::p*ccg-1-nit-2-sfgfp* (Δ*nit-2 nit-2*$^+$) complemented strain was constructed, in which the *nit-2* genomic sequence from the wild-type strain was inserted into the

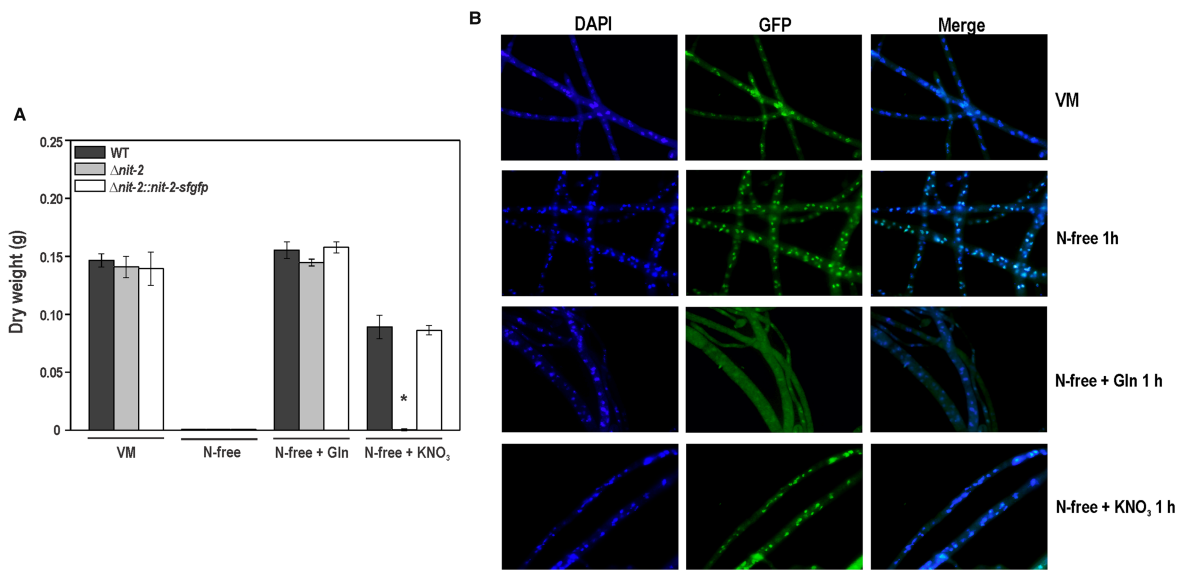



**Figure 1. Growth of the Δ*nit-2* strain and NIT-2 localization under different nitrogen conditions.**

(**A**) The wild-type, Δ*nit-2*, and Δ*nit-2*-complemented strains ($2 \times 10^7$ conidia/ml) were cultured in 30 ml of N-free VM medium, N-free + 20 mM Gln (glutamine), and N-free + 20 mM $KNO_3$ containing 2% sucrose at 30°C, 200 rpm for 24 h. Cultures were harvested and filtered, and the mycelia were dried at 98°C for 16 h. The biomass was expressed in dry weight (g). The results represent at least three independent experiments. An asterisk indicates a significant difference between the wild-type and other strains in the same conditions (*t*-test, $P < 0.01$). (**B**) Conidia ($10^7$ conidia) from the complemented strain were grown on coverslips in liquid VM medium containing 1% sucrose at 30°C for 16 h. After this period, mycelia were transferred to N-free medium for 1 h, N-free plus glutamine, and N-free plus $KNO_3$ medium for 1 h at 30°C. The mycelia were fixed in PBS with formaldehyde, the nuclei were stained with DAPI, and the fluorescence was visualized. Mycelium from liquid VM cultured for 16 h was used as the control. Fluorescence was evaluated using the microscope AXIO Imager.A2 (Zeiss) at a magnification of 100×. The results represent one of at least three independent experiments. Scale bar: 10 μm.



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

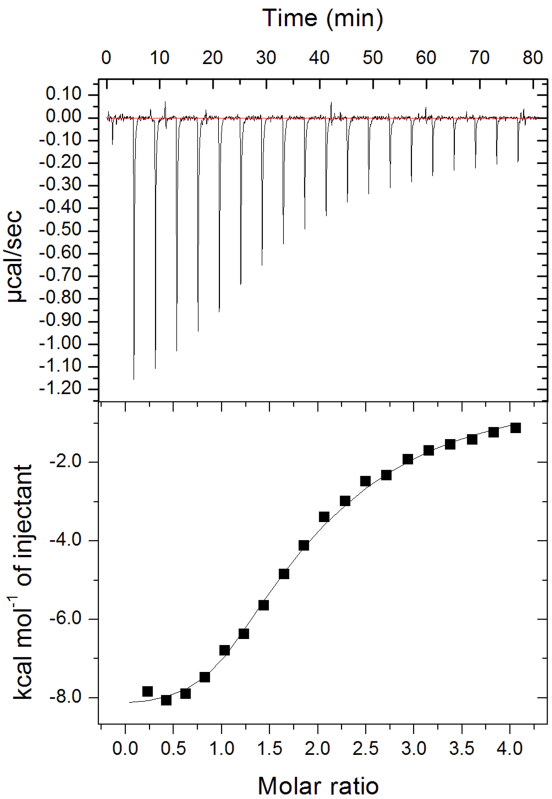



**Figure 2. Affinity of the NIT-2 NLS peptide for NcImpα.**

The upper panel shows the isothermal calorimetric data for NIT-2 NLS peptide binding to NcImpα. Raw power output (µcal/s) per unit time (min) of replicate titrations. The lower panel shows the integrated data (kcal $mol^{-1}$ of the injectant versus the molar ratio of the NIT-2 NLS to NcImpα). These data were obtained from the raw power output as the area underneath each peak, which was then corrected for baseline heat injections and NIT-2 NLS dilution heat and mixing. The solid line represents the best fit of the data.

*his-3* locus. The complemented strain produces the NIT-2–sfGFP protein. The Δ*nit-2* strain is not able to metabolize nitrate, nitrite, phenylalanine, and hypoxanthine as the sole source of nitrogen [2]. All strains (wild-type, Δ*nit-2*, and Δ*nit-2 nit-2*$^{+}$) grew well in VM medium (Figure 1A), which contained ammonium and nitrate as the nitrogen sources, and as expected, none of them grew in N-free medium. When cultured in N-free VM medium plus glutamine, a non-repressor nitrogen source, all strains showed similar growth, indicating that complementation did not affect the strain metabolism. When cultured in N-free VM medium plus nitrate, a repressor nitrogen source, the complemented strain restored the wild-type phenotype, confirming that the inability of the Δ*nit-2* strain to grow in nitrate as the sole source of nitrogen was due to the absence of the *nit-2* gene (Figure 1A).

**Table 1 Thermodynamic constants obtained for the binding of NLS peptides with NcImpα**

| | $K_d$ (µM) | Δ*H* (kcal/mol) | Δ*S* (cal/mol/deg) |
|---|---|---|---|
| NIT-2 NLS | 0.56 ± 0.32[1] | −6.64 ± 0.27[1] | −0.24[1] |
| | 9.90 ± 1.1[2] | −7.04 ± 0.20[2] | 4.58[2] |
| SV40 NLS | 1.23 ± 0.22[1] | −2.47 ± 0.06[1] | 18.3[1] |
| | 1.69 ± 0.46[2] | −3.21 ± 0.12[2] | 15.1[2] |

[1]Values obtained for site 1.
[2]Values obtained for site 2. SV40 NLS [14].

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

## NIT-2–GFP localizes to both the cytoplasm and the nucleus under specific nitrogen conditions

To analyze the cell localization of the NIT-2–sfGFP protein, the complemented strain was used, in which NIT-2 was produced as a C-terminal sfGFP-tagged fusion protein under the control of the constitutive *ccg-1* promoter. Conidia were germinated in liquid VM medium plus 1% sucrose for 16 h and then transferred to different nitrogen conditions. Under such conditions (VM, 16 h), the NIT-2–sfGFP protein localized to both the nucleus and the cytoplasm (Figure 1B). One hour after transfer to VM medium without a nitrogen source (N-free), the protein was detected predominantly in the nucleus, as expected under such conditions. The protein localization was also observed in an N-free VM medium, but in the presence of either glutamine or nitrate, which are the preferred and non-preferred nitrogen sources, respectively. In the presence of glutamine, NIT-2–sfGFP no longer accumulated in the nucleus, but strongly accumulated in the nucleus when mycelium was transferred to a medium containing nitrate (Figure 1B).

## NIT-2 interacts with Impα and is translocated to the nucleus

NIT-2 translocation to the nucleus was confirmed by analyzing the interaction between NcImpα and a peptide corresponding to the putative nuclear localization sequence (NLS) of the NIT-2 ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) [27].

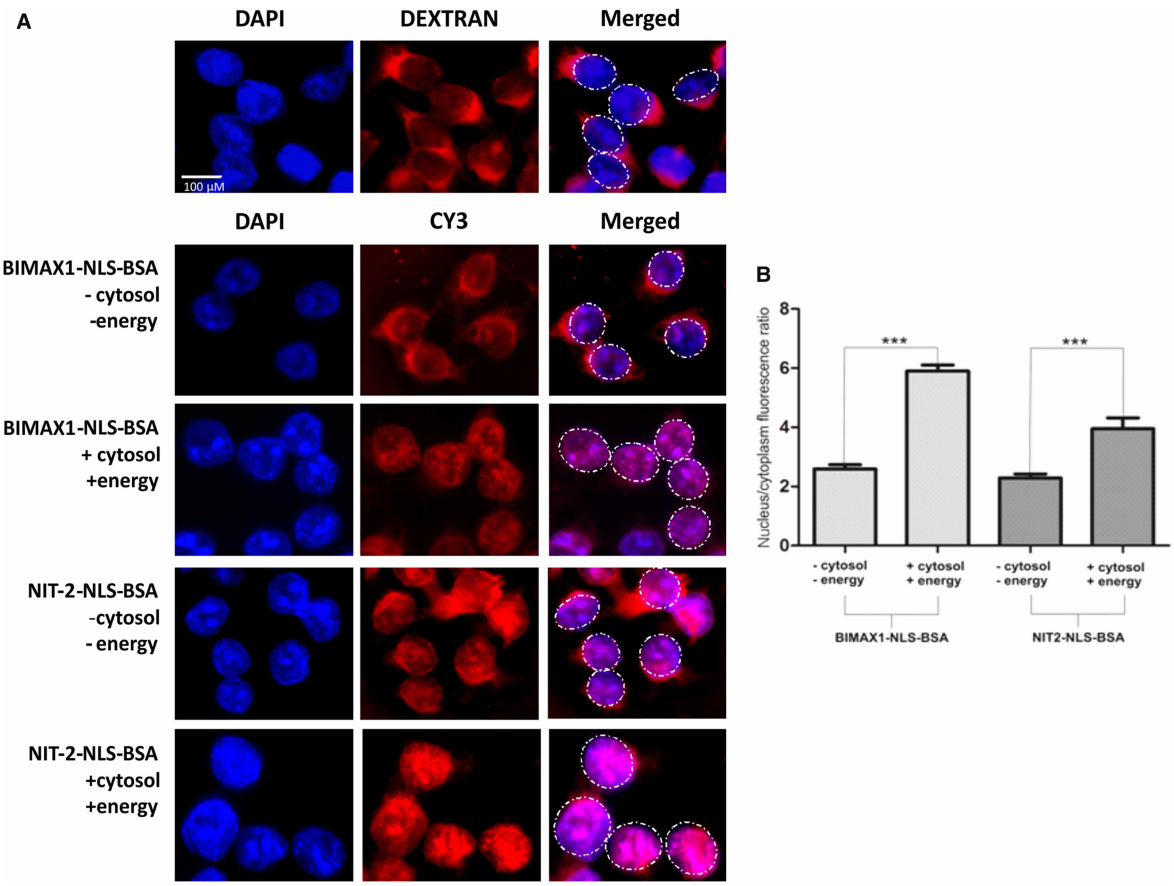



**Figure 3. Nuclear import assay with Impα and NLS and NLS-like peptides.**

(**A**) Cy3-labeled NIT-2-NLS-BSA and BIMAX1-BSA were assayed in digitonin-permeabilized HeLa cells in the presence or absence of cytosol and an energy-regenerating system. A control experiment with 70 kDa dextran fluorescently labeled with Texas Red was performed to verify that the plasma membrane, but not the nuclear envelope, was permeabilized by digitonin. Cells were visualized by fluorescence microscopy, and representative images of three independent experiments are shown. (**B**) Bar diagram of the nuclear–cytoplasmic fluorescence ratio for the experimental conditions shown in **A**. Quantification was performed using ImageJ. The mean value and standard error of the mean scored from 150 to 200 cells for each condition from three independent experiments are shown.***$P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test.



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

This interaction was analyzed by ITC to obtain the dissociation constant and thermodynamic values. A molar ratio of 1 : 20 (Impα/NIT2-NLS) was used, resulting in a sigmoidal isotherm (Figure 2) with the stoichiometric point close to 1.7, which suggests that part of the protein is degraded or not correctly folded, but these data are consistent with other Impα-NLS titrations previously described [26,38–40]. Data analysis was performed considering two models: (i) two identical and independent binding sites and (ii) two different independent binding sites [41]. The best fit was chosen by Akaike's and Bayesian information criteria as previously proposed by Sant'Anna et al. [42] which consider not just the $\chi^2$ but also the number of parameters of each model. The best fit was obtained when considering two different independent binding sites, which resulted in the specific dissociation constants ($K_d$) of 0.56 ± 0.32 μM (site 1) and 9.9 ± 1.1 μM (site 2) (Table 1). The $K_d$ for site 1 showed a similar value to those obtained for other NLS peptides with high affinity for Impα, which is generally attributed to the major for Impα-binding site [26,38]. For site 2, the $K_d$ value was an order of magnitude lower compared with site 1, being comparable to values described for minor binding sites in mammalian Impα proteins [26,38].

A nuclear import assay using permeabilized HeLa cells was performed to confirm that the sequence identified as an NLS in the NIT-2 protein sequence [27] could promote the entry of NIT-2 into the cell nucleus (Figure 3A,B). Digitonin-permeabilized cells were incubated with the NIT-2_NLS-BSA-Cy3 complex in the

**Table 2 X-ray data collection and refinement for NcImpα/NIT-2 NLS structure**

| | |
|---|---|
| Values in parentheses are for the highest resolution shell | |
| Diffraction data statistics | |
| Unit cell (Å) | 45.0, 63.7, 183.6 |
| Space group | $P2_12_12_1$ |
| Resolution (Å) | 45.9–2.5 (2.6–2.5)[1] |
| Unique reflections | 18 973 (1810)[1] |
| Completeness (%) | 99.71 (97.36)[1] |
| Multiplicity | 5.9 (5.9) |
| $R_{merge}$[2] (%) | 26.3 (72.0) |
| Mean $I/\sigma(I)$ | 5.10 (1.92) |
| $R_{cryst}$[3] (%) | 17.95 (23.81) |
| $R_{free}$[4] (%) | 24.61 (32.54) |
| Number of non-hydrogen atoms | 3440 |
| Protein | 3160 |
| Peptide | 118 |
| Water | 175 |
| Ramachandran favored[5] | 98 |
| Outliers (%) | 0.23 |
| Average *B*-factor (Å$^2$)[6] | 43.30 |

[1]Numbers in parentheses represent the values of the higher resolution shell. CC1/2 values are referent at the higher resolution shell.
[2]$R_{merge} = \Sigma_{hkl}(\Sigma_i(|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl}\rangle|))/\Sigma_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices *hkl* and $hI(hkl)_i$ is the mean intensity of this reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$ [34].
[3]$|R_{cryst} = \Sigma_{hkl}(||F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}||)/|F_{obs_{hkl}}|$, where $|F_{obs}|$ and $|F_{calc}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.
[4]$R_{free}$ is equivalent to $R_{cryst}$ but was calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process.
[5]Calculated with the program PROCHECK [43].
[6]Calculated based on the Luzzati plot with the program SFCHECK [44].

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

presence of exogenous cytosol containing nuclear factors, including Impα, and an energy-regenerating system. As the negative control, permeabilized cells were incubated with NIT-2_NLS-BSA-Cy3 without cytosol or the energy-regenerating system. The results showed that nuclear import of the NIT-2_NLS-BSA-Cy3 complex occurred only in cells incubated with cytosol and energy, which contained nuclear transport factors.

A positive control assay with BIMAX1-BSA-Cy3 was performed to compare the nuclear import efficiency of NIT-2_NLS-BSA-Cy3 (Figure 3B). The quantification showed a higher nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio in the cells incubated with BIMAX1-BSA-Cy3 under permissive conditions (presence of cytosol and energy) in comparison with NIT-2_NLS-BSA-Cy3 in the same conditions (Figure 3B).

## Structure of NcImpα complexed with the NIT-2 NLS peptide

The X-ray diffraction data collection and refinement statistics of the NcImpα/NIT-2 NLS complex are summarized in Table 2. The final structure of the NcImpα/NIT-2 NLS complex showed a conserved concave conformation that was present in the previous NcImpα structure (Figure 4A; [26]) and other Impα structures [7]. Indeed, the superposition of the Cα of the NcImpα/SV40 NLS and NcImpα/NIT-2 NLS structures presented a root mean square deviation (RMSD) value of only 0.29 Å, showing that the proteins have the same conformation.

The electronic density was observed in an extended conformation for fragments of the NIT-2 NLS peptide at both binding sites of NcImpα (Figure 4B,C). The electron density was well defined for seven residues of the

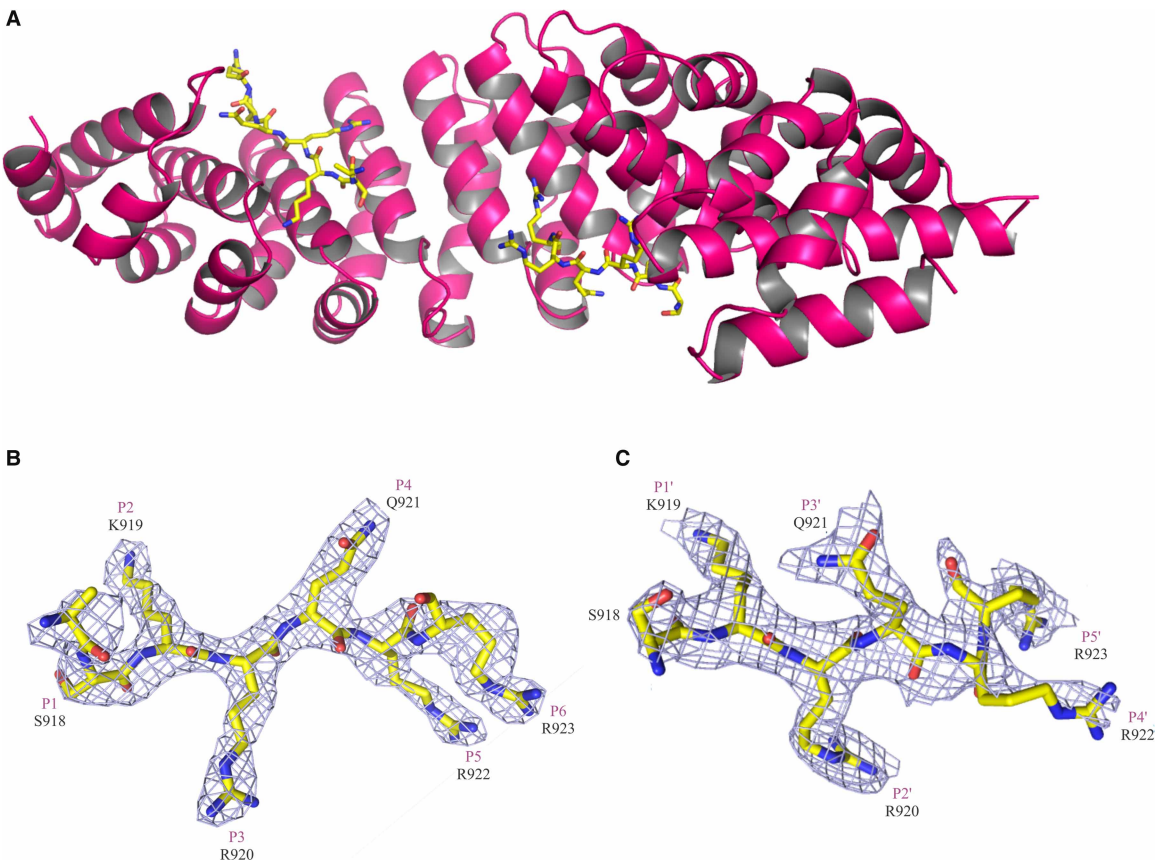



**Figure 4. Crystal structure of the NcImpα/NIT-2 NLS complex.**

(**A**) Overall structure of the Impα/NIT-2 NLS complex. Impα is shown as a ribbon diagram, and the NLS peptides at the major and minor binding sites are shown in the stick representation. (**B**) Electron density map (coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$) of the NIT-2 NLS peptide at the major site region of Impα (contoured at 1.2 s.d.). (**C**) Electron density map (coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$) of the NIT-2 NLS peptide at the minor site region of Impα (contoured at 1.2 s.d.). The main peptide residues are labeled at their corresponding binding positions.



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

peptide ($^{917}$ASKRQRR$^{923}$) at the major NLS-binding site and six residues ($^{918}$SKRQRR$^{923}$) at the minor NLS-binding site, which are occupied at positions $P_0$–$P_6$ and $P_0'$–$P_5'$, respectively. The residues that were bound to the core of the major NLS-binding site (residues 919–922; positions $P_1$–$P_5$) had lower average *B*-factors (33.4 Å$^2$) compared with Impα (the average B-factor for the entire Impα was 43.3 Å$^2$), where the residues of positions $P_2$ and $P_3$ had the lowest *B*-factors (28.2 and 32.1 Å$^2$, respectively) and the largest number of interactions between the NLS side-chains and Impα residues (Figure 5A). The residues that were bound to the core of the minor NLS-binding site (residues 919–922; positions $P_1'$–$P_4'$) had higher average *B*-factors (47.7 Å$^2$) compared with the entire protein. The residues at positions $P_1'$ and $P_2'$ had the lowest *B*-factors (36.5 and 33.4 Å$^2$, respectively) and the largest number of interactions between the NLS side-chains and Impα residues (Figure 5B). The superposition of the Cα atoms between NIT-2 and the SV40 TAg NLS peptides yielded an RMSD of 0.11 Å for the major binding site ($P_1$–$P_5$) and 0.12 Å for the minor binding site ($P_1'$–$P_4'$). The co-ordinates and structure factors of NcImpα/NIT-2 NLS have been deposited in the PDB under accession code 5VQI.

# Discussion

## NIT-2 translocation to the nucleus

The functional assays performed in the present study confirm the nuclear localization of the *N. crassa* NIT-2 transcription factor under conditions that favor protein translocation to the nucleus, including N-free medium and a medium containing a non-preferred nitrogen source such as nitrate. The cellular location of NIT-2 is regulated by the NMR protein, which binds to NIT-2 in the presence of a preferred nitrogen source, such as glutamine, and maintains the cytoplasmic localization of the protein [45]. Microscopic analysis showed that in *N. crassa*, the protein is localized in the nucleus when conidia were germinated under nitrogen starvation. In addition, using a nuclear import assay with semipermeabilized HeLa cells, we confirmed that the NIT-2 NLS sequence ($^{915}$TISSKRQRRHSKS$^{927}$) is required for the nuclear transport of a chimeric protein containing this sequence. The assays with HeLa cells showed efficient transport of the NIT-2_NLS-BSA-Cy3 complex into the nucleus when cytosol and energy were added, confirming that the NIT-2 sequence is a signal for nuclear transport. The comparison between the assay performed with NIT-2_NLS-BSA-Cy3 and the BIMAX1-BSA-Cy3 positive control also showed that the binding and import of the NIT-2 NLS by Impα is less efficient than when BIMAX1 is used. This result is consistent with previous studies that showed that BIMAX1 is an NLS-like peptide designed to inhibit nuclear import due to its high affinity for Impα [46], thus acting as an inhibitor of Impα since it prevents the binding of other NLSs with lower affinities. Furthermore, since rabbit reticulocyte lysate was used as the source of cytosolic factors for both import assays, the lower fluorescence ratio obtained in the assay with NIT-2_NLS-BSA-Cy3 might be due to the presence of a mammalian Impα in the import solution instead of the fungal Impα.

## NIT-2 binds to *N. crassa* Impα as a classical monopartite NLS

In a previous study, a region with the characteristics of a classical NLS on the NIT-2 protein was identified, suggesting that the transport of NIT-2 into the nucleus could be mediated by Impα [27]. This NLS region was used in the present study to perform affinity assays using ITC techniques, demonstrating the presence of two non-identical and independent binding sites for the interaction between the peptide and the receptor. The first region of the interaction displays high affinity with NcImpα, where its value is higher than the classical SV40 TAg NLS [26] (Table 1) and comparable with the XPG1 NLS [38], which is the peptide with the highest affinity to be measured using this technique. In contrast, the NIT-2 NLS peptide binds to the second site with an affinity that is 3-fold weaker than the affinity to the first site. ITC assays using different NLS peptides and Impα have been performed, yielding dissociated constants from $K_d$ ∼0.1 μM to ∼50 μM [10,12,26,38,39,47–51], but in the majority of these studies the dissociated constants display values ∼0.1–1 μM for the major NLS-binding site and 1–10 μM for the minor NLS-binding site, which are are according to the present study. The crystallographic structure of the NcImpα/NIT-2 NLS complex showed that the peptides are well defined at both NcImpα sites (major and minor NLS-binding sites) with the usual features of a monopartite NLS compared with other Impα/NLS complexes (Table 3), and the NIT-2 NLS can be cataloged as a classical monopartite NLS from class 1, according to Kosugi et al. [52]. In addition, the *B*-factors of the peptides that were bound to the major binding site were lower compared with the minor binding site, which also indicated that the first site had a higher affinity to the peptide than the second site.

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

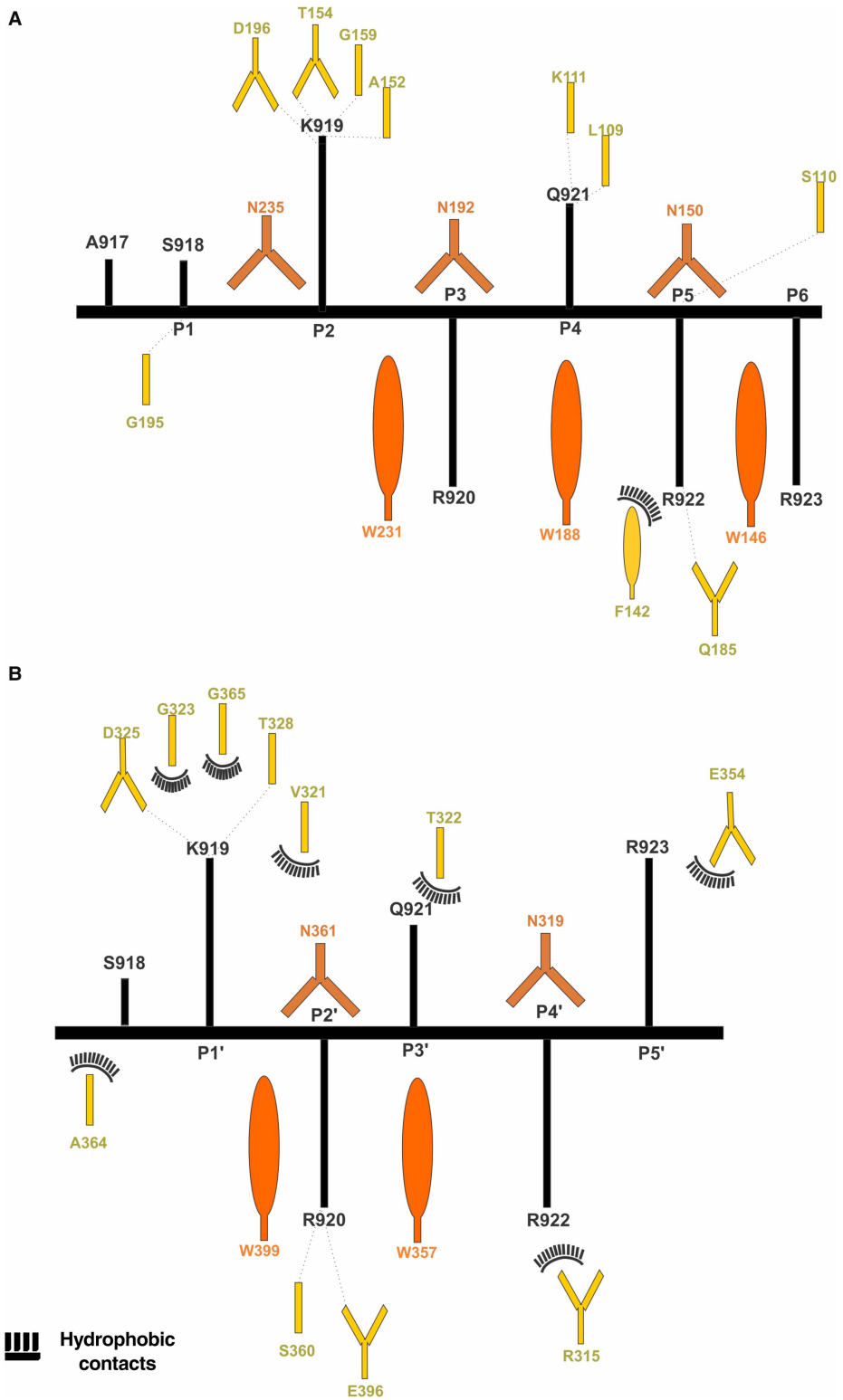



**Figure 5. Schematic diagram of the interactions between the NIT-2 NLS peptide and the minor and major binding sites of Impα.**

The peptide backbone is drawn in black with the residues identified by the one-letter code. The Impα side-chain residues interacting with the peptide are indicated with their names and different colors. The polar contacts are shown with dashed lines, and the hydrophobic contacts are indicated by arcs with radiating spokes.



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

**Table 3 Binding of monopartite NLS and NLS-like peptides to specific binding pockets in Impα**
NcImpα/SV40 [26]; OsImpα/SV40, OsImpα/A89, and OsImpα/B54 [13]; ScImpα/c-Myc [53]; MmImpα/yCBP80 [46]; MmImpα/XPG1 [38]; MmImpα/BIMAX1 [46]. The bold face positions correspond to residues of the minor and major binding sites.

| | | | | | | | Minor site | | | | | | | | | | | | Major site | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | $P_1'$ | $P_2'$ | $P_3'$ | $P_4'$ | $P_5'$ | | | | | | | | $P_1$ | $P_2$ | $P_3$ | $P_4$ | $P_5$ | $P_6$ | | | | | | |
| NcImpα/NIT-2 | | | T | I | S | S | **K** | **R** | **Q** | **R** | R | H | | | S | | K | S | | | A | **S** | **K** | **R** | **Q** | **R** | R | | | |
| NcImpα/SV40 | | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | | | | | | | | | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | | | |
| OsImpα/SV40 | | | P | P | K | K | **K** | **R** | **K** | **V** | G | G | | | | | | S | P | P | **K** | **K** | **K** | **R** | **K** | V | G | | |
| OsImpα/A89 | V | H | K | T | V | L | G | **K** | **R** | **K** | **Y** | M | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OsImpα/B54 | | | | S | V | L | G | **K** | **R** | **K** | **R** | **H** | P | | K | | V | | | | | | | | | | | | | |
| ScImpα/c-Myc | | | | | P | A | A | **K** | **R** | **V** | **K** | L | D | | | | | | P | A | **A** | **K** | **R** | **V** | **K** | L | D | | |
| MmImpα/yCBP80 | | | | | | N | R | **K** | **R** | **R** | **G** | D | FDEDNYRDFRPR | | | | | | | | M | **P** | **K** | **R** | **Q** | **R** | I | P | | |
| MmImpα/XPG1 | | | | | | S | L | **K** | **R** | **K** | **R** | | | | | | | | | | S | **L** | **K** | **R** | **K** | **R** | | | | |
| MmImpα/BIMAX1 | | | | | | P | R | **K** | **R** | **P** | **L** | E | W | | EWDEDEEP | | | | | | P | **R** | **K** | **R** | **K** | **R** | L | W | | |

Classical monopartite NLSs contain a K(K/R)X(K/R) motif [7], which binds to $P_2$–$P_5$ positions of Impα. Thus, the NIT-2 NLS meets all of the requirements of a classical monopartite NLS [52]. Regarding the $P_4$ position, the majority of Impα/NLS structures [38] contain K/R residues, but the NIT-2 NLS contains a Gln residue at the $P_4$ position (Figure 5). However, a comparison between NIT-2 (Gln at $P_4$) and other NLS sequences (Arg at $P_4$) reveals that the Gln or Arg residues display the same interactions with Impα, including two hydrogen bonds [38,46]. The same binding arrangement at the major binding site was observed for the complex MmImpα/yCBP80_cNLS, a classical bipartite NLS (Table 3; [46]). These structural data are compatible with the high affinity of the NIT-2 NLS for the major binding site, being similar to the high-affinity NLS peptides that have been previously described [38,46].

Regarding the minor binding site, the presence of KR residues at positions $P_1'$ and $P_2'$ is very important (only two exceptions are found in the literature [19,46]), but the basic residues at positions $P_0'$, $P_3'$ and $P_4'$ are also favorable [40] since the affinity of the receptor at the minor binding site is increased, as seen in the optimized bipartite NLS BIMAX1 [46]. Although the NIT-2 NLS contains a basic residue (K/R) in only the $P_1'$/$P_2'$/$P_4'$ positions, the Gln residue at position $P_3'$ forms favorable hydrophobic interactions with the receptor. Other potential NLS peptides from the *N. crassa* proteins also contain Gln residues near the basic residues of the Lys and Arg residues [27]. Therefore, the KRQR sequence in the NIT-2 NLS confers an affinity that is comparable with that of the minor sites of other monopartite NLSs, particularly those found in the Impα proteins from the α2 family, where the major binding site plays a key role in NLS recognition.

## NIT-2 is an example of a protein that binds to importin-α from the α1 family

The specificities of the Impα/NLS interactions have been extensively discussed [7] since these features could be used as important tools to find other potential NLS peptides in nuclear proteins or even for the development of targets to inhibit nuclear import or the design of peptides for drug delivery [54]. The import efficiency of Impα from different classes might vary when interacting with the same substrate [23,52], and the NLS configurations, including the N-terminal residues, could define the differential binding profile of a peptide [14]. Two classes of 'atypical' NLSs (classes 3 and 4) were considered as minor site-specific and another class (class 5) was considered as 'plant-specific' [52], where their N-termini play a key role in the recognition by Impα. Indeed, crystallographic and calorimetric studies using Impα from rice [13] and *N. crassa* [26], which belong to the α1 family, showed that NLS peptides bind using different modes or with different affinities at the minor binding site compared with Impα from the α2 family.

In contrast with these previous results [13,14,26], which highlighted the role of the minor binding site for Impα from the α1 family, the present study demonstrated that the NIT-2 NLS binds to a high affinity to the major binding site of NcImpα. Thus, the combination of previous studies with the present study shows that both the minor and major binding sites play an essential role in the translocation of different proteins,

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654

conferring specificity for the organisms that have a single-copy gene that encodes Impα, unlike the mammalian genome that encodes seven Impα paralogs [55,56].

# Conclusions

Biochemical, cellular, biophysical, and crystallographic techniques were used to characterize the nuclear transport of the *N. crassa* NIT-2 protein. We demonstrated that the nuclear transport of NIT-2 occurs under conditions that favor protein translocation to the nucleus. Nuclear import was investigated using fungal conidia and HeLa cells, where the putative NIT-2 NLS sequence could be recognized by Impα and transported into the nucleus via the classical nuclear import pathway. Calorimetric assays of the interaction between Impα and the NIT-2 NLS demonstrated that there are two binding sites with different affinities, which is typical of monopartite NLS sequences. Indeed, the NcImpα/NIT-2 NLS structure revealed that the NIT-2 peptide binds to NcImpα with the major NLS-binding site playing a major role. This result is somehow different from previous studies, which suggested that the minor NLS-binding site may play a major role in Impα from the α1 family, leading us to suggest that both sites have a role in the transport of different proteins for organisms with only a single Impα.

## Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; Impα, Importin-α; Impβ, Importin-β; ITC, isothermal titration calorimetry; NcImpα, *N. crassa* importin-α; NLS, nuclear localization sequence; NMR, nitrogen metabolic regulation; PBS, phosphate-buffered saline; RMSD, root mean square deviation; sfGFP, superfolder green fluorescent protein; VM, Vogel's minimal.

## Author Contribution

N.E.B., M.R.M.F., A.A.S.T., and M.C.B. designed the experiments and wrote the manuscript with input from other authors. N.E.B. performed protein expression and purification, nuclear import assays, crystallographic, and isothermal titration calorimetric assays. F.B.C. and S.V. performed the protein localization assays in *N. crassa* under supervision of M.C.B. N.P. supervised the nuclear assays. T.R.D. performed isothermal titration calorimetric processing analyses. M.R.M.F. supervised the project.

## Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil [FAPESP - 2013/24705-3] and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC; RGPAS 412254-11 and RGPIN 227926-11 to N.P.]. M.R.M.F. is a CNPq Research Fellow [300596/2013-8]. N.E.B. is a FAPESP Research Fellow [2014/10289-0].

## Acknowledgements

We acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil).

## Competing Interests

The Authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

# References

1 Marzluf, G.A. (1981) Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* **45**, 437–461 PMID:6117784
2 Pan, H., Feng, B. and Marzluf, G.A. (1997) Two distinct protein-protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **26**, 721–729 https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6041979.x
3 Fu, Y.H. and Marzluf, G.A. (1990) nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5331–5335 https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5331
4 Fungi, D.B. (2017) NCU09068: nitrogen catabolic enzyme regulatory protein. http://fungidborg/fungidb/app/record/gene/NCU09068 (August 2017)
5 Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D. et al. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 1–108 https://doi.org/10.1128/MMBR.68.1.1-108.2004
6 Marzluf, G.A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 17–32 PMID:9106362
7 Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S. et al. (2016) Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J. Mol. Biol.* **428**, 2060–2090 https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023
8 Markina-Inarrairaegui, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araujo-Bazan, L., Fernandez-Martinez, J., Flores, J.A. et al. (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3874–3886 https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0262



© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

9 Takeda, A.A.S., de Barros, A.C., Chang, C.-W., Kobe, B. and Fontes, M.R.M. (2011) Structural basis of importin-α-mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80. *J. Mol. Biol.* **412**, 226–234 https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.038
10 Cutress, M.L., Whitaker, H.C., Mills, I.G., Stewart, M. and Neal, D.E. (2008) Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J. Cell Sci.* **121**, 957–968 https://doi.org/10.1242/jcs.022103
11 Chen, M.-H., Ben-Efraim, I., Mitrousis, G., Walker-Kopp, N., Sims, P.J. and Cingolani, G. (2005) Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin α. *J. Biol. Chem.* **280**, 10599–10606 https://doi.org/10.1074/jbc.M413194200
12 Lott, K., Bhardwaj, A., Sims, P.J. and Cingolani, G. (2011) A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin α1. *J. Biol. Chem.* **286**, 28160–28169 https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228007
13 Chang, C.-W., Counago, R.L.M., Williams, S.J., Boden, M. and Kobe, B. (2012) Crystal structure of rice importin-α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant. Cell* **24**, 5074–5088 https://doi.org/10.1105/tpc.112.104422
14 Chang, C.-W., Couñago, R.M., Williams, S.J., Boden, M. and Kobe, B. (2013) The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site inplantnuclear import factor importin-α. *Plant Signal. Behav.* **8**, e25976 https://doi.org/10.4161/psb.25976
15 Fontes, M.R.M., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I. and Kobe, B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-α. *J. Biol. Chem.* **278**, 27981–27987 https://doi.org/10.1074/jbc.M303275200
16 Roman, N., Christie, M., Swarbrick, C.M.D., Kobe, B. and Forwood, J.K. (2013) Structural characterisation of the nuclear import receptor importin alpha in complex with the bipartite NLS of Prp20. *PLoS ONE* **8**, e82038 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082038
17 Kirby, T.W., Gassman, N.R., Smith, C.E., Pedersen, L.C., Gabel, S.A., Sobhany, M. et al. (2015) Nuclear localization of the DNA repair scaffold XRCC1: uncovering the functional role of a bipartite NLS. *Sci. Rep.* **5**, 13405 https://doi.org/10.1038/srep13405
18 Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. et al. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**, 383–392 https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00079-0
19 Fontes, M.R.M., Teh, T. and Kobe, B. (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-α. *J. Mol. Biol.* **297**, 1183–1194 https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3642
20 Matsuura, Y. and Stewart, M. (2005) Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J.* **24**, 3681–3689 https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600843
21 Fontes, M.R.M., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D.A. et al. (2003) Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-α. *Biochem. J.* **375**, 339–349 https://doi.org/10.1042/bj20030510
22 Róna, G., Borsos, M., Ellis, J.J., Mehdi, A.M., Christie, M., Környei, Z. et al. (2014) Dynamics of re-constitution of the human nuclear proteome after cell division is regulated by NLS-adjacent phosphorylation. *Cell Cycle* **13**, 3551–3564 https://doi.org/10.4161/15384101.2014.960740
23 Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H. et al. (1999) Evidence for distinct substrate specificities of importin α family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7782–7791 https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7782
24 Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T. and Adam, S.A. (2004) Importin α: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* **14**, 505–514 https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.016
25 Takeda, A.A., Freitas, F.Z., Angelo, J.M., Natalia, E.B., Fernandes, C.A., Carlos, A.H.F. et al. (2013) Biophysical characterization of the recombinant importin-α from *Neurospora crassa*. *Protein Pept. Lett.* **20**, 8–16 https://doi.org/10.2174/092986613804096829
26 Bernardes, N.E., Takeda, A.A.S., Dreyer, T.R., Freitas, F.Z., Bertolini, M.C., Fontes, M.R.M. et al. (2015) Structure of importin-α from a filamentous fungus in complex with a classical nuclear localization signal. *PLoS ONE* **10**, e0128687 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128687
27 Goncalves, R.D., Cupertino, F.B., Freitas, F.Z., Luchessi, A.D. and Bertolini, M.C. (2011) A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.007963 https://doi.org/10.1074/mcp.M111.007963
28 McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**, 245–262 https://doi.org/10.1016/S0065-2164(03)01010-4
29 Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42–43
30 Kosugi, S., Hasebe, M., Entani, T., Takayama, S., Tomita, M. and Yanagawa, H. (2008) Design of peptide inhibitors for the importin α/β nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem. Biol.* **15**, 940–949 https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.019
31 Wu, W.W.H., Sun, Y.-H. and Pante, N. (2007) Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virol. J.* **4**, 49 https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-49
32 Schedlich, L.J., Le Page, S.L., Firth, S.M., Briggs, L.J., Jans, D.A. and Baxter, R.C. (2000) Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin β subunit. *J. Biol. Chem.* **275**, 23462–23470 https://doi.org/10.1074/jbc.M002208200
33 Bernardes, N.E., Takeda, A.A.S., Freitas, F.Z., Bertolini, M.C. and Fontes, M.R.M. (2014) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin-α from *Neurospora crassa*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 501–504 https://doi.org/10.1107/S2053230X14005068
34 Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76066-X
35 Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N. et al. (2010) *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 https://doi.org/10.1107/S0907444909052925
36 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of *Coot*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 https://doi.org/10.1107/S0907444910007493
37 Chen, V.B., Arendall, III, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J. et al. (2010) *Molprobity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 https://doi.org/10.1107/S0907444909042073
38 de Barros, A.C., Takeda, A.A.S., Dreyer, T.R., Velazquez-Campoy, A., Kobe, B. and Fontes, M.R.M. (2016) Structural and calorimetric studies demonstrate that xeroderma pigmentosum type G (XPG) can be imported to the nucleus by a classical nuclear import pathway via a monopartite NLS sequence. *J. Mol. Biol.* **428**, 2120–2131 https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.019
39 Sankhala, R.S., Lokareddy, R.K. and Cingolani, G. (2016) Divergent evolution of nuclear localization signal sequences in herpesvirus terminase subunits. *J. Biol. Chem.* **291**, 11420–11433 https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724393

© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society

Biochemical Journal (2017) **474** 4091–4104
https://doi.org/10.1042/BCJ20170654


40 Róna, G., Marfori, M., Borsos, M., Scheer, I., Takács, E., Tóth, J. et al. (2013) Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2495–2505 https://doi.org/10.1107/S0907444913023354

41 Freire, E., Schön, A. and Velazquez-Campoy, A. (2009) Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials. *Methods Enzymol.* **455**, 127–155 https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04205-5

42 Sant'Anna, R., Gallego, P., Robinson, L.Z., Pereira-Henriques, A., Ferreira, N., Pinheiro, F. et al. (2016) Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat. Commun.* **7**, 10787 https://doi.org/10.1038/ncomms10787

43 Laskowski, R.A., Rullmannn, J.A.C., MacArthur, M.W., Kaptein, R. and Thornton, J.M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486 https://doi.org/10.1007/BF00228148

44 Vaguine, A.A., Richelle, J. and Wodak, S.J. (1999) SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Cryst.* **D55**, 191–2015 https://doi.org/10.1107/S0907444998006684

45 Wong, K.H., Hynes, M.J. and Davis, M.A. (2008) Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot. Cell* **7**, 917–925 https://doi.org/10.1128/EC.00076-08

46 Marfori, M., Lonhienne, T.G., Forwood, J.K. and Kobe, B. (2012) Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin-α. *Traffic* **13**, 532–548 https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x

47 Ge, Q., Nakagawa, T., Wynn, R.M., Chook, Y.M., Miller, B.C. and Uyeda, K. (2011) Importin-α protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* **286**, 28119–28127 https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237016

48 Wirthmueller, L., Roth, C., Fabro, G., Caillaud, M.-C., Rallapalli, G., Asai, S. et al. (2015) Probing formation of cargo/importin-α transport complexes in plant cells using a pathogen effector. *Plant J.* **81**, 40–52 https://doi.org/10.1111/tpj.12691

49 Virgilio, S., Cupertino, F.B., Bernardes, N.E., Freitas, F.Z., Takeda, A.A.S., de Mottos Fontes, M.R. et al. (2016) Molecular components of the *Neurospora crassa* pH signaling pathway and their regulation by pH and the PAC-3 transcription factor. *PLoS ONE* **11**, e0161659 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161659

50 Nardozzi, J., Wenta, N., Yasuhara, N., Vinkemeier, U. and Cingolani, G. (2010) Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin α5. *J. Mol. Biol.* **402**, 83–100 https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.013

51 Miyatake, H., Sanjoh, A., Murakami, T., Murakami, H., Matsuda, G., Hagiwara, K. et al. (2016) Molecular mechanism of HIV-1 Vpr for binding to importin-α. *J. Mol. Biol.* **428**, 2744–2757 https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.003

52 Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., , Tomita, M. et al. (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α. *J. Biol. Chem.* **284**, 478–485 https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200

53 Conti, E. and Kuriyan, J. (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α. *Structure* **8**, 329–338 https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00107-6

54 Yashiroda, Y. and Yoshida, M. (2003) Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* **10**, 741–748 https://doi.org/10.2174/0929867033457791

55 Mason, D.A., Stage, D.E. and Goldfarb, D.S. (2009) Evolution of the metazoan-specific importin α gene family. *J. Mol. Evol.* **68**, 351–365 https://doi.org/10.1007/s00239-009-9215-8

56 Pumroy, R.A., Ke, S., Hart, D.J., Zachariae, U. and Cingolani, G. (2015) Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin α isoforms 3 and 7. *Structure* **23**, 374–384 https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.015




© 2017 The Author(s). Published by Portland Press Limited on behalf of the Biochemical Society