

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**AGNES ALESSANDRA SEKIJIMA TAKEDA**

**ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de pós graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

BOTUCATU – SP  
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**AGNES ALESSANDRA SEKIJIMA TAKEDA**

**ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de pós graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

**Orientador: PROF. ADJUNTO MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES**

BOTUCATU – SP  
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Takeda, Agnes Alessandra Sekijima.

Estudos estruturais com a importina / Agnes Alessandra Sekijima Takeda.  
– Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências  
de Botucatu 2009

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Assunto CAPES: 20205007

1. Biofísica molecular    2. Bioquímica

CDD 575

Palavras-chave: Cristalografia de raios-X; Importação nuclear; Importina- $\alpha$ ;  
Ku70; NLS; TMNLS; T52NLS

## AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Adjunto Marcos Roberto de Mattos Fontes, pela orientação, confiança, paciência e experiência transmitida ao longo desse projeto.
- À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado direto (proc. 04/04659-8).
- Ao Professor Doutor Bostjan Kobe e equipe, na Universidade de Queensland, Austrália, pela colaboração, propiciando condições para o aprimoramento de técnicas, com o desenvolvimento de parte desse trabalho em seu laboratório.
- Aos Professores Adjuntos Paulo Eduardo Martins Ribolla e Ivan de Godoy Maia pela confiança, disponibilizando infra-estrutura de seus laboratórios para que a maior parte do projeto fosse realizada no Instituto de Biociências.
- Ao Doutor Antônio Sérgio Kimus Braz pela colaboração e paciência para ensinar técnicas de laboratório.
- Aos colegas e amigos dos departamentos de Física e Biofísica e Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela cooperação, troca de conhecimentos, tristezas e muitos risos.
- Aos amigos sempre presentes em pensamento e coração.
- Aos meus pais, Nobuko Sekijima Takeda e Agêo Osamu Takeda e irmão, Alex Keith Sekijima Takeda pelo suporte emocional e financeiro, confiança e paciência.

“Joy lies in the fight, in the attempt, in the suffering involved, not in the victory itself”

Mahatma Gandhi

## RESUMO

A Importina- $\alpha$  (ImpA) participa da via clássica de importação nuclear reconhecendo seqüências de localização nuclear (NLS) presentes em proteínas que apresentam atividades no núcleo. Almejando mais informações a respeito do mecanismo de reconhecimento para importação nuclear, nesse trabalho foram efetuados experimentos de expressão, purificação e cristalografia de raios-X da ImpA de *Mus musculus* com o peptídeo NLS da proteína de reparo de DNA Ku70 e peptídeos TMNLS, T52NLS, frutos de bibliotecas de peptídeos NLS específicos para isoformas da ImpA de *Mus musculus* e *Homo sapiens*, respectivamente. O peptídeo TMNLS, conforme esperado, ligou-se à ImpA de maneira similar ao NLS do antígeno T da SV40. Já o peptídeo não clássico T52NLS, obtido de uma biblioteca de peptídeos NLS para a isoforma 5 de *Homo sapiens*, acomodou-se ao sítio principal da ImpA de maneira satisfatória, indicando que essa seqüência também apresenta afinidade à isoforma de *Mus musculus*. Complementar à esse resultado, foi constatada a ligação do T52NLS ao sítio secundário da ImpA e, pela primeira vez, foi observada a ligação de um peptídeo monopartido de maneira alternativa, paralela à ImpA, ao contrário da posição anti-paralela, convencional. Surpreendentemente, resultados do complexo ImpA-NLS de Ku70 indicaram-no como monopartido, e ligando-se a ImpA de maneira similar à versão fosforilada do peptídeo NLS do antígeno T da SV40. Posições específicas nos sítios de ligação foram confirmadas como essenciais, bem como resíduos da ImpA conservados nessas regiões, indicando a importância das interações intermoleculares nesses sítios. Adicionalmente foram obtidas informações relevantes, como a importância de resíduos de prolina nos NLSs e a não obrigatoriedade de regiões altamente básicas para o reconhecimento de um NLS pela ImpA.

**Palavras-chave:** Importina- $\alpha$ , importação nuclear, NLS, cristalografia de raios-X, Ku70, TMNLS, T52NLS.

## ABSTRACT

The Importin- $\alpha$  (ImpA) plays a role in the classic nuclear import pathway, recognizing proteins that contain nuclear localization sequences (NLS), which have activities in the nucleus. Aiming additional information about the mechanism of nuclear import recognition, in this work, the expression, purification and X-ray crystallography experiments were performed with ImpA from *Mus musculus* and NLS peptides from the DNA repair protein Ku70 and the peptides TMNLS and T52NLS obtained from NLS peptide libraries specific for ImpA isoforms of *Mus musculus* e *Homo sapiens*, respectively. The peptide TMNLS, as expected, bound to the ImpA in a similar way to SV40 antigen T NLS. However, the non classical peptide T52NLS, obtained from a NLS peptide library for isoform 5 of *Homo sapiens*, which accommodation into the major site of ImpA was acceptable, showed that this sequence has affinity to the *Mus musculus* isoform. There was also the binding of T52NLS in the minor site of ImpA and for the first time the binding of a monopartite peptide in an alternative way was observed. It was parallel to the ImpA in spite of the conventional non-parallel position. Surprisingly the results of the ImpA- Ku70NLS complex indicated the peptide as monopartite and bounded to the ImpA similarly to the phosphorylated version of the SV40 antigen T NLS.

Specific positions in the binding sites were confirmed as essentials, and conserved residues of ImpA in these regions were highlighted, indicating the importance of intermolecular interactions in these sites. Additional information was obtained like the importance of proline residues in NLS sequences and the non-mandatory highly basic regions for a NLS recognizing by ImpA.

**Keywords:** Importin- $\alpha$ , nuclear import, NLS, X-ray crystallography, Ku70, TMNLS, T52NLS.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.Importação para o núcleo celular dependente da importina. ....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Seqüências de localização nuclear (NLS). ....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Estruturas cristalográficas da Importina-<math>\alpha</math>. ....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Arquitetura.....	16
1.3.2. Estruturas nativas.....	18
1.3.3. Estruturas complexadas com NLS. ....	19
<b>2.OBJETIVOS. ....</b>	<b>22</b>
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS. ....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.Expressão de importina-<math>\alpha</math> truncada (70-529).....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.Purificação por cromatografia líquida.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.Peptídeos NLS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.Cristalização da importina-<math>\alpha</math> truncada (70-529).....</b>	<b>28</b>
<b>3.5.Coleta e processamento de dados de difração de raios-X. ....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas de ImpA nativas. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.7.Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas de ImpA complexadas com peptídeos NLS. ....</b>	<b>31</b>
<b>3.8.Análise das estruturas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.9. Busca de seqüências nos bancos de dados e alinhamento.....</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.Expressão da importina-<math>\alpha</math> truncada (70-529).....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.Purificação da importina-<math>\alpha</math> truncada (70-529) por cromatografia líquida.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.Cristalização da ImpA (70-529). ....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Co-cristalização da ImpA (70-529) com peptídeos NLS. ....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.Coleta de dados de difração de raios-X da importina-<math>\alpha</math> nativa .....</b>	<b>40</b>
<b>4.6.Coleta e processamento de dados de difração de raios-X dos complexos .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7.Elucidação e refinamento/modelagem da importina-<math>\alpha</math> nativa.....</b>	<b>42</b>
<b>4.8.Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas do complexos ImpA e peptídeos NLS. ....</b>	<b>44</b>
<b>4.9. Estrutura da ImpA nos complexos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.10.Ligação do peptídeo NLS de Ku70. ....</b>	<b>51</b>
<b>4.11.Ligação do peptídeo monopartido TMNLS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.12.Ligação do peptídeo monopartido T52NLS. ....</b>	<b>57</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.Importina - <math>\alpha</math> e o peptídeo contaminante. ....</b>	<b>61</b>

<b>5.2. Comparação do modo de ligação dos peptídeos NLS Ku70 e SV40 fosforilado.....</b>	<b>62</b>
5.2.1.Sítio de ligação principal. ....	62
5.2.2.O suposto “ <i>linker</i> ” para a Ku70.....	64
<b>5.3.Comparação do modo de ligação do peptídeo TMNLS com peptídeos NLS.....</b>	<b>68</b>
5.3.1.Sítio de ligação principal (S <sub>1</sub> ). ....	69
5.3.2.Sítio de ligação secundário (S <sub>2</sub> )......	70
<b>5.4.Comparação do modo de ligação do peptídeo T52NLS com peptídeos monopartidos.</b>	<b>72</b>
5.4.1.Sítio de ligação principal (S <sub>1</sub> ). ....	72
5.4.2 Sítio de ligação secundário (S <sub>2</sub> )......	74
<b>5.5. Resíduos chave da Importina - <math>\alpha</math> na importação nuclear.....</b>	<b>75</b>
<b>5.6. A busca pelo NLS ideal. ....</b>	<b>80</b>
<b>6.CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>6.1. Resíduos da ImpA chave para reconhecimento de NLS.....</b>	<b>84</b>
<b>6.2. Peptídeos NLS. ....</b>	<b>84</b>
<b>6.3. Sítios de ligação de NLS. ....</b>	<b>85</b>
<b>6.5.Linker. ....</b>	<b>85</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo para um ciclo de importação de proteínas nucleares dependente da importina.....	15
Figura 2 –Representação em diagrama de fitas da estrutura da ImpA (PDB-1IAL), elucidada por Kobe, em 1999. Em destaque encontram-se os motivos ARM e o domínio IBB.....	17
Figura 3 – Posições de ligação na ImpA nos sítios principal (ARM 2-4) e secundário (ARM 5-8). Resíduos de ácido aspártico e glutâmico (vermelho), triptofano (verde), arginina (azul) e asparagina (roxo) da ImpA que constituem as regiões de ligação, encontram-se em destaque para definição das posições P1-P6 no sítio principal e P1'-P4' no sítio secundário. ....	18
Figura 4 – Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada. ....	23
Figura 5 – Peptídeos selecionados para experimentos de co-cristalização.....	27
Figura 6 – Método para cristalização: <i>hanging drop</i> (gota suspensa).....	28
Figura 7- Verificação da expressão e purificação da Importina - $\alpha$ em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).....	34
Figura 8 – Verificação da purificação da ImpA em gel de poliacrilamida à 12%(SDS-PAGE).....	35
Figura 9 –Purificação da Importina - $\alpha$ por cromatografia de afinidade. Pico na leitura à 280nm indica a eluição da ImpA.....	36
Figura 10- Purificação da ImpA por cromatografia de troca iônica. Pico na leitura à 280nm indica a eluição da ImpA.....	36
Figura 11 – Cristais da ImpA nativa, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,7 x 0,2 x 0,2mm.....	37
Figura 12 – Cristais nativos de ImpA, obtidos após purificação da amostra em cromatografia de troca iônica. Foram obtidos em 0,60M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,6 x 0,2 x 0,2mm.....	38
Figura 13 – Cristais de ImpA na presença de peptídeos NLS; À esquerda, cristais do complexo ImpA Ku70 obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,4 x 0,1 x 0,1mm.; À direita, cristais do complexo ImpA-TMNLS, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,4 x 0,2 x 0,2mm.....	39

Figura 14 – Cristais do complexo ImpA-T52NLS, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,3 x 0,2 x 0,1mm.....	39
Figura 15 – Mapa de densidade eletrônica $3 F_{obs}  - 2 F_c $ ; Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação principal. ....	43
Figura 16 – Mapa de densidade eletrônica $3 F_{obs}  - 2 F_c $ da ImpA nativa com o peptídeo. Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação principal.....	43
Figura 17 – Mapa de densidade eletrônica $3 F_{obs}  - 2 F_c $ da ImpA com o peptídeo TMNLS. Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação principal.....	45
Figura 18 – Mapa de densidade eletrônica $3 F_{obs}  - 2 F_c $ da ImpA com o peptídeo TMNLS. Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação secundário....	45
Figura 19 – Representação do complexo ImpA-TMNLS em diagrama de fitas. Em destaque motivos ARM e localização dos sítios de ligação de NLS.....	50
Figura 20 – Representação em diagrama de fitas da Importina $-\alpha$ truncada (72-497) com peptídeo NLS de KU70 (rosa). Hélices em rosa indicam sitio de ligação principal.....	51
Figura 21 – Peptídeo NLS Ku70. A) Mapa de densidade eletrônica $ F_o - F_c $ , $s = 1.2$ para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos do mesmo; B) interações entre resíduos da ImpA e Ku70. ....	52
Figura 22- Peptídeo NLS Ku70 em $S_2$ , <b>não</b> foi adicionado ao modelo final .Mapa de densidade eletrônica $ F_o - F_c $ , $s = 1.2$ gerado na ausência do peptídeo.....	53
Figura 23 – Representação em diagrama de fitas da Importina $-\alpha$ truncada (72-497) com peptídeo TMNLS. Hélices em rosa indicam sitio de ligação principal e em azul o sítio secundário.....	54
Figura 24 – Peptídeo TMNLS no sitio de ligação principal .A) Mapa de densidade eletrônica $ F_o - F_c $ , $s = 1.2$ para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e TMNLS.....	55
Figura 25 – Peptídeo TMNLS no sitio de ligação secundário .A) Mapa de densidade eletrônica $ F_o - F_c $ , $s = 1.2$ para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e TMNLS.....	56
Figura 26 – Representação em diagrama de fitas da Importina $-\alpha$ truncada (72-497) com peptídeo T52NLS. Hélices em rosa indicam sitio de ligação principal e em azul o sítio secundário.....	57

Figura 27 – Peptídeo T52NLS no sitio de ligação principal .A)Mapa de densidade eletrônica $ F_o-F_c $ , $s= 1.2$ para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e T52NLS.....	58
Figura 28 – Peptídeo T52NLS no sitio de ligação secundário. .Mapa de densidade eletrônica $ F_o-F_c $ , $\sigma= 1.2$ para o peptídeo, indicando ocupação pelos resíduos do peptídeo na forma convencional (laranja) e alternativo (amarelo).....	59
Figura 29 – Peptídeo T52NLS no sitio de ligação secundário .A)Mapa de densidade eletrônica $ F_o-F_c $ , $s= 1.2$ para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e T52NLS.....	60
Figura 30 – Superposição dos peptídeos NLS Ku70 (rosa), SV40P (cinza) e nucleoplasmina (azul), em que estão indicados resíduos que ocupam S1 (P2-P5) e S2 (P1'-P4'). .....	63
Figura 31 – Superfície da ImpA com o peptídeo Ku70. Em destaque regiões polares (roxo) e apolares (branco) da proteína. ....	64
Figura 32 – Resíduos que interagem com os peptídeos NLS .A-Ku70 (rosa); B-SV40P (cinza). Em verde estão estacados resíduos $W^{273}$ e $P^{308}$ , com os quais os NLS interagem, adotando as conformações observadas.....	65
Figura 33 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e TMNLS (verde) , indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.....	69
Figura 34 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e TMNLS (verde), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S2.....	71
Figura 35 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e T52NLS (amarelo) , indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.....	72
Figura 36 – Superposição entre peptídeos NLS PLSCR (rosa) e T52NLS (amarelo) , indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.....	73
Figura 37 – Superposição entre peptídeos NLS PLSCR (rosa) e T52NLS (amarelo) , indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.....	75
Figura 38 – Alinhamento da ImpA. Em destaque resíduos conservados essenciais para o reconhecimento de NLSs.....	77
Figura 39 – Alinhamento da ImpA. Em destaque resíduos conservados essenciais para o reconhecimento de NLSs.....	78
Figura 40 – Inibidores específicos para ImpA (KOSUGI et al., 2008).....	79
Figura 41 – Diagrama destacando posições chave em $S_1$ e resíduos conservados da ImpA. Em laranja encontram-se resíduos que participam de interações polares; em amarelo interações hidrofóbicas. Linhas cheias no NLS indicam posições essenciais; linhas tracejadas indicam ocupação opcional.....	81

Figura 42 – Diagrama destacando posições chave em S<sub>2</sub> e resíduos conservados da ImpA. Em laranja encontram-se resíduos que participam de interações polares; em cinza, resíduos da ImpA que não apresentam interações comuns a todos NLS estudados por cristalografia; em amarelo interações hidrofóbicas. Linhas cheias no NLS indicam posições essenciais; linhas tracejadas indicam ocupação opcional..... 82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variações de concentração de agente precipitante e pH para cristalização.....	29
Tabela 2- Códigos de acesso das seqüências empregadas no alinhamento.....	33
Tabela 3 – Condições de cristalização em que foram obtidos os melhores cristais de ImpA (70-529) e seus complexos com peptídeos NLS.....	39
Tabela 4 – Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X.....	40
Tabela 5 – Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X.....	41
Tabela 6 – Resíduos cujas cadeias laterais foram removidas devido ausência de densidade eletrônica para as mesmas.....	46
Tabela 7 – Estatísticas de refinamento.....	47
Tabela 8 – Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS do sítio de ligação principal. Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos. ....	48
Tabela 9 – Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS e ImpA , nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos. ....	49
Tabela 10 – Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS monopartidos do sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos. ....	65
Tabela 11 – Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS bipartidos nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos.....	66
Tabela 12 – Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS monopartidos e ImpA , nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos.....	67
Tabela 13 – Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS bipartidos e ImpA, nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos.....	68
Tabela 14- Peptídeos NLS e sítios de ligação na ImpA [ $S_1$ ( $P_2$ - $P_5$ ) e $S_2$ ( $P_1'$ - $P_4'$ )]. Posições sinalizadas completamente em amarelo correspondem a resíduos hidrofóbicos; hachuras amarelas indicam resíduos anfipáticos.; resíduos coloridos indicam posições mais importantes; resíduos em cinza não se ligam ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da ImpA elucidadas por cristalografia.....	70

## ABREVIATURAS

ARM – Motivo do tipo armadillo.

CAS - exportina *Cellular apoptosis susceptibility*.

cMyc – fator de transcrição, cuja mutação ou super expressão freqüentemente leva ao câncer.

CN - versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

Cdc2 – Proteína ciclina.

CK2 – Proteína quinase.

D.O. – Densidade ótica.

DNase – Desoxirribonuclease.

DTT – Dithiotreitol.

GTP – Guanosina trifosfato

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

ImpA – Importina  $\alpha$ .

ImpA (70-529) –Importina- $\alpha$  truncada N-terminal.

ImpB –Importina- $\beta$ .

IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo.

Ku70 – Proteína que participa do reparo de DNA.

LB – Luria Bertani (meio de cultura).

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio.

N<sub>1</sub>N<sub>2</sub> – Proteína ligadora de histona.

NLS – Seqüência de localização nuclear.

NPC – Complexo do poro nuclear.

Nup50 – Proteína nucleoporina.

P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub> – Posições do sítio de ligação principal da importina- $\alpha$  .

P<sub>1</sub>'-P<sub>4</sub>' - Posições do sítio de ligação secundário da importina- $\alpha$ .

pCN – Versão não fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

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

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil.

Ran BP1 – Guanosina trifosfato BP1

Ran GAP – Guanosina trifosfato GAP

Ran GTP – Guanosina trifosfato Ran

RB – Proteína retinoblastoma.

RNAse – Ribonuclease.

S<sub>1</sub> – Sítio de ligação principal.

S<sub>2</sub> – Sítio de ligação secundário.

SV40 – Antígeno T do vírus símio 40.

SV40P- Versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

T52NLS - peptídeo específico para ImpA de *H.sapiens*, isoforma 5.

TCEP – Tris-[2-carboxietil]-fosfina.

TMNLS - peptídeo específico para ImpA de *M. musculus*, isoforma 2 .

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Importação para o núcleo celular dependente da importina.

A manutenção das atividades de uma célula eucarionte é dependente de uma intensa comunicação entre núcleo e citoplasma. A replicação do DNA e a transcrição do RNA são separadas da síntese protéica e sistemas metabólicos do citoplasma através do envoltório nuclear (COOK et al., 2007). Essa segregação permite uma regulação precisa de processos celulares como expressão gênica, sinalização celular, e ciclo celular por meio do transporte bidirecional entre núcleo e citoplasma. Essa separação física, entretanto, requer maquinário molecular para o transporte dessas moléculas de uma interface a outra (LANGE et al., 2007).

Complexos de poro nuclear (*nuclear pore complexes*, NPCs), inseridos na bicamada lipídica nuclear, são os únicos sítios de intercâmbio entre o núcleo e citoplasma. Eles provêem um canal de difusão de 8 a 10 nm para íons e para proteínas pequenas e neutras. Para maior parte do transporte de macromoléculas, geralmente apresentando mais de 40k Da, há dependência de mediadores para passarem para o núcleo (SOROKIN et al., 2007).

O ciclo de importação nuclear tem como base uma série de interações coordenadas, que precisam de constante regulação. Sinais específicos contribuem para o controle desses eventos, dentre os quais as seqüências de localização nuclear (NLS) (STEWART, 2007).

O processo de importação das proteínas com NLS pode ser dividido em várias etapas (Figura 1). Inicialmente, no citoplasma, a importina- $\beta$  (ImpB) liga-se à importina- $\alpha$  (ImpA) deslocando o domínio auto-inibitório (*Importin beta binding* - IBB) (KOBÉ, 1999) da mesma. Após a formação do heterodímero (importina- $\alpha/\beta$ ), ocorre a ligação da proteína a ser

importada, via reconhecimento do NLS (IMAMOTO et al., 1995; GÖRLICH et al., 1995). A ImpB então, ancora o complexo aos filamentos citoplasmáticos do NPC e ocorre o transporte através do poro em virtude dessas interações (GÖRLICH et al., 1996; MOORE & BLOBEL, 1993).

No núcleo, o complexo proteína-substrato desacopla-se devido a ligação da proteína GTPase Ran (Ran-GTP) na subunidade  $\beta$  da importina, alterando sua conformação e liberando o IBB da ImpA. Esse domínio então passa a competir com a NLS da proteína importada promovendo uma diminuição de afinidade da carga, facilitando a liberação da mesma em virtude do mecanismo auto-inibitório (KOBÉ, 1999). Uma otimização do processo de desacoplamento da carga e reciclagem da ImpA ocorre com auxílio da nucleoporina Nup50, que liga-se a uma das regiões de ligação do NLS e uma porção C-terminal da importina, em virtude de maior afinidade com a mesma (MATSUURA & STEWART, 2005).

A reciclagem de ambas as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da importina ocorre de maneira independente através do NPC (GÖRLICH et al., 1996; MOORE & BLOBEL, 1993). Enquanto a ImpB volta para o citoplasma na forma de complexo com a RanGTP, a ImpA é exportada ativamente ao formar um complexo com a exportina CAS (*Cellular apoptosis susceptibility*) complexada a RanGTP. A CAS, com uma afinidade maior que o Nup50, remove-o da ImpA (MATSUURA & STEWART, 2005) e, formando o complexo ImpA-CAS-RanGTP, segue rumo ao citoplasma.

Uma vez de volta ao citoplasma, a RanGAP e RanBP1 (que removem RanGTP da ImpB), estimulam a hidrólise do GTP ligado a Ran da ImpB e CAS. Dessa maneira, ocorre liberação das importinas para um novo ciclo (STEWART, 2007).

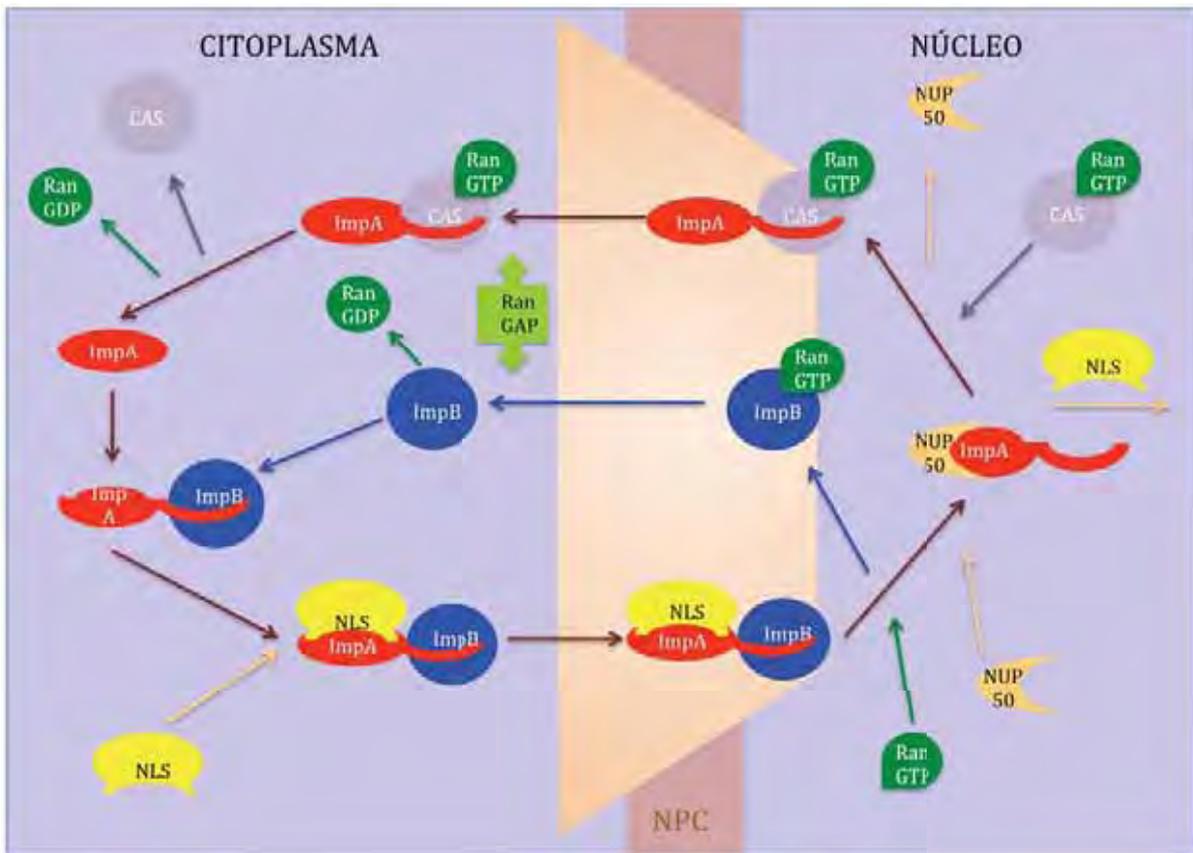


Figura 1 - Modelo para um ciclo de importação de proteínas nucleares dependente da importina, de acordo com STEWART, 2007.

## 1.2. Sequências de localização nuclear (NLS).

As NLS são sequências localizadas comumente na porção C-terminal das proteínas que por si só são suficientes para designar uma proteína a ser importada para o núcleo (DINGWALL et al., 1982). Os sinais melhor caracterizados são denominados clássicos (cNLS), apresentando um ou mais grupos de aminoácidos básicos, em que duas classes podem ser destacadas. As cNLS monopartidas apresentam como consenso, até o presente momento, a sequência K/RKXR/K sendo exemplificada pela NLS do antígeno T do vírus símio 40 (SV40),  $^{126}\text{PKKKRRV}^{132}$ , (LANFORD & BUTEL, 1984; LANFORD et al., 1986); e as cNLSs bipartidas, apresentando como consenso KRX10-12KRXX e exemplificada pela

NLS da nucleoplasmina,  $^{155}\text{KRPAATKKAGQAKKKK}^{170}$  (DINGWALL & LASKEY, 1991).

Contudo a presença exclusiva de cargas positivas não satisfazem completamente o reconhecimento de um NLS e definição de uma seqüência consenso precisa. Resíduos hidrofóbicos em posições específicas, como verificado no NLS de *c-Myc*, (CONTI & KURIYAN, 2000), bem como resíduos que conferem maior mobilidade as NLS, parecem fatores que contribuem para o reconhecimento e afinidade das NLS (CHEN et al., 2005).

Além desses parâmetros, foi constatada que a ligação da ImpA à diferentes NLSs pode ser modulada pela fosforilação da proteína (JANS et al., 1991; JANS & HÜBNER, 1996), e pela interação com outras proteínas citoplasmáticas (NADLER et al., 1997). O mecanismo de fosforilação então, pode acentuar ou inibir o transporte nuclear dependente de NLSs. Sendo assim, este mecanismo tem-se mostrado como o principal no controle do transporte nuclear de muitas proteínas, fato que parece ser comum às células de eucariontes, desde organismos unicelulares até mamíferos (JANS et al., 1991; JANS & HÜBNER, 1996).

### **1.3. Estruturas cristalográficas da Importina- $\alpha$ .**

#### **1.3.1. Arquitetura.**

A importina- $\alpha$  (ImpA) é responsável pelo reconhecimento inicial da proteína a ser importada. Apresenta aproximadamente 60 kDa e consiste de dois domínios funcionais. Um pequeno domínio N-terminal básico (chamado de domínio IBB) denominado o sítio de ligação da subunidade  $\beta$  da importina (GÖRLICH et al., 1996; MOORE & BLOBEL, 1993); e o domínio de ligação de NLS (KOBÉ, 1999), que compreende a maior parte da proteína,

consistindo de dez motivos repetidos denominados de *motifs* “armadillo” (ARM) (GÖRLICH et al., 1994) (Figura 2).

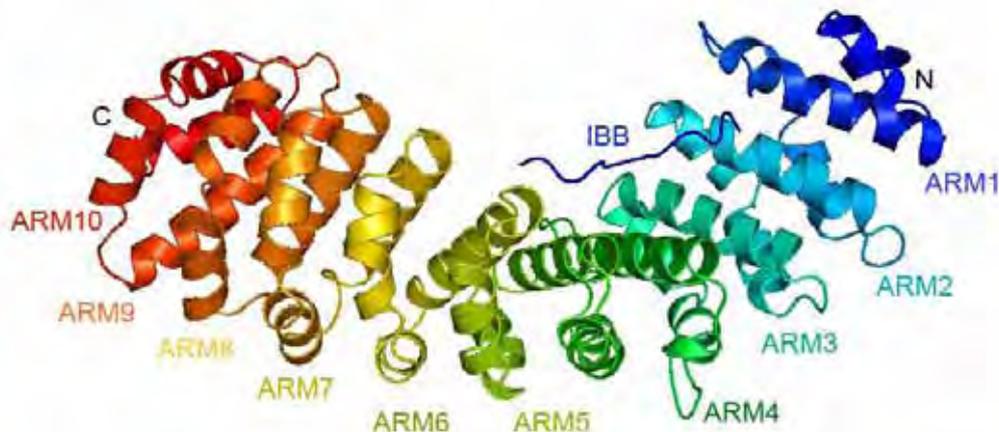


Figura 2 –Representação em diagrama de fitas da estrutura da ImpA (PDB-1IAL) elucidada por Kobe, em 1999. Em destaque encontram-se os motivos ARM e o domínio IBB.

Os motivos ARM apresentam três hélices alfa, denominadas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> (KOBE, 1999) compostas por cerca de 40 resíduos. As repetições apresentam em torno de trinta graus de rotação entre si, resultando em uma molécula alongada e torcida. As hélices H<sub>3</sub> da porção côncava da molécula apresentam resíduos de triptofano e asparagina conservados, cercados por resíduos ácidos, o que confere sítios de ligação com características hidrofóbicas e eletrostáticas (CONTI & KURIYAN, 2000).

Duas regiões de ocupação por NLS foram determinadas e denominadas sítio principal (S<sub>1</sub>) e secundário (S<sub>2</sub>). O primeiro é caracterizado por apresentar arcabouços entre ARMS 1 a 4, que definem as posições P<sub>1</sub> a P<sub>6</sub> ocupadas por um NLS. O segundo sítio, que compreende ARMS 6 a 8, apresenta regiões de ligação similares as de S<sub>1</sub>, o que possibilitou a denominação das posições P<sub>1</sub>' a P<sub>4</sub>' como regiões de ocupação por NLS em S<sub>2</sub>. Ambas são importantes para reconhecimento de NLS, em que o S<sub>1</sub> tem prioridade de ligação em relação à S<sub>2</sub>. (FONTES et al., 2000) (Figura 3).

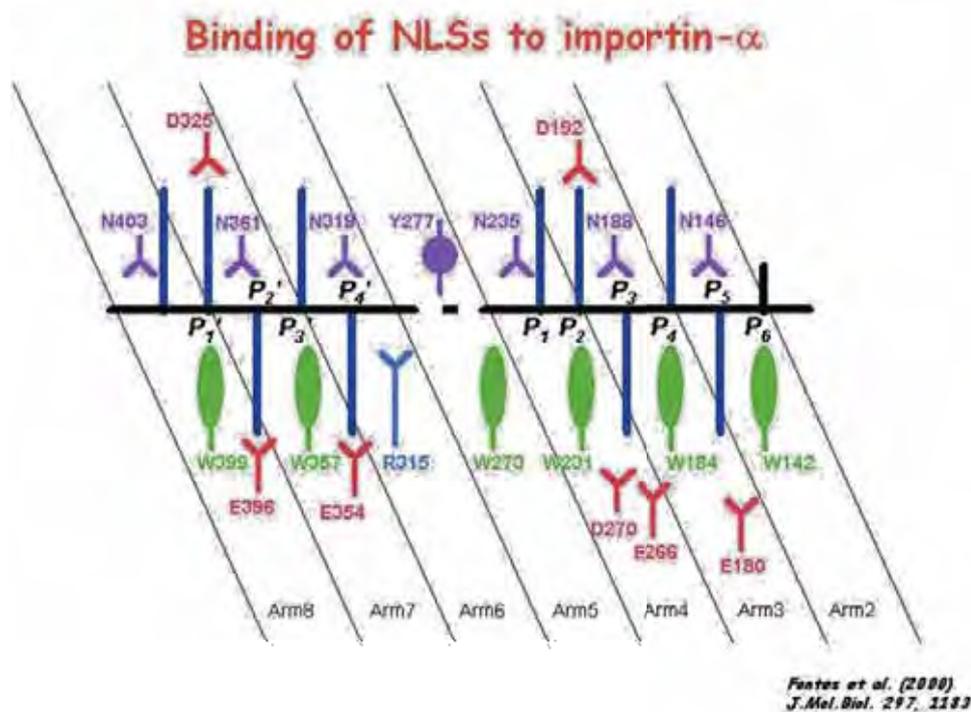


Figura 3- Posições de ligação na ImpA nos sítios principal (ARM 2-4) e secundário (ARM 5-8), conforme FONTES et al., 2000. Resíduos de ácido aspártico e glutâmico (vermelho), triptofano (verde), arginina (azul) e asparagina (roxo) da ImpA que constituem as regiões de ligação, encontram-se em destaque para definição das posições P1-P6 no sítio principal e P1'-P4' no sítio secundário.

### 1.3.2. Estruturas nativas.

A estrutura truncada (88-530) da ImpA de levedura foi resolvida por Conti e colaboradores, no final de 1998 (CONTI et al., 1998). Essa primeira estrutura foi elucidada na forma de dímero, que inicialmente foi proposto como mecanismo pelo qual a ImpA participasse da importação nuclear.

Posteriormente, a primeira estrutura cristalográfica da ImpA de mamíferos foi resolvida em 1999 (KOBÉ, 1999). Essa, além de apresentar a ImpA na forma monomérica, revelou um pseudo-NLS formado pelo próprio N-terminal da ImpA (domínio IBB) atuando como um auto-inibidor. Desta maneira, foi comprovado que a ImpA consiste de dois domínios estruturais e funcionais. Conforme descrito anteriormente, há um domínio formado pela porção N-terminal, básico e curto (70-80 aminoácidos), com características que

permitem a ImpA de atuar como auto-reguladora, além de apresentar seqüência capaz de ligar-se à importina- $\beta$ . O outro domínio, constituído por repetições tipo *armadillos*, é o grande domínio de ligação de proteínas que contém a seqüência NLS a serem transportadas.

No final de 1999 outros dois grupos publicaram as estruturas, elucidadas por cristalografia, da importina- $\beta$  ligadas ao domínio IBB (CINGOLANI et al., 1999) e à proteína Ran-GTP (VETTER et al., 1999).

### 1.3.3. Estruturas complexadas com NLS.

Além da estrutura nativa da ImpA de *Saccharomyces cerevisiae* foi descrita a estrutura (feita por técnica de *soaking*) dessa proteína ligada com o peptídeo NLS SV40. Nesta estrutura, o peptídeo de SV40 liga-se em dois sítios (CONTI et al., 1998). Este reconhecimento independente de duas regiões carregadas positivamente foi interpretado como um mecanismo para reconhecimento dos NLSs bipartidos que poderia interagir simultaneamente em ambos os sítios. Essa hipótese foi sustentada pela distância entre os dois sítios, consistente com 10-12 aminoácidos, que é o número de resíduos encontrados em NLSs bipartidos.

Em 2000, foram elucidadas as estruturas cristalográficas dos complexos de ImpA com peptídeos NLS monopartido de SV40 e do NLS bipartido da nucleoplasmina (FONTES et al., 2000). Simultaneamente foi publicada uma estrutura de ImpA de levedura ligada à NLS bipartida (nucleoplasmina) e a um peptídeo monopartido (*c-Myc* humano) (CONTI & KURIYAN, 2000) Esses dois artigos demonstraram a forma de ligação dos NLSs com a importina- $\alpha$ , que se dá por resíduos invariantes presentes nas hélices H<sub>3</sub> dos *armadillos*, além de seqüências que flanqueiam essas hélices na porção C-terminal. As cadeias laterais desses

resíduos formam sítios de ligação para longas e extensas cadeias laterais, em que as posições denominadas  $P_2$  e  $P_5$  apresentam maior afinidade para ligações no sítio de ligação principal, e as posições  $P_1'$  e  $P_2'$  no sítio de ligação secundário (Figura 3).

Em 2001, maiores informações estruturais relevantes à esta área foram adicionadas como a demonstração do estado monomérico da proteína, com a confirmação da auto-inibição por meio do peptídeo IBB e com a quantificação do processo (CATIMEL et al., 2001). Em 2003, foi publicado o artigo das estruturas dos complexos da ImpA e os peptídeos RB e  $N_1N_2$ , no qual foram obtidas mais informações a respeito da ligação da região do *linker* e do sítio secundário dos NLSs bipartidos (FONTES et al, 2003a). Nesse mesmo ano também foi publicado um artigo das estruturas de NLSs fosforilados, que inclui ensaios de constantes de ligação (FONTES, et al. 2003b), em que são descritas as estruturas da ImpA complexada com os peptídeos correspondentes às versões fosforiladas (peptídeo pCN) e não fosforiladas (peptídeo CN) do peptídeo do NLS de SV40 T-antígeno. Nesse artigo é demonstrado que a interação do domínio N-terminal com o sítio básico dos NLSs têm uma importância fundamental para a modulação do reconhecimento dos NLSs pela ImpA, porém nestas estruturas não foram localizados os resíduos correspondentes ao sítio de fosforilação dos NLS.

A estrutura da ImpA com o peptídeo NLS não clássico PLSCR1 (*Phospholipid scramblase 1*) foi elucidada em 2005. Esse NLS apresenta poucos resíduos carregados positivamente, entretanto a sequência é rica em resíduos hidrofóbicos. Além da ocupação das posições correspondentes ao sítio de ligação principal, foram detectadas interações de resíduos do peptídeo NLS com resíduos conservados da ImpA posicionados próximos ao N-terminal na proteína. Nesse mesmo artigo, ensaios em vivo indicaram que resíduos de lisina, ocupando a posição  $P_2$ , não parecem ser essenciais a esse NLS, ao contrário do constatado

por experimentos anteriormente realizados (CHEN et al., 2005).

Estudos estruturais a respeito do retorno da ImpA para o núcleo, efetuados em 2005, demonstraram que resíduos da posição N-terminal da nucleoporina Nup50, substituem o NLS, facilitando o desprendimento da proteína sinalizada com a ImpA, por interagir com um dos sítios de ligação a NLS e com resíduos do C-terminal da ImpA (MATSUURA & STEWART, 2005).

Embora informações tenham aumentado a respeito do processo de importação nuclear, muitas ainda precisam ser adicionadas nesse processo, principalmente no que se refere ao reconhecimento das NLS, pois a grande maioria das estruturas de complexos elucidados utiliza NLSs denominados clássicos e apenas uma isoforma de ImpA. Pouco se sabe sobre ainda sobre NLSs não clássicos, bem como diferenciação do reconhecimento das NLS por diferentes isoformas.

## 2. OBJETIVOS.

Esse trabalho tem como intuito prover maiores informações sobre o reconhecimento de seqüências de importação nuclear (NLS), a partir de estudos cristalográficos da Importina- $\alpha$  de *Mus musculus* com peptídeos NLS. Dessa maneira, tem-se como objetivos :

- A expressão da Importina- $\alpha$  de *Mus musculus* empregando a *Escherichia coli* como sistema de expressão heterólogo;
- Purificação da proteína recombinante adequada aos experimentos de co-cristalização;
- Efetuar experimentos de co-cristalização da ImpA com peptídeos NLS, para coleta, processamento de dados de difração de raios-X e elucidação das estruturas;
- Avaliar a estereoquímica da ImpA e peptídeos NLS, bem como suas interações intermoleculares;
- Comparar dados estruturais obtidos com os disponíveis em literatura e definir posições essenciais para o reconhecimento de NLSs pela ImpA.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS.

Estudos estruturais

O fluxograma da figura 4 representa, de maneira simplificada, as etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X (DRENTH, 1994).

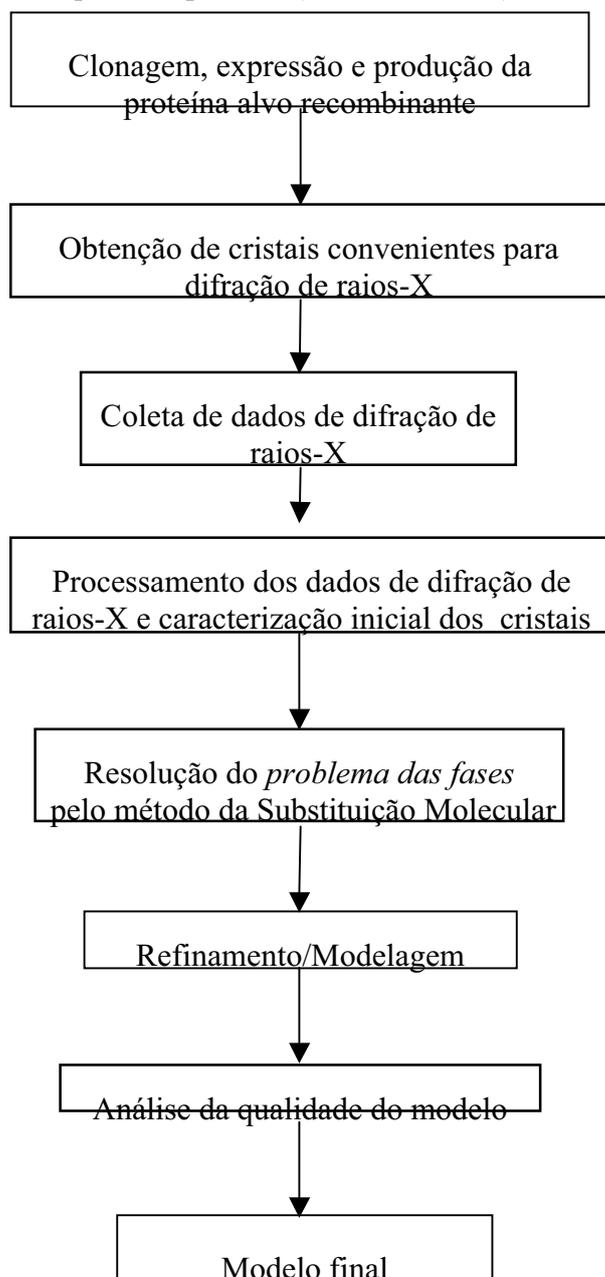


Figura 4 - Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada.

### 3.1. Expressão de importina- $\alpha$ truncada (70-529).

Para a expressão em larga escala da importina  $\alpha$  truncada (70-529) foi usado o vetor pET-30a (Novagen) contendo o cDNA da importina de *M. Musculus*, isoforma 2, cedido por nosso colaborador, Prof. Kobe da Universidade de Queensland, Austrália. Optou-se pela forma truncada para evitar competições entre os peptídeos NLS e o domínio auto-inibitório da proteína, bem como o emprego do pET-30a para permitir a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade (TEH, 1998).

Bactérias *E.coli*, linhagem BL21(DE3) pLysS, foram transformadas com o vetor fornecido e os clones selecionados em meio LB sólido contendo antibióticos kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e cloranfenicol (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a 37°C. As colônias selecionadas foram submetidas a testes de indução com IPTG (Isopropyl-B-D-Galactoside) e variação da temperatura entre 30 a 25°C. Colônias que se mostraram promissoras ou seja, apresentaram boa indução, foram armazenados a -80°C, em meio LB líquido e glicerol.

Com base no protocolo descrito por Teh e colaboradores, (TEH et al., 1998), para expressão em larga escala, bactérias foram inoculadas em meio LB líquido contendo 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de clorafenicol, e em seguida incubadas por 12 horas a 37 °C sob agitação constante. Posteriormente, cerca de 10 mL desse pré-inócuo foi transferido para 1 L de meio LB contendo os agentes de seleção e as bactérias cresceram à temperatura de 37 °C até alcançar absorvância  $A_{600} = 0,5$  a 1,0.

Uma alíquota de 1 mL foi separada para controle e ao restante foi adicionado 1 mM IPTG, levando a indução da expressão da proteína de interesse a 30 °C. Após 4 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação. e ressuspensas em 50 mL de tampão (20 mM Hepes pH 7.0, 500 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM imidazol) contendo inibidores de

protease (1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCEP), lisozima (1 mg/ml) além de (10u/ml) DNase e RNase. Com o rompimento das células pela atuação da lisozima, seguida de centrifugação do extrato total da bactéria, as proteínas solúveis, dentre as quais a proteína recombinante contendo a cauda de histidina, estavam prontas para purificação.

### **3.2. Purificação por cromatografia líquida.**

O extrato de *E.coli* contendo a proteína recombinante (ImpA) foi purificado por cromatografia de Afinidade com o emprego da coluna pronta HiTrap (GE Healthcare), contendo 5ml resina de Níquel-agarose, a qual foi acoplada a um cromatógrafo e submetida a fluxo contínuo de 0,5 ml/min de solução tampão A (20 mM Hepes pH 7.0, 1 M NaCl, 15 mM imidazol) para equilibrar a resina. Posteriormente a amostra foi aplicada com fluxo e pressão controlados, e a lavagem da resina foi reiniciada com o mesmo tampão para remover material que tenha se ligado inespecificamente.

Permanecendo a proteína recombinante acoplada ao níquel na resina, o tampão foi trocado para o tampão B (20 mM Hepes pH 7.0, 500 mM NaCl, 150 mM imidazol) contendo maior concentração de imidazol. Dessa maneira a competição do imidazol com a cauda de histidina, presente na proteína recombinante, pela interação com o níquel promoveu o desprendimento da proteína com a resina e permitiu a coleta da amostra purificada.

Após a etapa de purificação por cromatografia de afinidade, dois testes para otimização da purificação foram efetuados. No primeiro, a amostra foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel (Superdex 200- GE Healthcare), com emprego do tampão

C (20 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl). As frações contendo a ImpA foram coletadas e concentradas em Centricon-30 (Millipore).

No segundo experimento para otimização da amostra foi efetuada uma cromatografia de troca iônica em virtude de possíveis interações entre a proteína recombinante e peptídeos provenientes do sistema de expressão, precedida de uma diálise da amostra em tampão C, condição em que a amostra permanece estável.

A amostra foi aplicada e imobilizada na coluna catiônica (resource Q- GE Healthcare), previamente equilibrada com o tampão C. Após uma segunda passagem do tampão C para remoção de moléculas que não interagiram com as cargas das resinas, efetuou-se a eluição da ImpA empregando-se um gradiente de NaCl, até atingir 2 M do sal tampão D (20mM TrisHCl pH 8,0, 2,0 M NaCl). A concentração de NaCl foi mantida constante a medida que a leitura a 280 nm do cromatógrafo indicava o desprendimento de material da coluna. Dessa maneira, a ImpA foi separada de outras impurezas com o mínimo de sal possível.

Uma nova diálise foi efetuada em tampão E (20 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 100 mM DTT), para diminuição da concentração salina na amostra, o que poderia interferir em futuras cristalizações.

### **3.3. Peptídeos NLS.**

Foi observada, por meio de dados cristalográficos, a interação de diversos NLSs nos sítios de ligação da ImpA (FONTES et al., 2000). Além da variação da interação dos NLSs com uma mesma forma da ImpA, sabe-se da existência de isoformas de ImpA em um mesmo

organismo, as quais apresentam preferências por diferentes NLSs bem como diferentes padrões de expressão (KÖHLER,1999).

Com base na interação da ImpA com o peptídeo monopartido SV40 e por meio do desenvolvimento de bibliotecas de peptídeos, colaboradores do Prof. Kobe identificaram peptídeos específicos para ImpA de *Mus musculus*, isoforma 2 (TMNLS) e *Homo sapiens*, isoforma 5 (T52NLS), cujas afinidades foram determinadas por ensaios de ELISA, comprovando a afinidade desses peptídeos as suas respectivas isoformas (YANG,2008).

Esses peptídeos foram desenhados tendo como base resíduos do antígeno T SV40 flanqueando a região degenerada a partir da qual seqüências de NLS promissoras pudessem ser obtidas (GSEFESPXXXXXEA, onde X representa qualquer resíduo, exceto cisteína e triptofano).

Além da síntese desses peptídeos, durante o trabalho desenvolvido no laboratório do Prof. Kobe, buscou-se novos NLS descritos em literatura para maiores estudos. Foi selecionado para síntese o NLSs de Ku70, proteína que participa do reparo e transcrição de DNA, dependente da integridade de seu NLS para ser transportado para o núcleo (KOIKE, et al. 1999). Para a síntese desse peptídeo, foram adicionados resíduos à extremidade do NLS, de acordo com o seqüenciamento da proteína Ku70 de *H.sapiens*, para garantir integridade dos mesmos, bem como melhor interação com a ImpA, uma vez que extremidades costumam apresentar maior grau de mobilidade, observando-se menor ocupação.

Na Austrália, todos os peptídeos foram sintetizados pela Auspep, com pureza superior a 95% (Figura 5).

TMNLS	GSEFESPFKKRREA
T52NLS	GSEFESPIGKATREA
Ku70	EGKVTKRKQDDEGSTSKKPKVE

Figura 5 – Peptídeos selecionados para experimentos de co-cristalização.

### 3.4. Cristalização da importina- $\alpha$ truncada (70-529).

Duas amostras de ImpA foram obtidas. A primeira, resultante de purificação por cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de gel filtração foi concentrada a 17,3 mg/ml. A segunda, proveniente de uma purificação por cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de troca iônica, foi concentrada a 19 mg/ml. Ambas foram concentradas utilizando um Centricon-30 (Millipore) e armazenada à -20°C.

Empregando-se o método da matriz esparsa (JANCARIK & KIM, 1991) no sistema *hanging drop* (figura 6), a condição de cristalização foi otimizada, obtendo-se cristais nativos. Após constatada a viabilidade da amostra, experimentos de co-cristalização com peptídeos NLS foram executados. As condições de cristalização foram obtidas com base na variação de parâmetros de cristalização os quais resultaram em estruturas com presença de peptídeos NLS (FONTES, 2000, 2003a, 2003b).

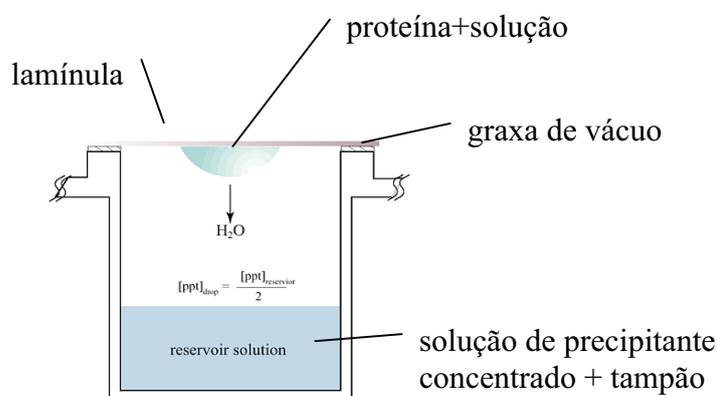


Figura 6 – Método para cristalização: *hanging drop* (gota suspensa). Imagem obtida do catálogo da empresa Hampton Research.

Os melhores cristais foram obtidos por co-cristalização, (Figura 6) (MCPHERSON,1982), onde uma gota constituída por 1  $\mu$ l da solução de proteína, 0,5  $\mu$ l da solução do peptídeo (15 mM, em que estimou-se a proporção de 5 moléculas de ligante p/ 1

de proteína), e 1  $\mu$ l da solução do reservatório foi suspensa sobre um reservatório contendo 0,5 ml de solução de 0,65 a 0,70 M de citrato de sódio como agente precipitante; 0,1 mM de citrato de sódio, pH 6,0 como tampão e 10 mM de DTT como aditivo (Tabela 1).

Esses sistemas fechados foram mantidos sob temperatura constante e cristais cresceram após 15-20 dias.

Tabela1 -Variações de concentração de agente precipitante

Citrato de Sódio pH6,5 ou 6,0	DTT	Citrato de Sódio
		0,50 M
		0,60 M
0,1 M	10 mM	0,65 M
		0,70 M

### 3.5. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.

Os cristais nativos provenientes da amostra submetida a filtração em gel foram coletados com um comprimento de onda de 2,0Å a 100 K em ânodo rotatório Rigaku, detector RAXIS IV e sistema de resfriamento no *Institute of molecular Biology* – Universidade de *Queensland*- Brisbane –Austrália.

Cristais nativos da ImpA truncada (70-529) purificada por troca iônica, bem como os da ImpA crescidos na presença dos peptídeos NLS coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas), submetidos a raios-X ( $\lambda=1.46\text{\AA}$ ), montados em *loops* de nylon e mantidos em fluxo de nitrogênio gasoso a 100K (Oxford Cryosystems®).

Em todos os experimentos houve necessidade de glicerol, a 25% (v/v), como crioprotetor adicionado às condições da solução-mãe, ( para evitar a formação de gelo durante coleta.

Imagens foram coletadas e convertidas em dados digitais pelo detector da placa de imagens MarCCD (MarResearch). Os programas DENZO e SCALEPACK do pacote HKL2000 (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) foram utilizados para o processamento dos dados coletados.

### **3.6. Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas de ImpA nativas.**

Optou-se para resolução das estruturas nativas por síntese de Fourier (MCREE,1993), pois os cristais da ImpA eram isomorfos entre si. Um refinamento de corpo rígido utilizando-se as coordenadas da ImpA truncada (70-529) , co-cristalizada com peptídeo NLS bipartido da proteína RB (FONTES et al. 2003a) (PDB número 1 PJM), com posterior refinamento das estruturas dos átomos e do fator de temperatura das estruturas foi realizado. Todos os ciclos de refinamento, de posição e do fator de temperatura efetuados, foram executados com programa CNS (BRÜNGER et al., 1992).

Entre os ciclos de refinamento, mapas de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$  foram gerados, possibilitando a execução de eventuais correções nas posições dos resíduos da estrutura e a inserção dos ligantes, com auxílio do programa “O” (JONES et al., 1990).

### **3.7. Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas de ImpA complexadas com peptídeos NLS.**

Os cristais dos complexos foram elucidadas por substituição molecular, utilizando-se o programa AMoRe– *Automated Package for Molecular Replacement* (NAVAZA,1994) e o arquivo de coordenadas 1PJM.(FONTES, et al.2003a). Após obtenção dos arquivos contendo fatores de estrutura, foram executados refinamento de corpo rígido, seguidos da geração de mapas de densidade eletrônica. O aplicativo Coot (EMSLEY & COWTAN, 2004) foi utilizado para visualização e modelagem das estruturas.

Todos os ciclos de refinamento de posição, de fator de temperatura, e adição de moléculas de água aos modelos foram executados com o programa Refmac (MURSHUDOV et al.,1997). Entre os ciclos de refinamento foram gerados mapas de densidade eletrônica com coeficiente  $2 |F_{obs}| - |F_{calc}|$  e  $3 |F_{obs}| - 2 |F_{calc}|$  para que as correções manuais de posição dos aminoácidos e verificação das distâncias de ligação das moléculas de água pudessem ser feitas.

### **3.8. Análise das estruturas.**

Para garantir a qualidade e validação das estruturas durante todo o processo de refinamento os modelos foram submetidos a análises de parâmetros estereoquímicos tais como distâncias e ângulos entre as ligações químicas (ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  dos aminoácidos da ligação peptídicas, interações de van der Waals para átomos não-ligados, com auxílio do programa PROCHECK (LASKOWSKI, 1993).

Além disso, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes salinas entre proteína e peptídeos foram identificadas com auxílio do programa LIGPLOT (WALLACE et

al., 1995). Imagens e figuras de representação esquemática das estruturas protéicas foram geradas tanto pelo programa PyMol (DELANO, 2002) como pelo programa gráfico Coot (EMSLEY & COWTAN, 2004).

### 3.9. Busca de seqüências nos bancos de dados e alinhamento.

A busca por seqüências representativas para verificar conservação de resíduos relacionados ao reconhecimento de NLS da ImpA foi realizada a partir da seqüência de *Mus musculus* depositada no PDB (<http://www.rcsb.org> - código 1EJY ). No banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ) o BLASTp foi feito para organismos que pudessem apresentar as seqüências completas, atingindo o e-value máximo de  $1e^{-50}$ . Buscando uma maior representatividade, um tBLASTn foi feito no The Institute of Genomic Research (TIGR- <http://www.tigr.org> ), buscando mais seqüências completas. Por meio do programa FGENESH (<http://www.softberry.com>) as seqüências de DNA obtidas no TIGR foram traduzidas. Todas as seqüências utilizadas no alinhamento com seus respectivos códigos de acesso encontram-se na Tabela 2.

O alinhamento das seqüências foi executado utilizando-se o programa ClustalX (Thompson *et al.* 1997), utilizando-se matriz PAM350 penalidade de abertura de gap 10 e extensão 0.10. Somente as seqüências completas de Imp- $\alpha$  foram incluídas no alinhamento.

Tabela 2- Códigos de acesso e abreviatura das seqüências empregadas no alinhamento.

<b>Espécie</b>		<b>Código de acesso</b>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cele1	F32E10.4
	Cele2	F26B1.3
<i>Anopheles gambiae</i>	Agam1	gb EAA14162.2
	Agam2	gb EAA01688.3
	Agam3	gb EAA11775.2
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dmel1	CG4799-PA
	Dmel2	CG9423-PC
	Dmel3	CG8548-PA
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Dpse1	GA18440-PA
	Dpse2	GA21775-PA
<i>Apis mellifera</i>	Amel1	ref XP_395967.2
	Amel2	ref XP_393050.2
<i>Danio rerio</i>	Drer1	gb AAH75790.1
	Drer2	emb CAD43446.2
	Drer3	gb AAS92647.1
	Drer4	ref NP_001018163.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	Xtro1	gb AAH81368.1
	Xtro2	ref NP_001016060.1
	Xtro3	ref NP_001008018.1
	Xtro4	gb AAH63215.1
<i>Gallus gallus</i>	Ggal1	emb CAG31134.1
	Ggal2	emb CAG31436.1
	Ggal3	ref XP_419770.1
	Ggal4	emb CAG31953.1
	Ggal5	emb CAG31032.1
<i>Mus musculus</i>	Mmus1	ref NP_034785.1
	Mmus2	ref NP_032493.1
	Mmus3	ref NP_032492.1
	Mmus4	dbj BAC32694.1
	Mmus5	gb AAC52450.1
<i>Homo sapiens</i>	Hsap1	ref NP_002257.1
	Hsap2	ref NP_002259.1
	Hsap3	ref NP_002258.2
	Hsap4	emb CAI20500.1
	Hsap5	emb CAH71948.1
	Hsap6	gb AAH90864.1

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expressão da importina- $\alpha$ truncada (70-529).

A partir dos estoques de clones armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , expressões em larga escala foram efetuados para obtenção de amostra em quantidade e qualidade suficientes para procedimentos seguintes (Figura7).

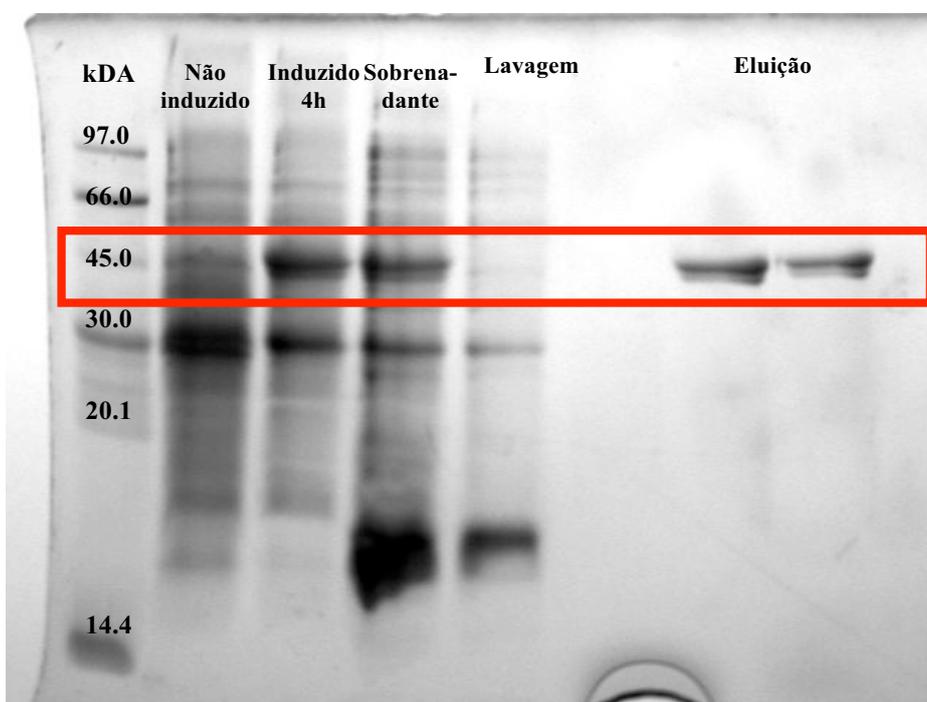


Figura 7- Verificação da expressão e purificação da Importina- $\alpha$  em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com comassie blue. Não induzido corresponde ao controle, Induzido 4h corresponde a indução, Sobrenadante corresponde a fração solúvel do extrato de E.coli contendo proteína recombinante de interesse; Lavagem indica parte do extrato bacteriano que não ligou-se a coluna de afinidade. Eluição indica a eluição da ImpA da coluna de afinidade a Níquel.

Conforme esperado, verificou-se ImpA presente tanto na fração solúvel (sobrenadante) quanto insolúvel (pellet), resultante da lise das bactérias, responsáveis pela síntese da proteína recombinante de interesse (Figura 8). Apenas a fração solúvel do extrato total foi utilizada na purificação, para garantir que a ImpA presente na amostra apresentasse integridade estrutural, fator essencial para sucesso na obtenção de dados cristalográficos.

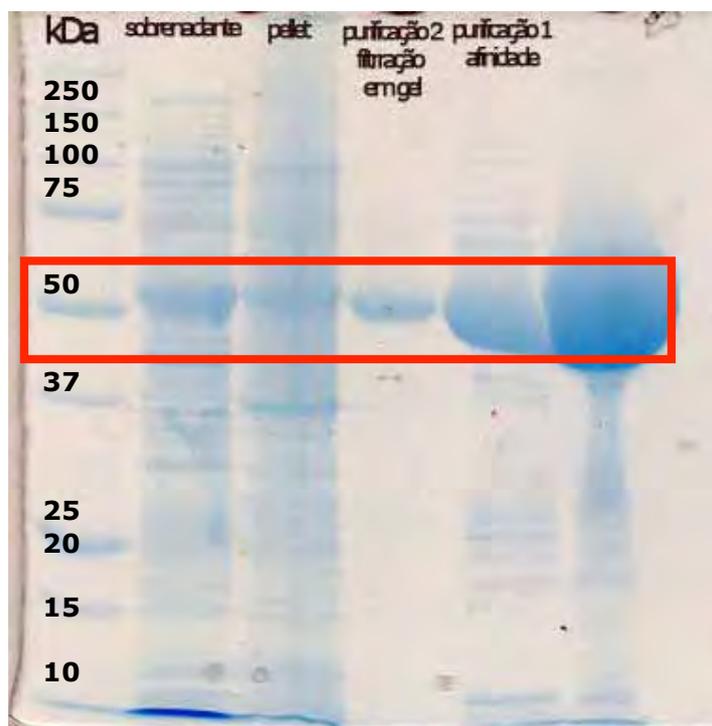


Figura 8- Verificação da purificação da ImpA em gel de poliacrilamida à 12% (SDS-PAGE) corado com Comassie Blue. Sobrenadante corresponde a fração solúvel do extrato de *E.coli*; pellet corresponde a fração insolúvel; purificação 1 e 2 correspondem a purificação por cromatografia de afinidade e filtração em gel, respectivamente.

#### 4.2. Purificação da importina- $\alpha$ truncada (70-529) por cromatografia líquida.

Uma purificação em coluna de afinidade separou a ImpA da maioria das proteínas do presentes na fração solúvel do extrato total de *E.coli* (Figura 9). Em seguida, as frações coletadas foram submetidas a uma purificação por gel filtração. Frações de ambas as purificações foram analisadas em SDS-PAGE a 12% para verificar a pureza das mesmas, como pode ser observado na Figura 8, colunas indicadas por purificação 1 e 2.

Embora aparentemente pura e adequada para cristalização, optou-se por testar também a troca iônica como segunda etapa de purificação. Dessa maneira, após a purificação por cromatografia de afinidade, uma amostra de ImpA passou por uma diálise em tampão C,

condição em que a proteína permanece mais estável, seguida da purificação por troca iônica, com intuito de remover possíveis ligantes associados a ImpA que pudessem interferir nos experimentos de co-cristalização.

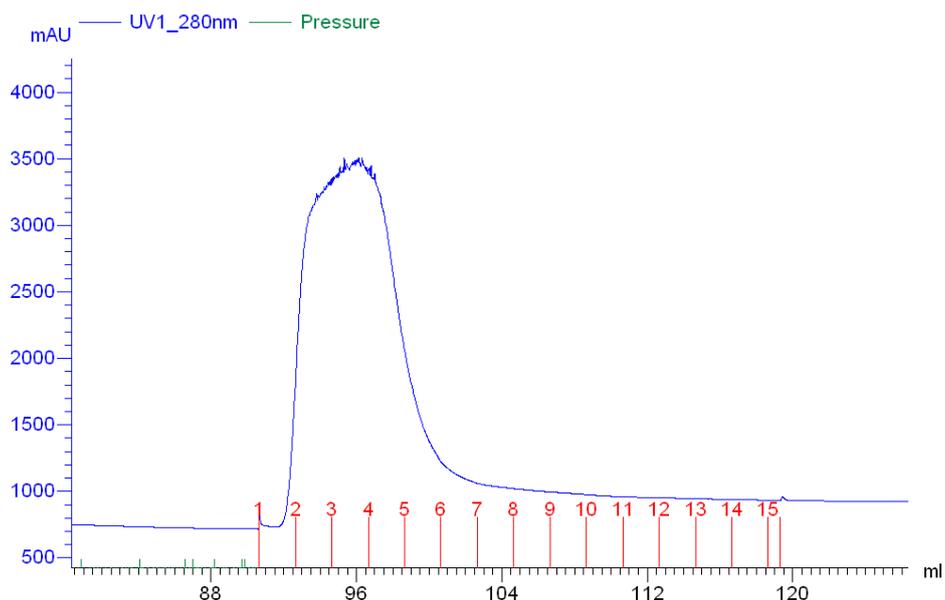


Figura 9 –Purificação da Importina - $\alpha$  por cromatografia de afinidade. Pico na leitura à 280nm indica a eluição da ImpA.

A nova amostra foi purificada com gradiente de NaCl de 0 a 2 M, em que a proteína expressa foi coletada a 300m M de NaCl, em solução tampão 20 mM TrisHCl , pH 8,0 (Figura 9). Em seguida, uma nova diálise foi efetuada em tampão 20 mMTrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl , 100 mM DTT, para viabilizar amostra para cristalizações.

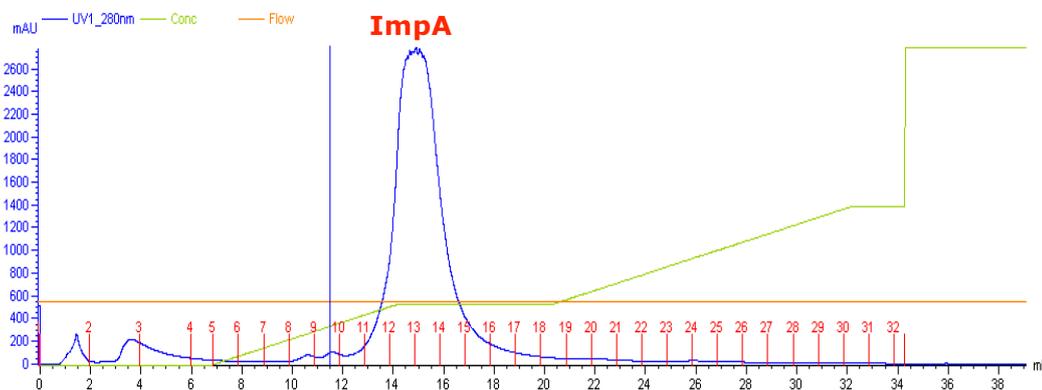


Figura 10- Purificação da ImpA por cromatografia de troca iônica. Pico na leitura à 280nm indica a eluição da ImpA.

#### 4.3.Cristalização da ImpA (70-529).

Com intuito de constatar a viabilidade das amostras obtidas, testes iniciais de cristalização foram efetuados, tendo como base as condições descritas por Kobe (KOBÉ, 1999) (Tabela 2).

A amostra obtida após cromatografia de gel filtração foi utilizada com concentração de 17,3 mg/ml. Após 10 dias à 20°C, verificou-se a formação de policristais em todas as gotas e após 20 dias, observou-se o aumento dos mesmo e crescimento de monocristais. Monocristais apresentando 0,3 mm, apareceram nas condições em pH 6,0, geralmente associados em feixes (Figura 11) e grande quantidade de precipitado nas gotas, entretanto foi possível a separação deles para coleta de dados de difração de raios-X.



Figura 11 -Cristais da ImpA nativa, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT.  
Cristais em torno de 0,7 x 0,2 x 0,2mm

Seguindo o mesmo procedimento para a amostra submetida à troca iônica, concentrada à 19 mg/ml, após 20 dias à 18°C, cristais de morfologia similar cresceram porém sem formação de feixes e com menos quantidade de precipitado nas gotas (Figura 12).

Optou-se então pela utilização de amostras submetidas ao mesmo procedimento para as co-cristalizações, para evitar possíveis interações indesejadas com contaminantes.

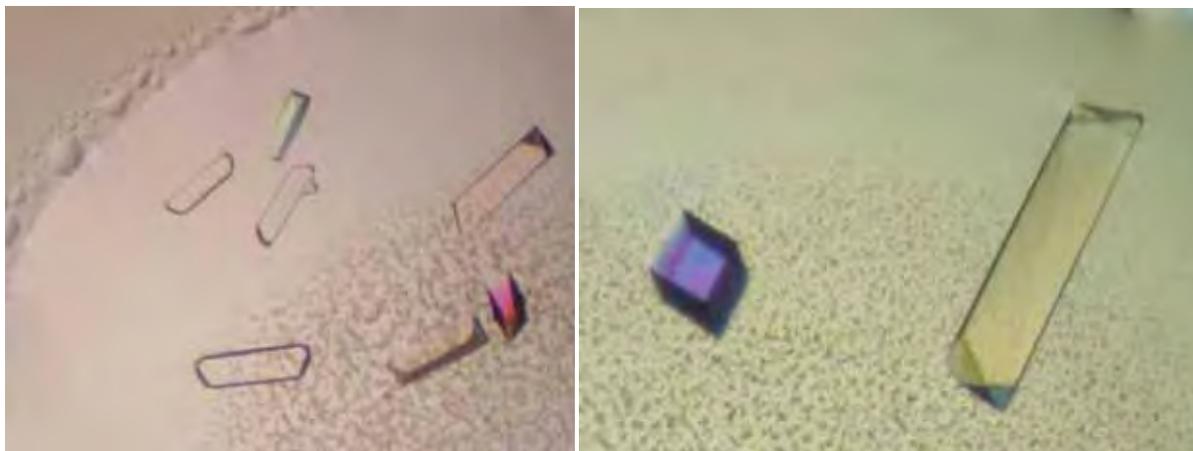


Figura 12 - Cristais nativos de ImpA, obtidos após purificação da amostra em cromatografia de troca iônica. Foram obtidos em 0,60M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,6 x 0,2 x 0,2mm.

#### 4.4. Co-cristalização da ImpA (70-529) com peptídeos NLS.

Empregando-se uma amostra à 19 mg/ml, submetida a uma troca iônica como segunda etapa de purificação, nos experimentos de co-cristalização a concentração de agente precipitante foi variada, considerando-se os resultados obtidos para obter cristais nativos (tabela 1). Peptídeos NLSs foram adicionados às gotas na proporção de 4 a 5 moléculas de ligante para 1 molécula de ImpA.

Após 20 dias, gotas contendo o peptídeos NLS Ku70, T52NLS e TMNLS tiveram seus melhores resultados (Tabela 3). Para as coletas de dados de difração de raios-X, os cristais adequados para coleta foram armazenados em nitrogênio líquido, com adição de crioprotetor.

Tabela 3-Condições de cristalização em que foram obtidos os melhores cristais de ImpA(70-529) e seus complexos com peptídeos NLS.

ImpA (70-529)	Citrato de Sódio pH 6,5	Citrato de Sódio	Aditivo (DTT)	Razão peptídeo/proteína	Dimensões máximas (mm)
nativa		0,60 M		-	0,6x0,2x0,2
+ TMNLS	0,1 M	0,62 M	10 mM	5(15 mM)	0,4x0,2x0,2
+ T52NLS		0,65 M			0,4x0,2x0,1
+ Ku70NLS		0,65 M			0,3x0,2x0,1



Figura 13- Cristais de ImpA na presença de peptídeos NLS; À esquerda, cristais do complexo ImpA Ku70 obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais em torno de 0,4 x 0,1 x 0,1mm.; À direita, cristais do complexo ImpA-TMNLS, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais com dimensões de 0,4 x 0,2 x 0,2mm.



Figura 14- Cristais do complexo ImpA-T52NLS, obtidos em 0,65M de citrato de sódio, 1,0M de citrato de sódio, pH 6,0 e 10mM de DTT. Cristais com dimensões de 0,3 x 0,2 x 0,1mm.

#### 4.5. Coleta de dados de difração de raios-X da importina- $\alpha$ nativa

Diversos cristais submetidos ao feixe de raios-X apresentaram padrão de difração de policristal, entretanto foi possível a coleta de dois conjuntos de dados da ImpA nativa. Um conjunto de dados à 2,0 Å de resolução foi coletado na Austrália, correspondente a amostra submetida a gel filtração. Foram coletadas 152 imagens, com oscilação de 0,5°. Os dados foram processados a 2,0 Å de resolução e são 99 % completos.

O conjunto obtido no LNLS, correspondente a amostra submetida a troca iônica, foi processado à 2,1 Å contém 120 imagens, coletadas com oscilação de 1° com dados 97% completos. Todos os cristais pertenciam ao grupo espacial primitivo ortorrômbicos (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>), e eram isomorfos em relação ao cristal da ImpA nativa (KOBE,1999). Dados experimentais encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X.

	Importina- $\alpha$ nativa IMB- Austrália	Importina- $\alpha$ nativa LNLS- Brasil
Cela unitária (Å)	a=78,58 b=90,27 c=100,15 $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=77,57 b=88,35 c=98,52 $\alpha=\beta=\gamma=90$
Grupo espacial		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Resolução (Å)	50,0-2,0 (2,08-2,01) <sup>a</sup>	40-2,13 (2,23-2,13) <sup>a</sup>
Reflexões únicas	47588	37191
Dados completos (%)	98,9 (95,8) <sup>a</sup>	97,0 (86,2) <sup>a</sup>
R <sub>merge</sub> <sup>b</sup> (%)	4,7(61,9) <sup>a</sup>	11,7(34,0) <sup>a</sup>
I/ $\sigma$ (I)	30,87 (2,71) <sup>a</sup>	9,98(2,34) <sup>a</sup>
Redundância	3,0 (3,0) <sup>a</sup>	3,7 (2,9) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.

<sup>b</sup>  $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle}$ , onde  $I_{hkl,i}$  é a intensidade de cada medida individual da reflexão com índices de Miller h, k and l, e  $\langle I_{hkl} \rangle$  é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para  $I > -3\sigma(I)$ .

#### 4.6. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X dos complexos

Assim como ocorrido com os cristais nativos, vários cristais da ImpA com ligantes submetidos ao feixe de raios-X e apresentaram padrão de difração de policristal. Felizmente foi possível a coleta de três conjuntos de dados, cada um destes crescidos na presença de diferentes peptídeos.

Foram coletados conjuntos de dados à 2,3; 2,57 e 2,6Å, correspondente, respectivamente, aos complexos com os ligantes TMNLS, T52NLS e Ku70. As imagens de todos os conjuntos foram coletadas com oscilação de diferença de 1° de oscilação entre cada imagem. Todos os cristais eram isomorfos (grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) em relação ao cristal da ImpA nativa (KOBÉ,1999) e com complexos cristalizados anteriormente (FONTES et al.,2000, 2003a, 2003b). Dados experimentais encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 -Estatísticas da coleta de dados de difração de raios-X

	TMNLS	T52NLS	Ku70
Cela unitária	a=78,86	a=78,78	a=78,52
	b=90,90	b=90,03	b=89,97
	c=100,97	c=99,55	c=100,14
	$\alpha=\beta=\gamma=90$	$\alpha=\beta=\gamma=90$	$\alpha=\beta=\gamma=90$
Grupo espacial		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Resolução (Å)	40,0-2,3	40,0-2,57	40,0-2,6
	(2,38-2,30) <sup>a</sup>	(2,66-2,57) <sup>a</sup>	(2,69-2,6) <sup>a</sup>
Reflexões únicas	29414	22918	22152
Dados completos (%)	89,3 (89,6) <sup>a</sup>	99,1 (98,9) <sup>a</sup>	99,3 (98,9) <sup>a</sup>
R <sub>merge</sub> <sup>b</sup> (%)	9,4(55,1) <sup>a</sup>	9,2(61,8) <sup>a</sup>	11,8(61,5) <sup>a</sup>
I/σ (I)	12,89(2,39) <sup>a</sup>	14,26(2,03) <sup>a</sup>	14,36(2,73) <sup>a</sup>
Redundância	4,4 (3,9) <sup>a</sup>	4,0(3,5) <sup>a</sup>	4,3(4,2) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle}$ , onde  $I_{hkl,i}$  é a intensidade cada medida individual da reflexão com índices de Miller h, k and l, e  $\langle I_{hkl} \rangle$  é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para  $I > -3\sigma(I)$ .

#### 4.7. Elucidação e refinamento/modelagem da importina- $\alpha$ nativa

Como os cristais nativos eram isomorfos em relação aos complexos ImpA (FONTES et al., 2000, 2003a, 2003b), optou-se para resolução da estrutura com dados a 2.01Å por substituição molecular utilizando-se o programa AMoRe (NAVAZA,1994), e o arquivo de coordenadas 1PJM da ImpA truncada em sua porção N-terminal, co-cristalizada com peptídeo NLS bipartido RB (FONTES et al., 2003a). Os fatores R e Rfree iniciais do modelo foram respectivamente 32,7 e 32,3%. Entre os ciclos de refinamento mapas de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$  foram gerados, possibilitando execução de eventuais correções nas posições dos resíduos da estrutura.

Mesmo com a ausência do domínio auto-inibidor, uma forte densidade eletrônica na região correspondente ao sítio de ligação principal ( $S_1$ ) da proteína (Figura 15) foi encontrada. Manteve-se forte a densidade eletrônica nas posições  $P_1$  e  $P_2$ . Entretanto não foi constatada densidade eletrônica no sítio de ligação secundário ( $S_2$ ). O mesmo foi verificado no conjunto coletado a 2,13 Å.

Ao inserir o peptídeo correspondente ao NLS SV40 à densidade eletrônica e efetuar mutações dos resíduos, constatou-se a possibilidade de uma ocupação predominante de  $S_1$  por um peptídeo (Figura 16). Com base nas densidades eletrônicas, chegou-se a seqüência AKSARA. As estatísticas de refinamento encontram-se na tabela 6.

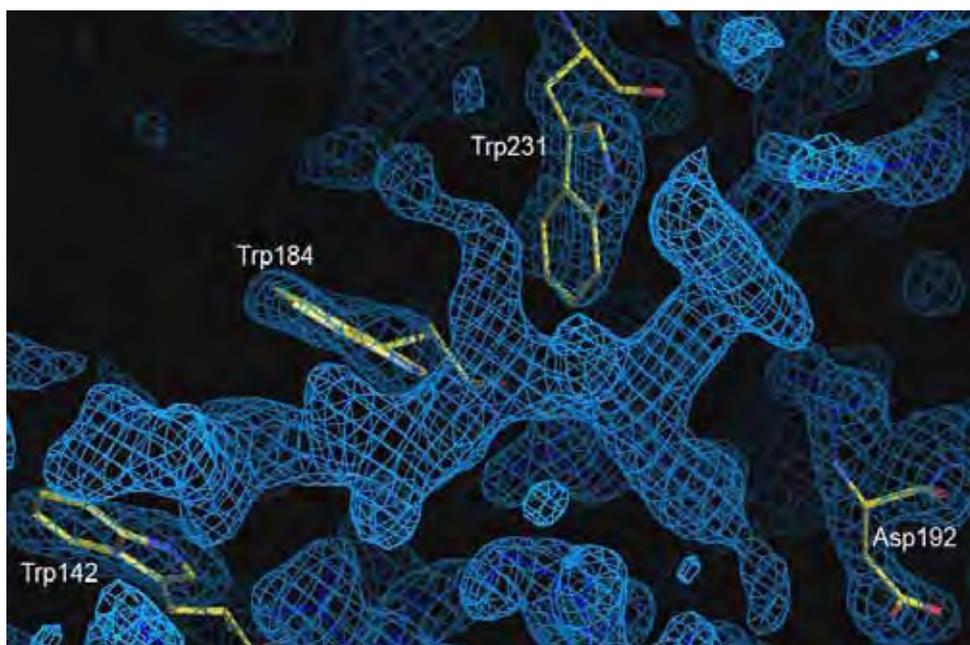


Figura 15- Mapa de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$ ; Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação principal.

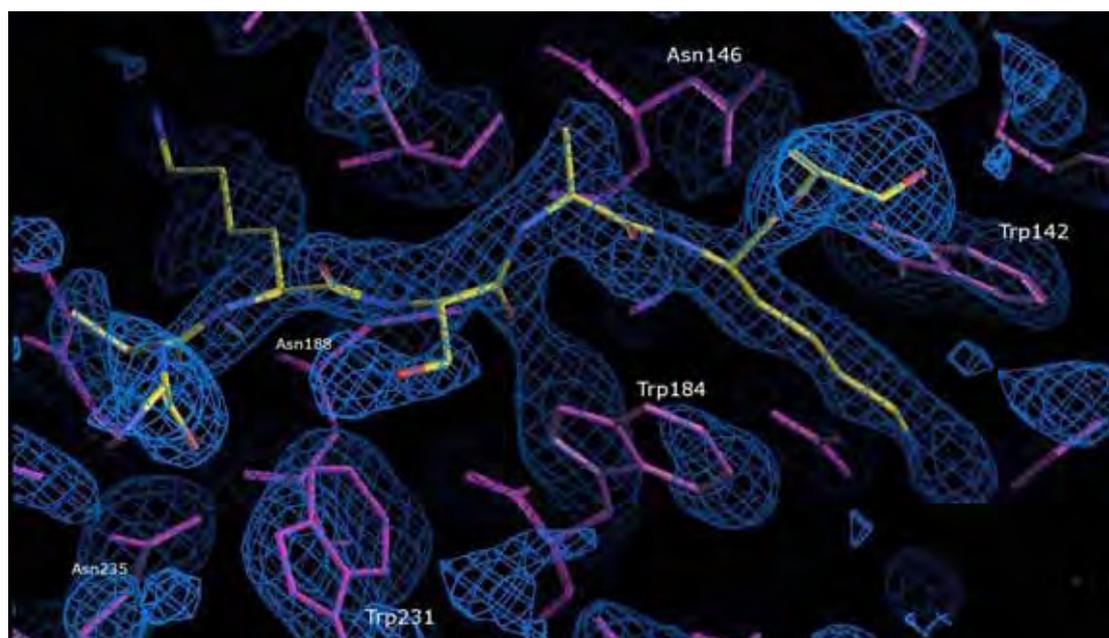


Figura 16- Mapa de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$  da ImpA nativa com o peptídeo. Em amarelo encontram-se resíduos ocupando a densidade eletrônica do sítio de ligação principal e em rosa resíduos da ImpA.

#### **4.8.Elucidação, refinamento e modelagem da estruturas do complexos ImpA e peptídeos NLS.**

Todos os cristais eram isomorfos (grupo espacial  $P2_12_12_1$ ) em relação ao cristal da ImpA nativa (KOBÉ,1999) e resultaram em conjuntos processados entre 2,3 à 2,6Å de resolução. As estruturas foram elucidadas por substituição molecular, utilizando-se o programa AMoRe (NAVAZA,1994) e o arquivo de coordenadas 1PJM da ImpA truncada N-terminalmente, co-cristalizada com peptídeo NLS bipartido RB (FONTES et al., 2003a). Após obtenção dos arquivos contendo fatores de estrutura, foram executados refinamento de corpo rígido, seguidos da geração de mapas de densidade eletrônica. O aplicativo Coot (EMSLEY & COWTAN, 2004) foi utilizado para visualização e modelagem da estrutura.

Após o refinamento de corpo rígido, pode-se verificar claramente a presença de densidades eletrônicas correspondentes aos peptídeos. Uma primeira observação dos sítios de ligação de NLS dos modelos constatou-se a presença de densidade eletrônica correspondente aos ligantes TMNLS e T52NLS, tanto no sítio de ligação principal ( $S_1$ ), quanto no sítio de ligação secundário ( $S_2$ ). Em relação ao peptídeo NLS de Ku70, foi encontrada densidade eletrônica somente em  $S_1$ , porém diferente da densidade eletrônica presente nos cristais nativos. Dessa maneira, os peptídeos foram adicionados ao modelo, modelados e refinados levando-se em consideração as densidades eletrônicas (Figuras 17 e 18).

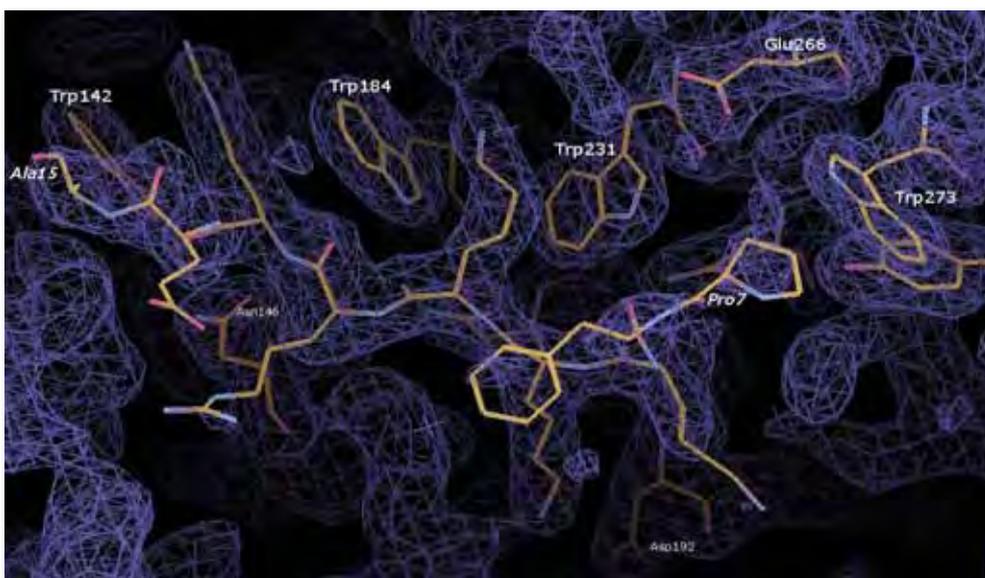


Figura 17- Mapa de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$  da ImpA com o peptídeo TMNLS. Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação principal.

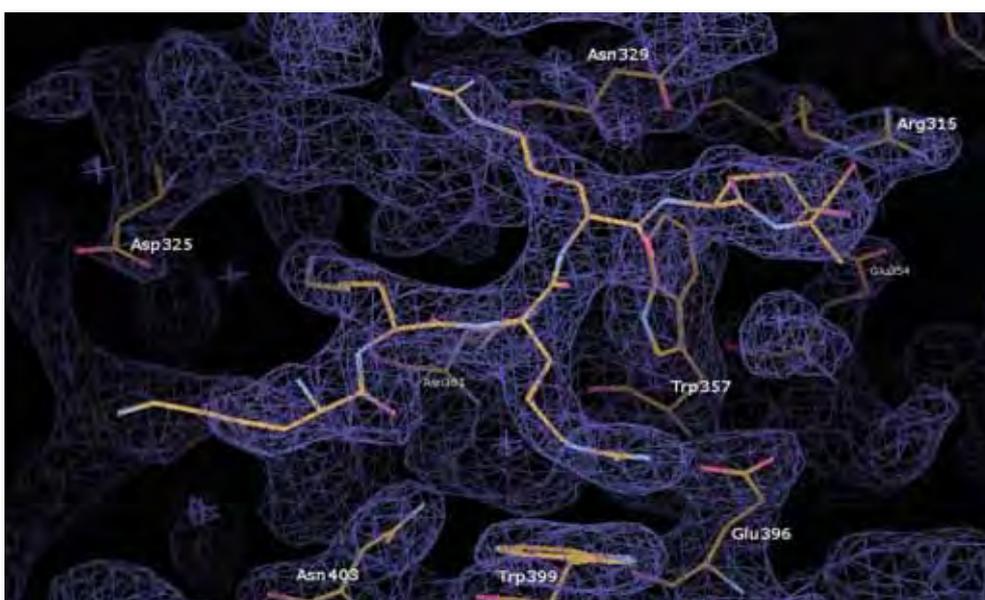


Figura 18- Mapa de densidade eletrônica  $3|F_{obs}| - 2|F_c|$  da ImpA com o peptídeo TMNLS. Encontram-se em destaque alguns resíduos do sítio de ligação secundário.

O modelo da ImpA contendo peptídeo NLS Ku70 teve seu refinamento iniciado com fatores R inicial de 28,9% e Rfree 29,0%. Após adição e modelagem dos peptídeos nas densidades eletrônicas presentes nos sítios de ligação da ImpA, ciclos de refinamento de posição e fator temperatura B foram efetuados. Deleções de cadeias laterais de alguns resíduos, cujas densidades eletrônicas não fossem informativas para posicionamento das mesmas, foram efetuadas no modelo bem como mutações para os resíduos de glicina quando regiões apresentaram-se imprecisas (Tabela 6).

O mesmo procedimento foi para os modelos de ImpA-TMNLS e ImpA-T52NLS tendo como início do refinamento, valores de fatores R inicial de 22,2% e Rfree 26,5% para a ImpA-TMNLS e R inicial de 21,7% e Rfree 26,5% para a ImpA-T52NLS.

Tabela 6- Resíduos cujas cadeias laterais foram removidas devido ausência de densidade eletrônica para as mesmas.

Modelo	Cadeias laterais removidas
ImpA-TMNLS	Q <sup>109</sup> , R <sup>117</sup> , K <sup>291</sup> , H <sup>418</sup> , K <sup>432</sup> , K <sup>435</sup> , K <sup>453</sup> , E <sup>465</sup> , K <sup>472</sup> , R <sup>478</sup> , K <sup>494</sup>
ImpA-T52NLS	K <sup>108</sup> , Q <sup>109</sup> , K <sup>392</sup> , K <sup>432</sup> , K <sup>453</sup> , K <sup>459</sup> , E <sup>474</sup> , R <sup>378</sup> , E <sup>482</sup> , K <sup>486</sup> , E <sup>493</sup>
ImpA-Ku70	K <sup>291</sup> , K <sup>432</sup> , K <sup>453</sup> , E <sup>458</sup> , K <sup>459</sup> , E <sup>465</sup> , E <sup>474</sup> , R <sup>478</sup> , E <sup>482</sup> , K <sup>486</sup>

Posteriormente, um refinamento da ocupação dos resíduos dos modelos e a adição de moléculas de água foram executados, seguidos de refinamento de posição e fator temperatura. Ao término do processo, diagramas de Ramachandran foram gerados, confirmando a qualidade estereoquímica dos modelos (Tabela 7).

Tabela 7- Estatísticas de refinamento

	ImpA Nativa -IMB	ImpA -TMNLS	ImpA-T52NLS	ImpA -Ku70
Resolução (Å)	50,0-2,0 (2,08-2,01) <sup>a</sup>	40,0-2,3 (2,38-2,30) <sup>a</sup>	40,0-2,57 (2,66-2,57) <sup>a</sup>	40,0-2,6 (2,69-2,6) <sup>a</sup>
Número de reflexões. F>0	47588	29414	22918	22152
Completeza (%)	98,9 (95,8) <sup>a</sup>	89,3 (89,6) <sup>a</sup>	99,1 (98,9) <sup>a</sup>	99,3 (98,9) <sup>a</sup>
R <sub>cryst</sub> <sup>b</sup> (%)	22,6	18,69	15,23	17,16
R <sub>free</sub> <sup>c</sup> (%)	24,0	22,66	22,81	22,22
Número de átomos (não hidrogênios):				
Proteína	3273	3445	3434	3392
H <sub>2</sub> O	186	107	103	96
Fator de temperatura médio (Å <sup>2</sup> ) <sup>e</sup>	43,49	52,56	51,28	52,14
Gráfico de Ramachandran <sup>d</sup>				
Resíduos nas regiões mais favoráveis (não permitidas) (%)	95 (0,3)	95(0,3)	94(0,3)	92(0,3)

<sup>a</sup> Números em parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução.

<sup>b</sup>  $R_{cryst} = \sum_{hkl} (||F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}||) / |F_{obs_{hkl}}|$ , onde  $|F_{obs_{hkl}}|$  e  $|F_{calc_{hkl}}|$  são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados.

<sup>c</sup> R<sub>free</sub> é equivalente ao R<sub>cryst</sub>, mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas.

<sup>d</sup> Calculado com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Também foram verificadas interações do tipo pontes de hidrogênio e hidrofóbicas entre proteínas e ligantes. Merecem destaque interações hidrofóbicas, comuns a todos os modelos, entre ligantes e resíduos W<sup>142</sup>, D<sup>192</sup>, W<sup>231</sup> e W<sup>184</sup> da ImpA (Tabela 8).

Em relação a interações do tipo pontes de hidrogênio, são comuns a todos os modelos as interações dos resíduos W<sup>142</sup>, N<sup>146</sup>, W<sup>184</sup>, N<sup>188</sup> e N<sup>235</sup> da ImpA com a cadeia principal os

peptídeos NLS e os resíduos G<sup>150</sup>, T<sup>155</sup>, Q<sup>181</sup> D<sup>192</sup> da ImpA com cadeias laterais dos resíduos constituintes dos peptídeos (Tabela 9, figuras 20B, 23B e 26B).

Tabela 8- Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS do sitio de ligação principal. Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos.

modelo> posição	TMNLS- ImpA	T52NLS - ImpA	Ku70 - ImpA	
			E <sup>548</sup> -P <sup>308</sup>	
			G <sup>549</sup> -W <sup>273</sup>	
	P <sup>7</sup> -W <sup>273</sup>	P <sup>7</sup> -W <sup>273</sup>		
			S <sup>552</sup> -W <sup>231</sup>	
Sitio principal (S <sub>1</sub> )	P <sub>1</sub>			
	P <sub>2</sub>	K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -S <sup>149</sup>	K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -W <sup>231</sup>	K <sup>553</sup> -D <sup>192</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>11</sup> -W <sup>231</sup> K <sup>11</sup> -W <sup>184</sup>	A <sup>11</sup> -W <sup>231</sup>	R <sup>554</sup> -W <sup>231</sup>
	P <sub>4</sub>	R <sup>12</sup> -P <sup>110</sup> R <sup>12</sup> -N <sup>146</sup>		P <sup>555</sup> -S <sup>149</sup> P <sup>555</sup> -N <sup>146</sup> P <sup>555</sup> -W <sup>184</sup>
	P <sub>5</sub>	R <sup>13</sup> -W <sup>184</sup> R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup>	R <sup>13</sup> -W <sup>184</sup> R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>556</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>556</sup> -W <sup>142</sup>
		E <sup>14</sup> -S <sup>105</sup>		

Tabela 9- Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS e ImpA , nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos.

Modelo>		TMNLS xImA		T52NLS x ImpA		Ku70 x ImpA	
cadeia do ligante >		principal	lateral	principal	lateral	principal	lateral
Sitio secundário (S <sub>2</sub> )	P <sub>1</sub> '	-	K <sup>11</sup> -V <sup>321</sup> K <sup>11</sup> -T <sup>328</sup>	E <sup>14</sup> -N <sup>361</sup>	E <sup>14</sup> -G <sup>323</sup> E <sup>14</sup> -T <sup>328</sup>		
	P <sub>2</sub> '	R <sup>12</sup> -N <sup>361</sup> R <sup>12</sup> -W <sup>357</sup>	-	-	R <sup>13</sup> -S <sup>360</sup> R <sup>13</sup> -G <sup>396</sup>		
	P <sub>3</sub> '	-	R <sup>13</sup> -S <sup>360</sup> R <sup>13</sup> -E <sup>396</sup>	T <sup>12</sup> -W <sup>357</sup> T <sup>12</sup> -W <sup>361</sup>	-		
	P <sub>4</sub> '	-	-	-	-		
Sitio principal (S <sub>1</sub> )	P <sub>1</sub>	K <sup>9</sup> -N <sup>235</sup>	-	G <sup>9</sup> -N <sup>235</sup>	-	S <sup>552</sup> -N <sup>235</sup>	
	P <sub>2</sub>	-	K <sup>10</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>10</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>553</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>553</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>553</sup> -T <sup>155</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>11</sup> -N <sup>188</sup> K <sup>11</sup> -W <sup>184</sup>	K <sup>11</sup> -N <sup>228</sup>	A <sup>11</sup> -N <sup>188</sup> A <sup>11</sup> -W <sup>184</sup>	-	R <sup>554</sup> -N <sup>188</sup> R <sup>554</sup> -W <sup>184</sup>	R <sup>554</sup> -N <sup>228</sup> R <sup>554</sup> -D <sup>270</sup>
	P <sub>4</sub>	-	R <sup>12</sup> -L <sup>104</sup> R <sup>12</sup> -G <sup>107</sup>	-	-	-	-
	P <sub>5</sub>	R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup> R <sup>13</sup> -N <sup>146</sup>	R <sup>13</sup> -Q <sup>181</sup>	R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup> R <sup>13</sup> -N <sup>146</sup>	R <sup>13</sup> -Q <sup>181</sup>	K <sup>556</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>556</sup> -N <sup>146</sup> K <sup>556</sup> -S <sup>105</sup>	K <sup>556</sup> -Q <sup>181</sup>

#### 4.9. Estrutura da ImpA nos complexos.

A ImpA truncada (72-529) de *M. musculus* consiste de uma estrutura alongada, contendo repetição de dez motivos denominados “armadillo” (GORLICH et al., 1994), cujas repetições constituem os sítios de ligação de NLS (KOBÉ, 1999) (Figura 19). Entre as ARM 1-4 encontram-se resíduos conservados nas hélices H<sub>3</sub>, que constituem o sítio de ligação principal (S<sub>1</sub>) e entre ARM 4-8 o sítio de ligação secundário(S<sub>2</sub>).

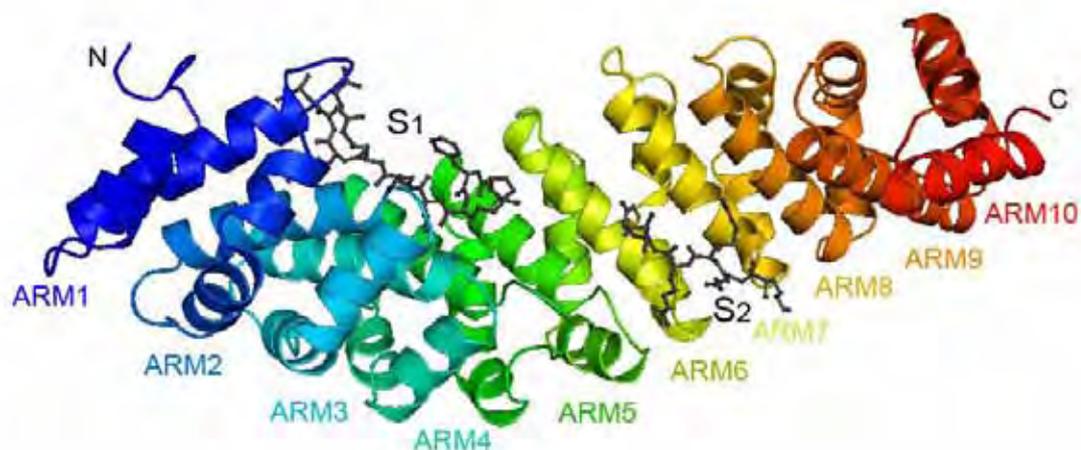


Figura 19 – Representação do complexo ImpA-TMNLS em diagrama de fitas. Em destaque motivos ARM e localização dos sítios de ligação de NLS.

Os modelos da ImpA nos complexos são em essência, idênticos quando observado em relação ao modelo nativo. O desvio r.m.s. dos C $\alpha$  dos resíduos 72-497 entre a ImpA nativa (PDB ID 1IAL) e os ligantes é 0,29; 0,49 e 0,37 Å para os modelos contendo peptídeos KU70, TMNLS e T52NLS, respectivamente.

#### 4.10. Ligação do peptídeo NLS de Ku70.

O peptídeo correspondente a seqüência de localização nuclear da proteína Ku70, <sup>539</sup>KVTKKRKHDNEGSGSKRPK<sup>556</sup>, ligou-se de maneira anti-paralela à ImpA, em concordância com os resultados anteriores (FONTES, 2000), apresentando superfície de contato entre proteína e ligante de 803,9Å<sup>2</sup> (Figura 20).



Figura 20 – Representação em diagrama de fitas da Importina- $\alpha$  truncada (72-497) com peptídeo NLS de KU70 (rosa). Hélices em rosa indicam sítio de ligação principal.

Embora considerado bipartido (KOIKE,1999), ligou-se somente a S<sub>1</sub>, que compreende do primeiro ao quarto motivos ARM da ImpA, onde foi encontrada densidade eletrônica para 12 resíduos (resíduos 547-558) (figura 21A).

Os resíduos do peptídeo adicionados ao modelo, refinados e modelados, apresentaram fator temperatura médio final de 45,4 Å<sup>2</sup> (fator temperatura médio da ImpA 52,1Å<sup>2</sup>). A presença de interações hidrofóbicas em todas posições de S<sub>1</sub> (Tabela 8) e pontes de hidrogênio em P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>5</sub> entre cadeias laterais dos resíduos da ImpA e átomos localizados na cadeia principal do NLS de Ku70, permitiram melhor “ancoragem” do peptídeo à proteína.

Valores de fator temperatura médio dos resíduos R<sup>553</sup> (36,2Å<sup>2</sup>) e K<sup>556</sup> (42,81Å<sup>2</sup>), acomodados nas posições P<sub>2</sub> e P<sub>5</sub> apresentaram-se mais baixos que o da ImpA, refletindo forte interação desses resíduos em S<sub>1</sub>, tendo como destaque as pontes de hidrogênio e uma ponte salina em o P<sub>2</sub>, e interações hidrofóbicas em P<sub>5</sub> (Tabelas 8 e 9 , figura 21B).

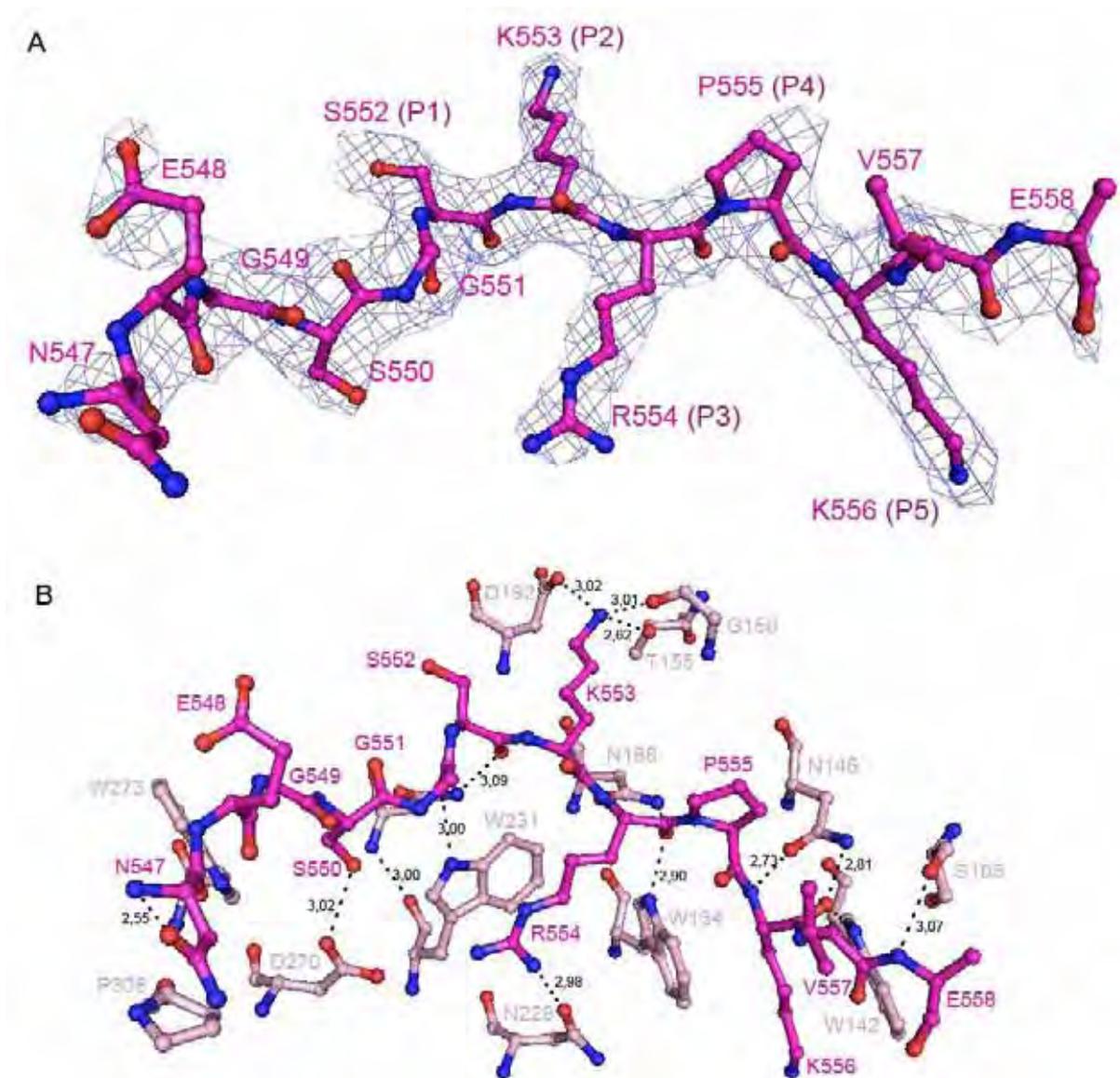


Figura 21- Peptídeo NLS Ku70. A) Mapa de densidade eletrônica  $|Fo-Fc|$ ,  $\sigma = 1.2$  para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos do mesmo; B) interações entre resíduos da ImpA e Ku70.

Em S<sub>2</sub> foi encontrada fraca densidade eletrônica para uma porção da cadeia principal, P<sub>1</sub>' e P<sub>3</sub>', em virtude do baixo sinal/ruído dos dados obtidos para essa região (Figura 22). Foi tentado adicionar resíduos a essas posições, entretanto fatores de temperatura superiores a 90 Å indicaram que a ocupação da densidade eletrônica por resíduos do peptídeo Ku70 não foi satisfatória.

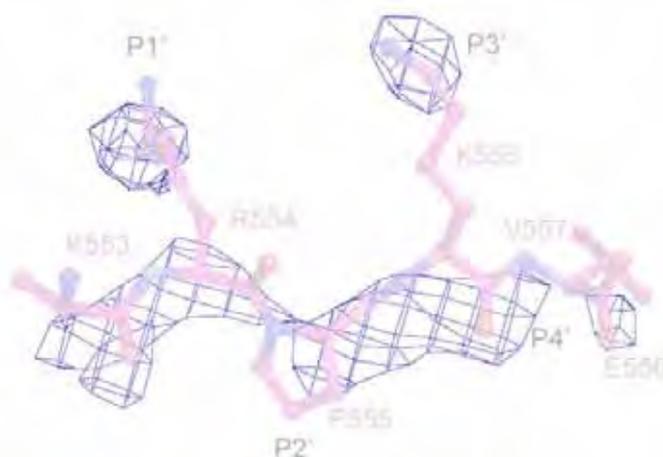


Figura 22- Peptídeo NLS Ku70 em S<sub>2</sub>, **não** foi adicionado ao modelo final. Mapa de densidade eletrônica |Fo-Fc|,  $\sigma = 1.2$  gerado na ausência do peptídeo.

#### 4.11. Ligação do peptídeo monopartido TMNLS.

O peptídeo específico para ImpA de *M. musculus*, <sup>1</sup>GSEFESPFKKKRREA<sup>15</sup>, resultado da busca em uma biblioteca de peptídeos (YANG, 2008) foi encontrado em ambos sítios de ligação e apresentaram superfície de contato entre proteína e ligante de 743,0 Å<sup>2</sup> em S<sub>1</sub> e 534,4 Å<sup>2</sup> em S<sub>2</sub> (Figura 23).

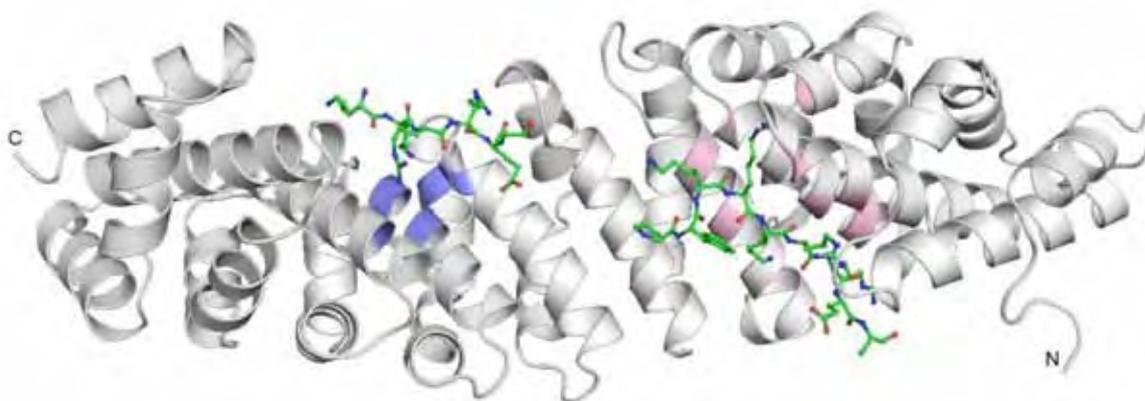


Figura 23– Representação em diagrama de fitas da Importina- $\alpha$  truncada (72-497) com peptídeo TMNLS. Hélices em rosa indicam sítio de ligação principal e em azul o sítio secundário.

Foram encontradas densidades eletrônicas para 9 resíduos (resíduos 7 -13 ) para  $S_1$  e 6 (4-8 resíduos 10-15) para  $S_2$  e ambos peptídeos ligaram-se de maneira anti-paralela à ImpA (Figura 23). O fator temperatura médio final da ImpA foi de  $52,68 \text{ \AA}^2$  enquanto os peptídeos apresentaram  $60,3$  e  $60,2 \text{ \AA}^2$  para  $S_1$  e  $S_2$  , respectivamente (Figuras 24A e 25A).

Embora o ligante apresente fatores temperatura médio superiores ao da ImpA, cabe ressaltar a importância dos resíduos  $K^{10}$ ,  $K^{11}$  e  $R^{13}$  do TMNLS, nas posições  $P_2$ ,  $P_3$  e  $P_5$  de  $S_1$ , cujos fatores de temperatura médio foram inferiores ao da ImpA (  $48,0$ ;  $39,0$  e  $49,9 \text{ \AA}^2$ , respectivamente).

Interações hidrofóbicas foram detectadas em  $P_2$  à  $P_5$  e pontes de hidrogênio em  $P_1$ ,  $P_3$  e  $P_5$  entre cadeias laterais dos resíduos da ImpA e átomos localizados na cadeia principal do TMNLS. Com a ocupação das posições  $P_3$  e  $P_4$  por resíduos positivos de cadeias longas, observou-se aumento de interações hidrofóbicas entre NLS e ImpA e pontes de hidrogênio das cadeias laterais de  $K^{11}$  e  $R^{12}$  com cadeias laterais dos resíduos da ImpA (Tabelas 8 e 9, figura 23).

Interações hidrofóbicas foram constatadas em  $P_2'$  ( $K^{10}$ - $A^{364}$ ),  $P_3'$  ( $R^{12}$ - $W^{399}$ ) e  $P_4'$  ( $E^{14}$ - $W^{357}$ ). Pontes de hidrogênio em  $P_1'$  e  $P_3'$  foram formadas entre átomos das cadeias

laterais do TMNLS e ImpA, já em P<sub>2</sub>' as pontes foram formadas entre átomos da cadeias principal do peptídeo e cadeias laterais da ImpA (Figura 24B e tabela 9). Fatores temperatura médios das posições P<sub>1</sub>' e P<sub>2</sub>' (66,52 e 60,38Å<sup>2</sup>, respectivamente), embora superiores as da ImpA, encontraram-se menores que a média do peptídeo em S<sub>2</sub>.

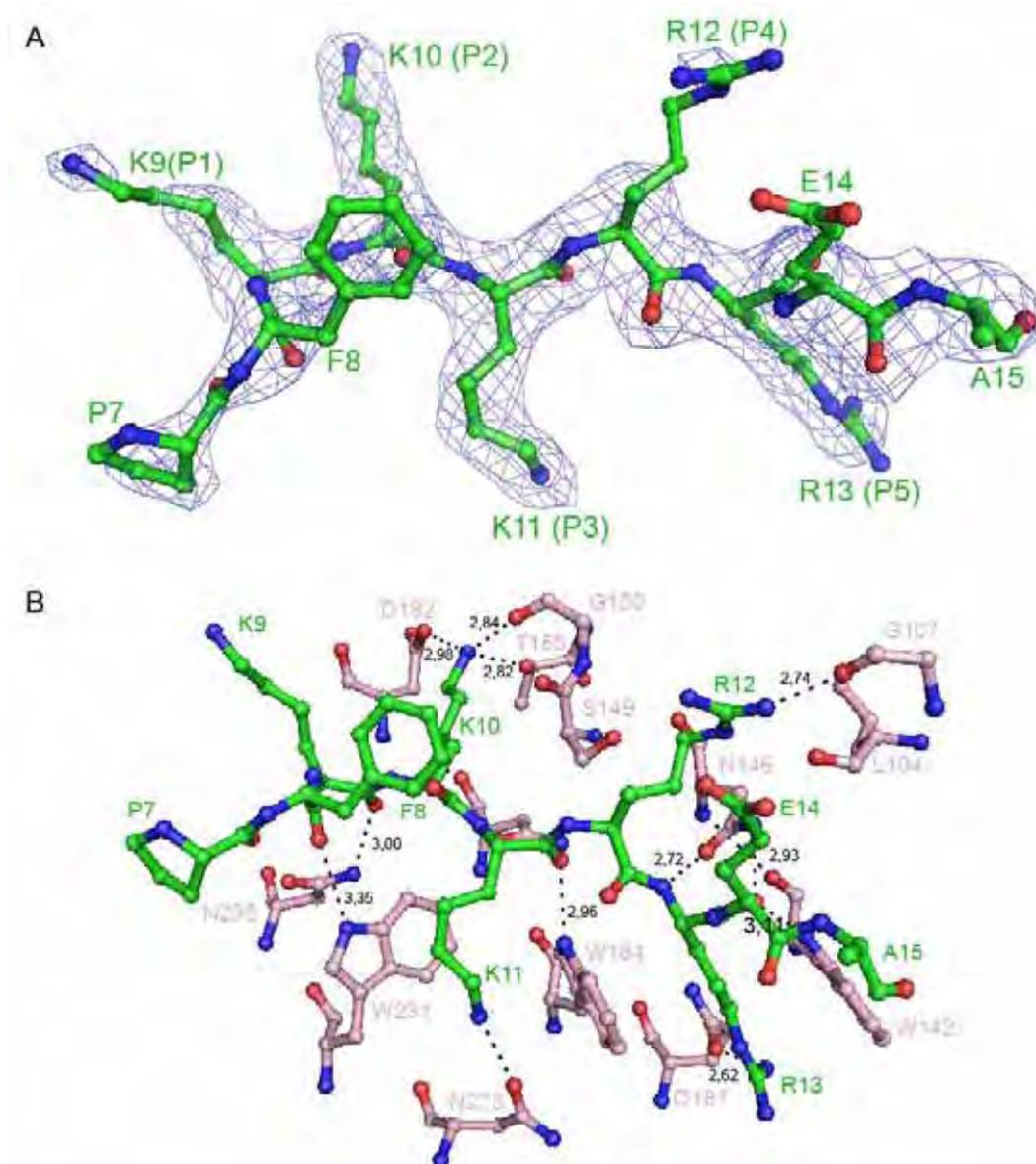


Figura 24- Peptídeo TMNLS no sítio de ligação principal. A) Mapa de densidade eletrônica  $|\text{Fo}-\text{Fc}|$ ,  $\sigma=1.2$  para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e TMNLS.

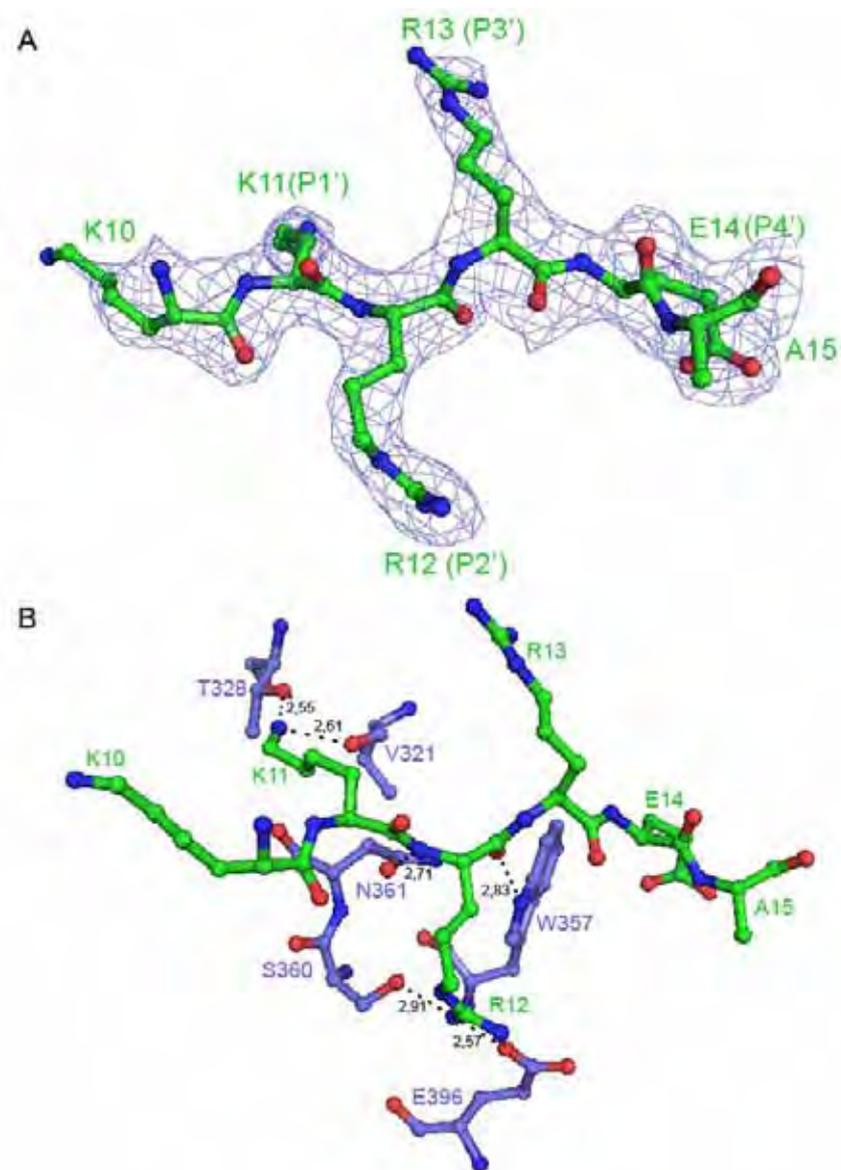


Figura 25- Peptídeo TMNLS no sítio de ligação secundário. A) Mapa de densidade eletrônica [Fo-Fc],  $\sigma = 1.2$  para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e TMNLS.

#### 4.12.Ligação do peptídeo monopartido T52NLS.

O peptídeo T52NLS, <sup>1</sup>GSEFESPIGKATREA<sup>15</sup>, resultado da busca em uma biblioteca de peptídeos específicos para ImpA de *H. sapiens* (YANG,2008), foi encontrado em ambos sítios de ligação e apresentou superfície de contato entre proteína e ligante de 628,1 Å<sup>2</sup> em S<sub>1</sub> e 455,5 Å<sup>2</sup> em S<sub>2</sub> (Figura 26).

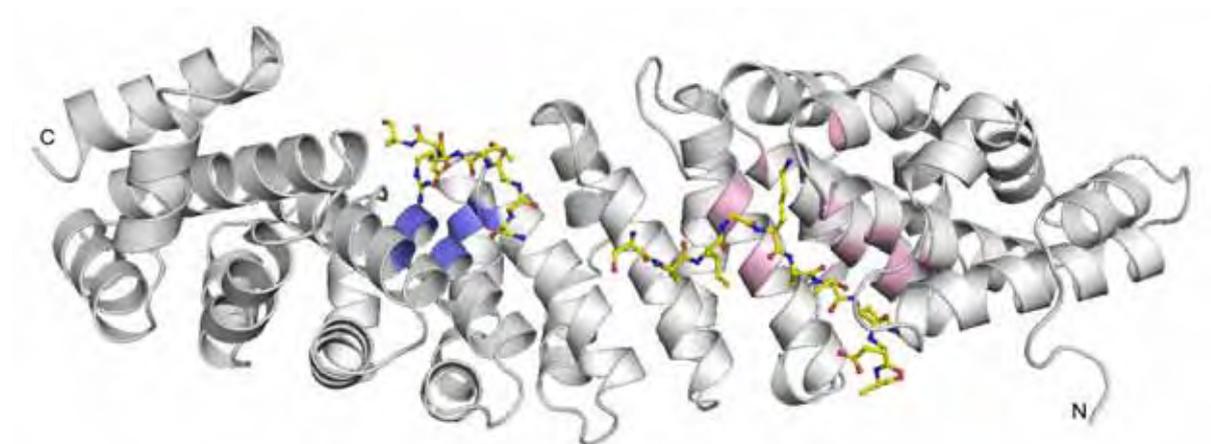


Figura 26– Representação em diagrama de fitas da Importina- $\alpha$  truncada (72-497) com peptídeo T52NLS. Hélices em rosa indicam sítio de ligação principal e em azul o sítio secundário.

Foram encontradas densidades eletrônicas para 10 resíduos (resíduos 6 -15) para S<sub>1</sub> e 6 (resíduos 10-15) para S<sub>2</sub>. (Figura 28). O fator temperatura médio final da ImpA foi de 52,13 Å<sup>2</sup> enquanto os peptídeos apresentaram 50,8 e 68,41 Å<sup>2</sup> para S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, respectivamente.

Conforme esperado, em S<sub>1</sub> o T52NLS ligou-se de maneira anti-paralela em relação a posição da ImpA. Interações hidrofóbicas foram detectadas em P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>5</sub> (Tabela 8), dentre as quais as de P<sub>3</sub> e P<sub>5</sub> apresentam-se também nos peptídeos Ku70 e TMNLS.

Pontes de hidrogênio foram presentes em P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>5</sub> entre cadeias laterais dos resíduos da ImpA e átomos localizados na cadeia principal do T52NLS (Tabela 9, figura 27B). A ocupação das posições P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub> por cadeias laterais curtas, não promoveu aumento de interações intermoleculares. Fatores de temperatura médio dos resíduos K<sup>10</sup>, A<sup>11</sup>, T<sup>12</sup> e R<sup>13</sup>

posicionados de P<sub>2</sub> a P<sub>5</sub> apresentaram os menores valores médios (40,52; 40,75; 45,37 e 55,33 Å<sup>2</sup> respectivamente) (Figura 27A).

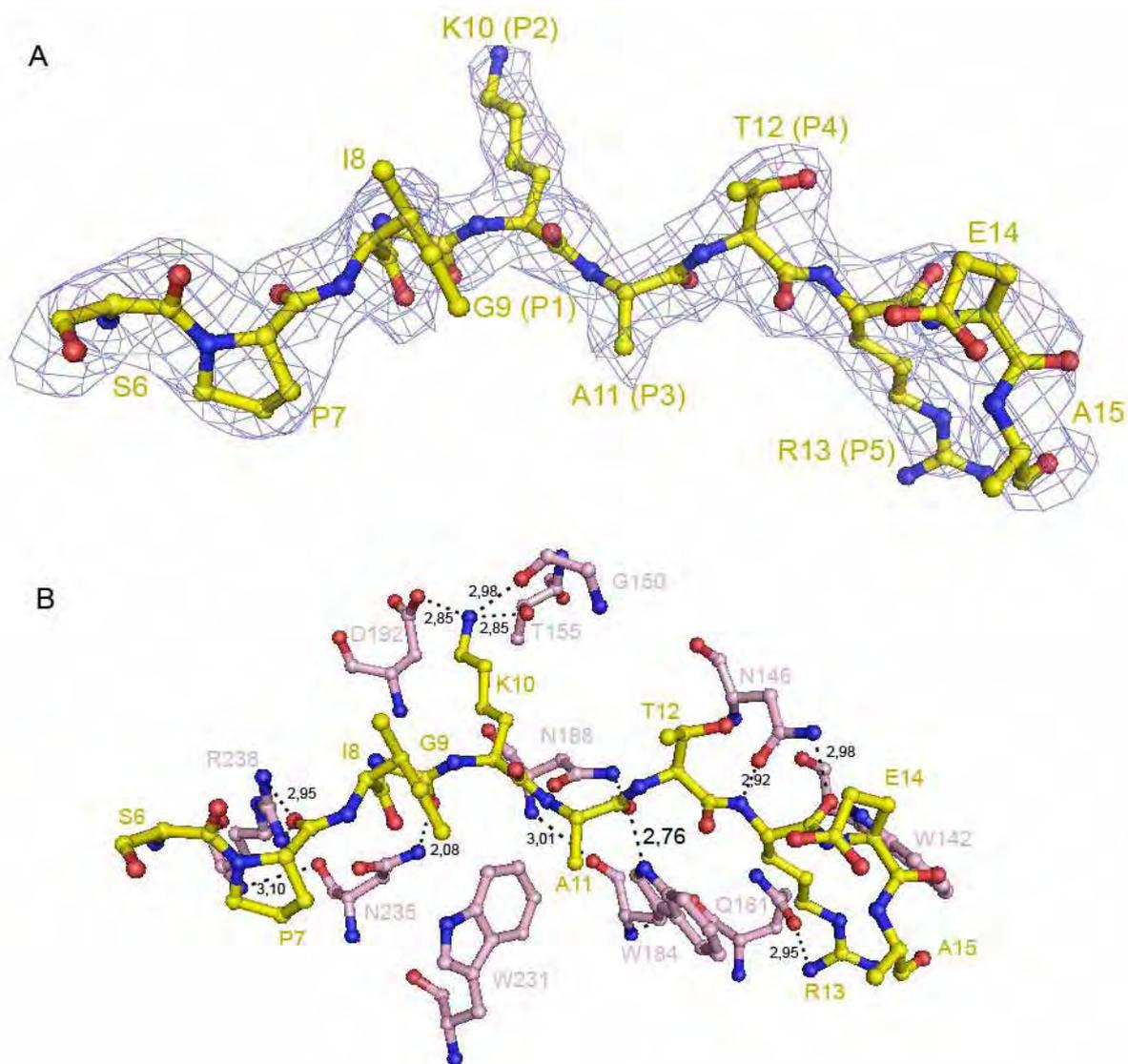


Figura 27- Peptídeo T52NLS no sítio de ligação principal. A) Mapa de densidade eletrônica  $|F_o - F_c|$ ,  $\sigma = 1.2$  para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e T52NLS.

Em todas as estruturas elucidadas até o momento, foi observado que os NLSs ligam-se à ImpA de maneira anti-paralela em relação a posição da ImpA. Surpreendentemente, o peptídeo T52NLS teve ocupação predominante em posição paralela à ImpA, em S<sub>2</sub>. Optou-se pela modelagem e refinamento do ligante na posição paralela a ImpA pois a ocupação em

modo anti-paralelo era bem mais baixa comparada com a paralela. O fator de temperatura médio do ligante no modo de ligação convencional ( $80,79 \text{ \AA}^2$ ), ou seja, antiparalelo a ImpA, foi superior ao modo alternativo ( $60,24 \text{ \AA}^2$ ) (Figura 28).

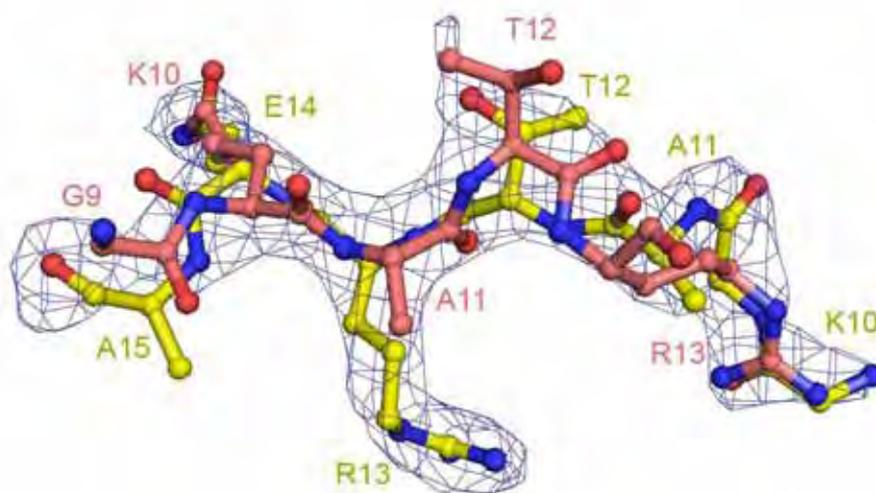


Figura 28 – Peptídeo T52NLS no sítio de ligação secundário. Mapa de densidade eletrônica  $|F_o - F_c|$ ,  $\sigma=1.2$  para o peptídeo, indicando ocupação pelos resíduos do peptídeo na forma convencional (laranja) e alternativo (amarelo).

Em  $S_2$  interações hidrofóbicas foram constatadas em somente em  $P_2'$  ( $R^{13}$ - $W^{393}$  e  $R^{13}$ - $N^{361}$ ). Pontes de hidrogênio em  $P_2'$  são formadas entre átomos das cadeias laterais do TMNLS e ImpA, já em  $P_1'$  e  $P_3'$  as pontes são formadas entre átomos da cadeia principal do peptídeo e cadeias laterais da ImpA, ao contrário do ocorrido em TMNLS. Os menores fatores de temperatura médios foram encontrados em  $E^{14}$  ( $66,52 \text{ \AA}^2$ ) e  $R^{13}$  ( $60,38 \text{ \AA}^2$ ), posicionados em  $P_1'$  e  $P_2'$  (Figura 29B).

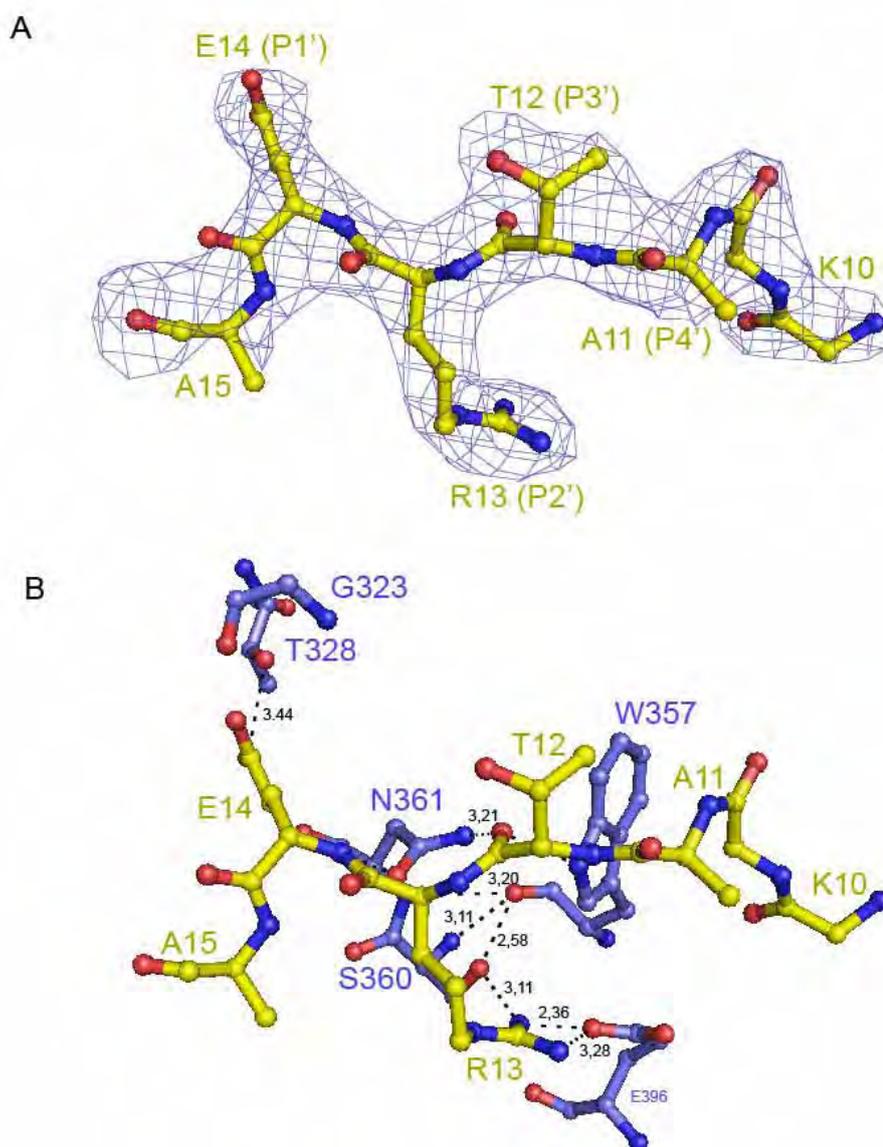


Figura 29- Peptídeo T52NLS no sítio de ligação secundário. A) Mapa de densidade eletrônica  $|F_o - F_c|$ ,  $\sigma=1.2$  para o peptídeo, indicando posições ocupadas pelos resíduos na ImpA; B) interações entre resíduos da ImpA e T52NLS.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1.Importina – $\alpha$ e o peptídeo contaminante.

A ImpA truncada N-terminalmente foi empregada nos experimentos com intuito de evitar que houvesse competição do domínio auto-inibitório com os peptídeos NLS selecionados. Entretanto foi detectada presença de um peptídeo ocupando o sítio de ligação principal da ImpA (Figura 14). Os sulcos formados pelas repetições ARM da ImpA truncada provém uma superfície carregada negativamente, rodeada por resíduos hidrofóbicos conservados, o que permite a ligação dos NLS e do(s) contaminantes.

Tanto nosso grupo quanto colaboradores na Austrália (Universidade Monash, Sydney), trabalhando independentemente, encontraram o mesmo problema de contaminação e não conseguiram resolvê-lo por completo. O emprego de duas etapas de purificação parecer ter eliminado o máximo possível de impurezas, minimizando os efeitos de contaminação e garantindo os resultados apresentados. Acredita-se que o peptídeo pouco interferiu nos resultados, caso contrário, não seria constatada interação dos peptídeos monopartidos no sítio secundário. De alguma maneira, o peptídeo era pequeno o suficiente para não ser detectado facilmente, e talvez longo o suficiente para interferir na ligação de qualquer outro peptídeo no sítio secundário, ou ainda não tenha afinidade grande o suficiente por este outro sítio.

Inicialmente, ambos os grupos buscaram identificar o peptídeo desconhecido, porém o grupo da Austrália assim o fez e não forneceu maiores informações a respeito do ligante além de sugerir ser uma seqüência correspondente a de proteína ribossomal de *E. coli*. Dessa maneira, foi dada prioridade para a co-cristalização com os peptídeos NLS.

## 5.2. Comparação do modo de ligação dos peptídeos NLS Ku70 e SV40 fosforilado.

A Ku70 é uma proteína que junto à Ku80 constituem um heterodímero que participa do mecanismo de reparo de DNA. O NLS de Ku70 (<sup>539</sup>KVTKRKHDNEGSGSKRPK<sup>556</sup>) se sobrepõe com o domínio de ligação ao DNA independente da Ku80 e consiste de uma região caracterizada por dois *clusters* de aminoácidos básicos ligados por uma região não básica. Experimentos de mutação e deleção de resíduos do NLS, a importância de todas as regiões para a importação nuclear *in vivo* foram constatadas e, dessa maneira, foi sugerido que o NLS podia ser uma variante de um NLS bipartido (KOIKE et al.,1999).

### 5.2.1.Sítio de ligação principal.

Conforme observado nos resultados obtidos, o peptídeo considerado bipartido (KOIKE et al.,1999), ligou-se somente a S<sub>1</sub>, que compreende do primeiro ao quarto motivos ARM da ImpA, onde foi encontrada densidade eletrônica para 12 resíduos (resíduos 547-558). Na superposição do peptídeo NLS de Ku70 com peptídeos monopartidos e bipartidos foi observada a tendência do peptídeo em seguir o caminho da versão fosforilada do NLS SV40 (FONTES et al., 2003b) ao invés de seguir a direção de NLS bipartidos, tal como os NLS da nucleoplasmina, RB ou N1N2 (FONTES et al., 2000, 2003a). O desvio r.m.s. dos C $\alpha$  entre os peptídeos SV40 fosforilado e Ku70 foi de 1,46Å (Figura 30), para o mesmo número de carbonos.

A modulação da importação nuclear pode ser controlada pela fosforilação, aumentando ou diminuindo a velocidade do processo entretanto nenhuma influência direta dessa fosforilação nos NLS parece ter resultados significativos para a Ku70 (KOIKE et al.,1999). Foi sugerido que o NLS de Ku70 pudesse apresentar fosforilação do resíduo S<sup>552</sup>

pela proteína quinase C, porém sua mutação não influenciou na regulação da importação nuclear (KOIKE et al.,1999), ao contrário do observado em ensaios com ImpA e o peptídeo SV40 (FONTES et al., 2003b).

Observando interações de ambos peptídeos com os resíduos da região S<sub>1</sub>, há em comum a formação das mesmas pontes de hidrogênio nas posições P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> (somente com a cadeia principal do peptídeo) e P<sub>5</sub> (Tabela 9), mas deve-se levar em consideração também as interações hidrofóbicas de ambos peptídeos em P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>5</sub> (Tabelas 10 e 11).



Figura 30- Superposição dos peptídeos NLS Ku70 (rosa), SV40P (cinza) e nucleoplasmina (azul), em que estão indicados resíduos que ocupam S<sub>1</sub> (P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub>) e S<sub>2</sub> (P<sub>1</sub>'-P<sub>4</sub>').

### 5.2.2.O suposto “*linker*” para a Ku70.

A região básica, que une os dois clusters de resíduos básicos, teoricamente apresenta comprimento suficiente para alcançar o S<sub>2</sub>, porém apresenta algumas características que o diferencia do que tem sido observado nos *linkers* de peptídeos bipartidos. I) apresenta muitos resíduos curtos e hidrofílicos próximos a S<sub>1</sub>, o que resulta numa região mais flexível e com menor possibilidade de formar interações com a ImpA, fato este também observado em relação a seqüência da SV40P (<sup>110</sup>PGSDDEAAADAQHAAPPKKKRKV<sup>132</sup>); II) Para que o segundo cluster de resíduos básicos alcance S<sub>2</sub>, a posição P<sub>2</sub>' seria ocupada por valina ao invés de lisina (Tabela 14), o que não garante boa estabilidade do NLS nessa região uma vez que uma das posições chave de S<sub>2</sub> é P<sub>2</sub>' (FONTES et al., 2003b).

Não foi constatada nenhuma densidade eletrônica que pudesse indicar um sítio alternativo de ligação de NLS. Contudo, é interessante observar que o caminho seguido por ambos ligantes é permeado por resíduos hidrofóbicos e consiste de uma porção apolar da ImpA, os quais interagem com parte da região não básica do peptídeo de Ku70 (Figura 31). Contatos hidrofóbicos W<sup>273</sup> e P<sup>308</sup> são comuns aos ligantes o que permite destacá-los como importantes para que os sigam essa configuração (Figura 32).

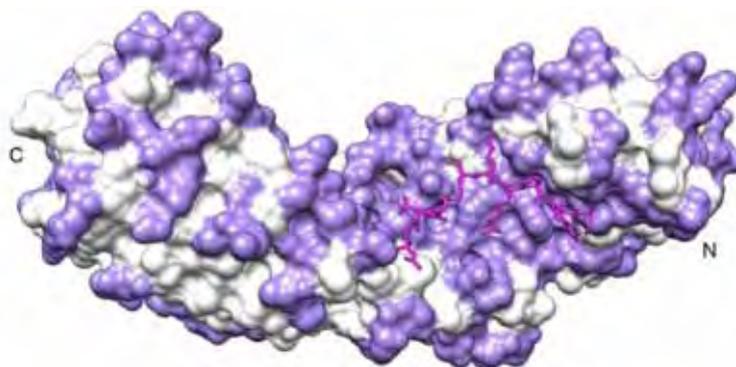


Figura 31- Superfície da ImpA com o peptídeo Ku70. Em destaque regiões polares (roxo) e apolares (branco) da proteína.

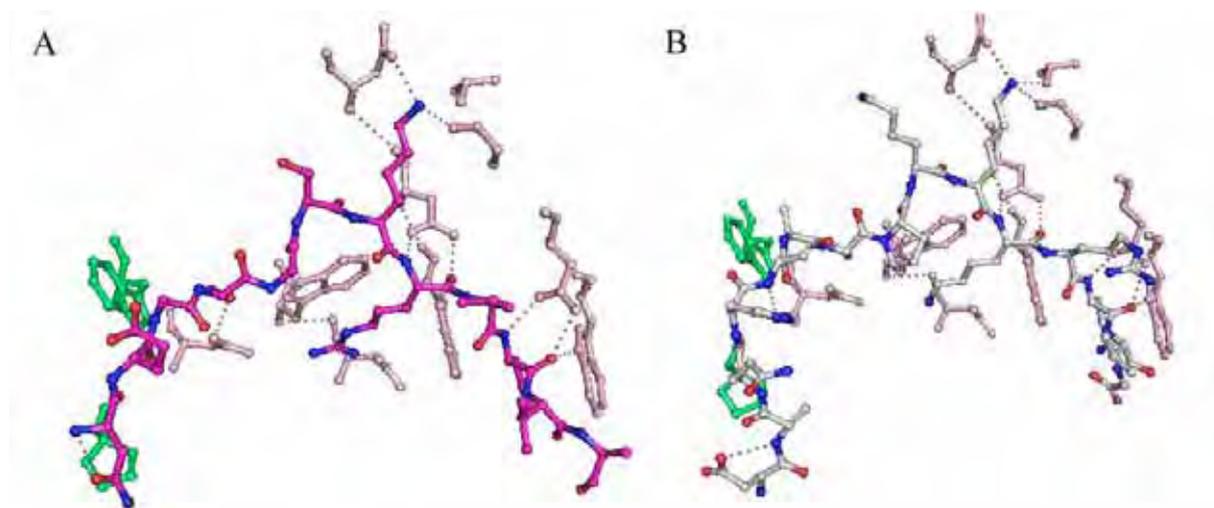


Figura 32- Resíduos que interagem com os peptídeos NLS. A-Ku70 (rosa); B- SV40P (cinza). Em verde estão destacados resíduos W<sup>273</sup> e P<sup>308</sup> com os quais os NLS interagem, adotando as conformações observadas.

Tabela 10- Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS monopartidos do sítio de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos.

	modelo >	TMNLS- ImpA	T52NLS - ImpA	Ku70 - ImpA	PLSCR- ImpA	c-Myc- ImpA	SV40P- ImpA
Sítio secundário (S <sub>2</sub> )	posição						
	P1'						
	P2'	R <sup>12</sup> -W <sup>399</sup>	R <sup>13</sup> -W <sup>399</sup> R <sup>13</sup> -N <sup>361</sup>	-	-	-	-
	P3'						
	P4'	E <sup>14</sup> -W <sup>357</sup>					
Sítio principal (S <sub>1</sub> )	P <sub>1</sub>			S <sup>552</sup> -W <sup>231</sup>			K <sup>127</sup> -R <sup>238</sup>
	P <sub>2</sub>	K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -S <sup>149</sup>	K <sup>10</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>10</sup> -W <sup>231</sup>	K <sup>553</sup> -D <sup>192</sup>	K <sup>2</sup> -D <sup>192</sup>	K <sup>323</sup> -D <sup>192</sup>	K <sup>128</sup> -D <sup>192</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>11</sup> -W <sup>231</sup> K <sup>11</sup> -W <sup>184</sup>	A <sup>11</sup> -W <sup>231</sup>	R <sup>554</sup> -W <sup>231</sup>	I <sup>3</sup> -W <sup>231</sup> I <sup>3</sup> -W <sup>184</sup>	R <sup>324</sup> -W <sup>231</sup>	K <sup>129</sup> -W <sup>231</sup>
	P <sub>4</sub>	R <sup>12</sup> -P <sup>110</sup> R <sup>12</sup> -N <sup>146</sup>		P <sup>555</sup> -S <sup>149</sup> P <sup>555</sup> -N <sup>146</sup> P <sup>555</sup> -W <sup>184</sup>	S <sup>4</sup> -S <sup>149</sup> S <sup>4</sup> -N <sup>146</sup> S <sup>4</sup> -W <sup>184</sup>		R <sup>130</sup> -P <sup>110</sup> R <sup>130</sup> -S <sup>149</sup> R <sup>130</sup> -N <sup>146</sup>
	P <sub>5</sub>	R <sup>13</sup> -W <sup>184</sup> R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup>	R <sup>13</sup> -W <sup>184</sup> R <sup>13</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>556</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>556</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>5</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>5</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>326</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>326</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>131</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>131</sup> -W <sup>142</sup>
		E <sup>14</sup> -S <sup>105</sup>					

Tabela 11- Interações hidrofóbicas entre ImpA em peptídeos NLS bipartidos nos sítio de ligação principal e secundário . Em vermelho foram destacadas interações em comum entre modelos.

	modelo>	N1N2- ImpA	RB - ImpA	Nucleoplasmina - ImpA
Sítio secundário (S2)	posição			
	P1'			
	P2'	R <sup>538</sup> -W <sup>399</sup>	R <sup>862</sup> -W <sup>399</sup>	R <sup>156</sup> -W <sup>399</sup>
	P3'	K <sup>539</sup> -T <sup>322</sup>		P <sup>157</sup> -T <sup>322</sup>
	P4'		A <sup>864</sup> -W <sup>357</sup>	
Sítio principal (S1)	P <sub>1</sub>	-	-	-
	P <sub>2</sub>	K <sup>551</sup> -D <sup>192</sup>	K <sup>874</sup> -D <sup>192</sup>	K <sup>167</sup> -D <sup>192</sup>
		K <sup>10</sup> -S <sup>149</sup>	K <sup>874</sup> -S <sup>149</sup>	K <sup>167</sup> -S <sup>149</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>552</sup> -W <sup>231</sup>	A <sup>11</sup> -W <sup>231</sup>	K <sup>168</sup> -W <sup>231</sup>
	P <sub>4</sub>	S <sup>4</sup> -S <sup>149</sup>	L <sup>876</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>169</sup> -P <sup>110</sup>
			L <sup>876</sup> -S <sup>149</sup>	
P <sub>5</sub>	K <sup>554</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>554</sup> -W <sup>142</sup>	R <sup>877</sup> -W <sup>184</sup> R <sup>877</sup> -W <sup>142</sup>	K <sup>170</sup> -W <sup>184</sup> K <sup>170</sup> -N <sup>146</sup>	

Tabela 12- Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS monopartidos e ImpA , nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos.

Modelo>		SV40 xImpA		PLSCR x ImpA		c-Myc x ImpA	
cadeia do ligante >		principal	lateral	principal	lateral	principal	lateral
Sítio secundário (S <sub>2</sub> )	P <sub>1</sub> '		K <sup>127</sup> -V <sup>321</sup> K <sup>127</sup> -T <sup>328</sup> K <sup>127</sup> -N <sup>361</sup>				
	P <sub>2</sub> '	K <sup>128</sup> -N <sup>361</sup> K <sup>128</sup> -W <sup>357</sup>	K <sup>128</sup> -E <sup>396</sup>	-	-	-	-
	P <sub>3</sub> '						
	P <sub>4</sub> '						
	P <sub>1</sub>	K <sup>127</sup> -N <sup>235</sup>	-	G <sup>9</sup> -N <sup>235</sup>	-	A <sup>322</sup> -N <sup>235</sup>	
Sítio principal (S <sub>1</sub> )	P <sub>2</sub>	-	K <sup>128</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>128</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>128</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>2</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>2</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>2</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>323</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>553</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>553</sup> -T <sup>155</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>129</sup> -N <sup>188</sup> K <sup>129</sup> -W <sup>184</sup>	-	I <sup>3</sup> -N <sup>188</sup> I <sup>3</sup> -W <sup>184</sup>	-	R <sup>554</sup> -N <sup>188</sup> R <sup>554</sup> -W <sup>184</sup>	R <sup>324</sup> -N <sup>228</sup> R <sup>324</sup> -D <sup>270</sup>
	P <sub>4</sub>	-	R <sup>130</sup> -L <sup>104</sup> R <sup>130</sup> -R <sup>106</sup>	-	-	-	-
	P <sub>5</sub>	K <sup>131</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>131</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>131</sup> -Q <sup>181</sup>	K <sup>5</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>5</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>5</sup> -Q <sup>181</sup>	K <sup>556</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>556</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>556</sup> -Q <sup>181</sup>

Tabela 13- Interações tipo pontes de hidrogênio entre peptídeos NLS bipartidos e ImpA , nos sítios de ligação principal e secundário. Em vermelho foram destacadas interações comum a todos modelos.

Modelo>		N1N2 xImpA		RB x ImpA		nucleoplasmina x ImpA	
cadeia do ligante >		principal	lateral	principal	lateral	principal	lateral
Sitio secundário (S <sub>2</sub> )	P <sub>1</sub> '		K <sup>537</sup> -V <sup>321</sup> K <sup>537</sup> -T <sup>328</sup>		K <sup>861</sup> -V <sup>321</sup> K <sup>861</sup> -T <sup>328</sup>	K <sup>155</sup> -N <sup>361</sup>	
	P <sub>2</sub> '	R <sup>538</sup> -N <sup>361</sup>	R <sup>538</sup> -E <sup>396</sup> R <sup>538</sup> -S <sup>60</sup>	R <sup>862</sup> -W <sup>357</sup> R <sup>862</sup> -N <sup>361</sup>	R <sup>862</sup> -E <sup>396</sup>	R <sup>156</sup> -W <sup>357</sup>	W <sup>156</sup> -E <sup>396</sup>
	P <sub>3</sub> '						
	P <sub>4</sub> '					T <sup>160</sup> -R <sup>315</sup>	
Sitio principal (S <sub>1</sub> )	P <sub>1</sub>	K <sup>127</sup> -N <sup>235</sup>	-	G <sup>9</sup> -N <sup>235</sup>	-	A <sup>322</sup> -N <sup>235</sup>	
	P <sub>2</sub>	-	K <sup>128</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>128</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>128</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>2</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>2</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>2</sup> -T <sup>155</sup>	-	K <sup>323</sup> -G <sup>150</sup> K <sup>553</sup> -D <sup>192</sup> K <sup>553</sup> -T <sup>155</sup>
	P <sub>3</sub>	K <sup>129</sup> -N <sup>188</sup> K <sup>129</sup> -W <sup>184</sup>	-	I <sup>3</sup> -N <sup>188</sup> I <sup>3</sup> -W <sup>184</sup>	-	R <sup>554</sup> -N <sup>188</sup> R <sup>554</sup> -W <sup>184</sup>	R <sup>324</sup> -N <sup>228</sup> R <sup>324</sup> -D <sup>270</sup>
	P <sub>4</sub>	-	R <sup>130</sup> -L <sup>104</sup> R <sup>130</sup> -R <sup>106</sup>	-	-	-	-
	P <sub>5</sub>	K <sup>131</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>131</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>131</sup> -Q <sup>181</sup>	K <sup>5</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>5</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>5</sup> -Q <sup>181</sup>	K <sup>556</sup> -W <sup>142</sup> K <sup>556</sup> -N <sup>146</sup>	K <sup>556</sup> -Q <sup>181</sup>

### 5.3.Comparação do modo de ligação do peptídeo TMNLS com peptídeos NLS.

O peptídeo TMNLS (<sup>1</sup>GSEFESPFKKRREA<sup>15</sup>), foi selecionado a partir da construção de uma biblioteca de peptídeos específica para ImpA de *M. musculus*, isoforma 2. (YANG, 2008). Esses peptídeos foram desenhados tendo como base resíduos do antígeno T-da SV40 posicionados em torno do NLS, a partir da qual seqüências de NLS promissoras pudessem ser obtidas (GSEFESPXXXXXXEA, onde X representa qualquer resíduo, exceto cisteína e triptofano).

### 5.3.1. Sítio de ligação principal (S<sub>1</sub>).

Experimentos de cristalografia constataram a presença do peptídeo monopartido no sítio S<sub>1</sub> da ImpA. Conforme esperado, a posição de TMNLS foi similar a do NLS SV40 (<sup>126</sup>PKKKRKV<sup>132</sup>), apresentando desvio r.m.s. dos C $\alpha$  de 0,38 Å, que indicou pequenas variações de posição entre si (Figura 33). A presença do resíduo de arginina ao invés de lisina na posição P<sub>5</sub> aparentemente não resultou em diferenças significativas em relação as interações intermoleculares. Nas cadeias laterais dos resíduos da ImpA situados nas posições de S<sub>1</sub>, tanto pontes de hidrogênio, quanto interações hidrofóbicas são equivalentes em ambos ligantes (Tabelas 10 e 12).

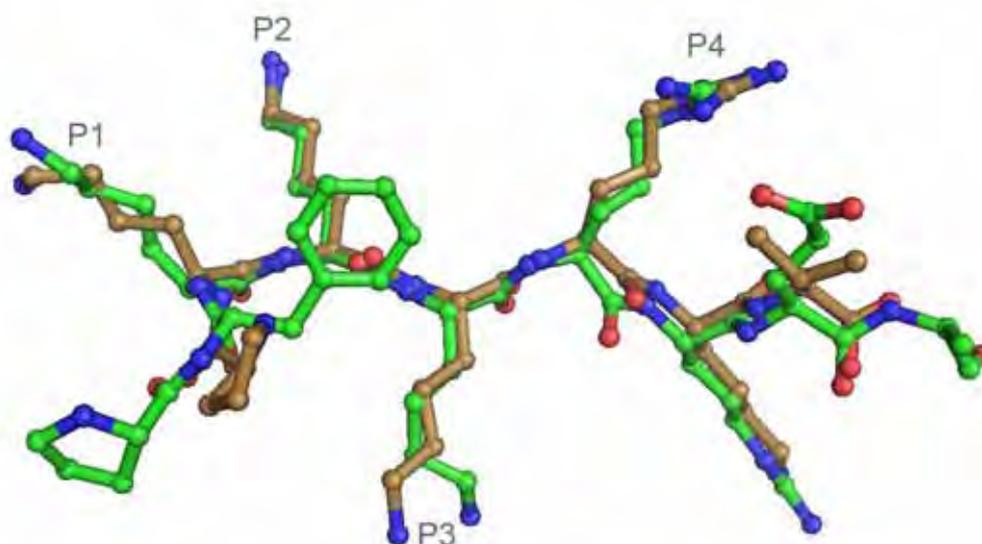


Figura 33 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e TMNLS (verde), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S<sub>1</sub>.

Embora obtido de uma biblioteca que teve como modelo resíduos que flanqueiam o NLS de SV40, o peptídeo TMNLS apresenta semelhança ao peptídeo NLS de c-Myc (<sup>320</sup>PAAKRVKLD<sup>328</sup>). O desvio r.m.s entre os C $\alpha$  das posições P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub> foi de 0,42Å entre os ligantes indicando algumas diferenças de posição quando comparado a SV40 porém ambos apresentam uma prolina duas posições antecedendo P<sub>1</sub>. (Tabela 14), característica esta

constatada importante em c-Myc para o reconhecimento desse NLS para importação nuclear (MAKKERH et al., 1996). Aparentemente a interação hidrofóbica da P<sup>7</sup> com o resíduo W<sup>273</sup> da ImpA nessa posição pode ajudar a no reconhecimento do NLS.

Tabela 14- Peptídeos NLS e sítios de ligação na ImpA [S1 (P2-P5) e S2 (P1'-P4')]. Posições sinalizadas completamente em amarelo correspondem a resíduos hidrofóbicos na sua grande maioria; hachuras amarelas indicam resíduos anfipáticos.; resíduos coloridos indicam posições mais importantes; resíduos em cinza não se ligam ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da ImpA elucidadas por cristalografia.

	P1'	P2'	P3'	P4'		Linker	P1	P2	P3	P4	P5								
SV40	K	K	R	K	V		S	P	K	K	R	K	V						
TMNLS	K	R	R	E	A		P	F	K	K	R	R	E	A					
T52NLS	E	R	T	A	K	G	S	P	I	G	K	A	T	R	E	A			
C-MYC	K	R	V	K			P	A	A	K	R	V	K	L	D				
PLSCR							S	G	K	I	S	K	H	W	T	G	I		
N1N2	K	R	K	T	E	E	E	S	P	L	K	D	K	A	K	K	S	K	G
RB	K	R	S	A		E	G	S	N	P	P	K	P	L	K	K	L	R	G
Nuc	K	R	P	A		A	T	K	K	A	G	Q	A	K	K	K	K	K	
Ku70	K	V	T	K	R	K	H	D	N	E	G	S	G	S	K	R	P	K	

### 5.3.2. Sítio de ligação secundário (S<sub>2</sub>).

Além da presença do TMNLS em S<sub>1</sub>, foi observada a presença do peptídeo também em S<sub>2</sub> da ImpA. Deve-se ressaltar que a presença do peptídeo em S<sub>2</sub> foi resultado de um excesso do ligante presente no experimento, para garantir a interação do mesmo com a ImpA, o que não ocorreria com experimentos com NLS *in vivo*.

A superposição entre peptídeos TMNLS e SV40 nesse sítio resultou em um desvio r.m.s. dos C $\alpha$  de 1,25Å, indicando maiores diferenças de posição que em S<sub>1</sub> (Figura 34). Contatos intermoleculares em comum foram observados somente entre ligantes e cadeias laterais da ImpA na posições P<sub>1</sub>' e P<sub>2</sub>' para pontes de hidrogênio e P<sub>2</sub>' e P<sub>4</sub>' para interações hidrofóbicas com resíduos W<sup>399</sup> e W<sup>357</sup> da ImpA, respectivamente.

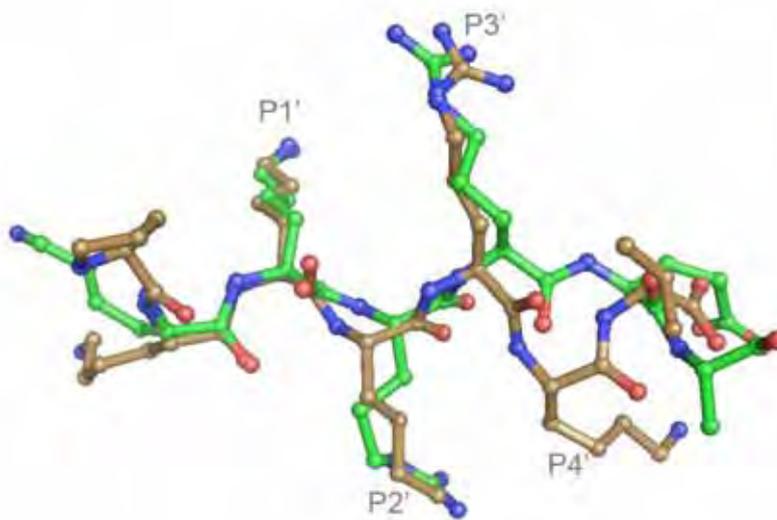


Figura 34 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e TMNLS (verde), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em  $S_2$ .

Quando os resíduos que ocupam  $S_2$  foram superpostos com os resíduos de NLS bipartidos que ocupavam as mesmas posições ( $P_1'$  a  $P_4'$ ), houve diferença de 0,3, 0,5 e 0,7Å para os peptídeos NLS N1N2, RB e nucleoplasmina, respectivamente. Há em comum a todos ligantes bipartidos e o TMNLS um resíduo de arginina em  $P_2'$  que forma ponte salina com o conservado  $E^{396}$  e interação hidrofóbica com  $W^{399}$ . Este fato deve garantir uma maior afinidade deste resíduo no sítio secundário da proteína. Embora presente em todos os ligantes, o resíduo lisina ocupando  $P_1'$  não apresentou interações comuns a todos os peptídeos, possivelmente em virtude da necessidade da ocupação da posição anterior a  $P_1'$  por algum resíduo que confira maior estabilidade ao NLS. Apesar disso, uma ponte de hidrogênio com resíduo  $N^{361}$  da ImpA encontra-se presente na maioria dos ligantes, o que pode indicar a importância do mesmo (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Somente a presença de resíduos básicos ocupando essas posições pareceu não garantir uma boa interação em  $S_2$ . Possivelmente resíduos que próximos esses sítios de ligação também são importantes para uma eficiência de interação.

## 5.4.Comparação do modo de ligação do peptídeo T52NLS com peptídeos monopartidos.

### 5.4.1.Sítio de ligação principal (S<sub>1</sub>).

Ao contrário da SV40 (<sup>126</sup>PKKKRKV<sup>132</sup>), o peptídeo TMNLS apresenta poucos resíduos básicos, entretanto a superposição entre ambos peptídeos resultou em um desvio r.m.s. dos C $\alpha$  de 0,86Å, indicando diferenças de posição dos C $\alpha$  entre os resíduos presentes em S<sub>1</sub>, quando comparadas ao observado com o TMNLS (Figura 35). Os resíduos posicionados de P<sub>2</sub> à P<sub>5</sub> apresentaram os menores valores médios do fator de temperatura comparados ao fator de temperatura médio da ImpA, o que mostra que embora apresentando menos resíduos básicos, o peptídeo T52NLS apresentou uma boa acomodação em S<sub>1</sub>.

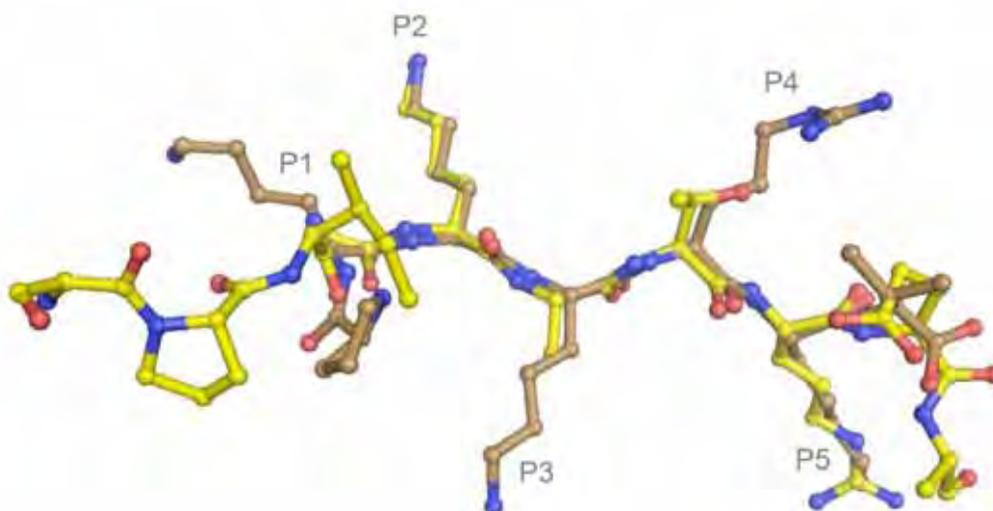


Figura 35 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e T52NLS (amarelo), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S<sub>1</sub>.

Quando comparado ao TMNLS, o T52NLS apresenta desvio r.m.s dos C $\alpha$  de 0,42 Å. Ambos apresentam muito contatos intermoleculares em comum (Tabela 8 e 9), entretanto, mesmo com um maior número de contatos, o T52NLS parece ter feito contatos mais estáveis, apresentando menores fatores de temperatura médio para os resíduos que ocupam as posições

em S<sub>1</sub> como em P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> em que a K<sup>11</sup> e R<sup>13</sup> do TMNLS apresentaram valores médios de 48,0 e 39,0 Å<sup>2</sup>, respectivamente, enquanto os resíduos K<sup>10</sup> e A<sup>11</sup> do T52NLS apresentaram os valores médios para P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> de 40,5 e 40,7 Å<sup>2</sup>, respectivamente.

Foi proposto por Chen em 2005 que a ocupação de P<sub>1</sub> pela glicina da PLSCR1 permite maior flexibilidade do NLS e, conseqüentemente melhor acomodação do mesmo e que um resíduo de isoleucina ocupando P<sub>3</sub> indique a importância de interações hidrofóbicas nessa posição. O peptídeo T52NLS apresenta características similares ao NLS de PLSCR1 (<sup>257</sup>GKISK<sup>262</sup>) e desvio r.m.s. entre os C $\alpha$  dos ligantes de 0,28 Å. Ambos apresentam o resíduo glicina ocupando P<sub>1</sub>, e um resíduo hidrofóbico curto ocupando P<sub>3</sub> (Figura 36).

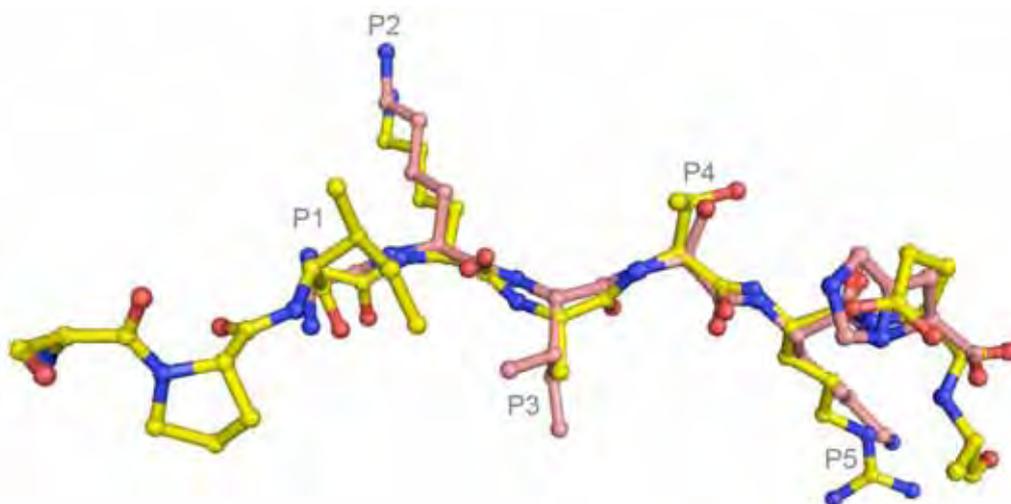


Figura 36 – Superposição entre peptídeos NLS PLSCR (rosa) e T52NLS (amarelo), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.

Além das características em comum ao NLS não clássico de PLSCR1, há semelhanças do T52NLS com peptídeo NLS de c-Myc (<sup>320</sup>PAAKRVKLD<sup>328</sup>). O desvio r.m.s entre os C $\alpha$  das posições P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub> foi de 0,42Å entre os ligantes indicando maiores diferenças de posição quando comparado ao PLSCR1 porém ambos apresentam a ocupação de P<sub>1</sub> por um resíduo flexível e neutro, e uma prolina duas posições antecedendo P<sub>1</sub> (Tabela 14).

Embora não apresente um resíduo hidrofóbico em P<sub>3</sub>, a c-Myc apresenta um resíduo neutro e hidrofóbico em P<sub>4</sub> e, conforme Makkerh e colaboradores em 1996, ao contrário do NLS de SV40, a c-Myc requer resíduos não neutros e até ácidos em posições específicas para seu reconhecimento. Dessa maneira fica clara que a presença de muitos resíduos básicos não é essencial para um NLS, desde que existam ao menos dois ocupando posições P<sub>2</sub> e P<sub>5</sub>. Podem existir várias seqüências não clássicas dependente de outras características para seu reconhecimento, o que pode ser facilmente compreendido uma vez que existem diversas isoformas da ImpA, inclusive com atividades tecido específicas (KOHLENER et al., 1999). Isso pode sugerir a existência de uma ou mais classes de peptídeos NLS, conforme proposto recentemente por Kosugi e colaboradores (KOSUGI et al., 2008b).

#### **5.4.2 Sítio de ligação secundário (S<sub>2</sub>).**

Experimentos de cristalografia detectaram a presença do peptídeo T52NLS em ambos sítios de ligação de NLS da ImpA. Deve-se destacar que, assim como ocorrido com o peptídeo TMNLS, a presença do peptídeo em S<sub>2</sub> foi resultado de um excesso do ligante presente no experimento, para garantir a interação do mesmo com a ImpA, o que não talvez não ocorresse em experimentos com NLS *in vivo*.

Em todas as estruturas elucidadas até o momento os NLS ligam-se à ImpA de maneira anti-paralela em relação a posição da ImpA (FONTES et al., 2000, 2003a, 2003b). Durante processo de modelagem e refinamento, optou-se por adicionar o ligante na posição paralela a ImpA pois a ocupação em modo anti-paralelo não foi satisfatória o suficiente comparada ao modo convencional pois fatores temperatura ficaram muito acima da média da ImpA e refinamento de ocupação não garantiam a presença do ligante no modo convencional.

Embora posicionado de maneira alternativa (Figura 37), esse peptídeo apresenta em comum com resíduos de NLSs bipartidos a ocupação de P<sub>2</sub>' por um resíduo de arginina, o qual apresenta ponte salina com E<sup>396</sup> e interação hidrofóbica com W<sup>399</sup>. Pode-se constatar então, a importância da ocupação da posição P2' no reconhecimento de um NLS bipartido. (Tabelas 10 e 12)

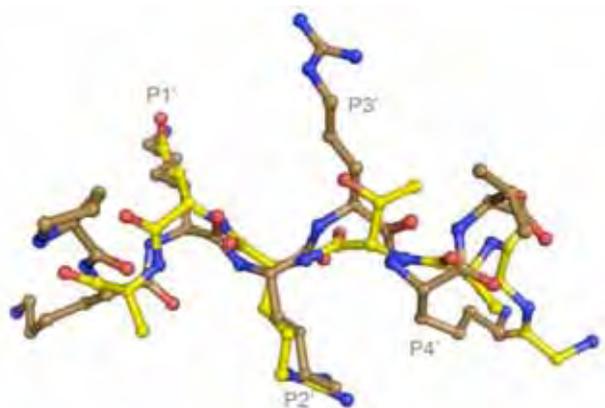


Figura 37 – Superposição entre peptídeos NLS SV40 (dourado) e T52NLS (amarelo), indicando as posições que seus resíduos ocuparam em S1.

### 5.5. Resíduos chave da Importina – $\alpha$ na importação nuclear.

A superposição das três estruturas indicou poucas diferenças entre as mesmas. Nenhum peptídeo alterou bruscamente a conformação da ImpA, mesmo na presença do peptídeo Ku70 que comportou-se de maneira similar ao observado com o peptídeo de SV40 fosforilado (FONTES et al., 2003b).

Resíduos da ImpA foram destacados como apresentando importante papel no reconhecimento de seqüência de importação nuclear (KOBÉ, 1999, FONTES et al., 2000). Ao comparar estruturas elucidadas até o presente momento, foi possível inferir resíduos essenciais em S<sub>1</sub> (Tabelas 9-11; figura 40). I) Resíduos W<sup>142</sup>, N<sup>146</sup>, W<sup>184</sup>, N<sup>188</sup> e N<sup>235</sup> interagem com átomos da cadeia principal do NLS através de pontes de hidrogênio, possibilitando acomodação do mesmo como um todo; II) Os resíduos G<sup>150</sup>, T<sup>155</sup>, D<sup>192</sup> são os que formam

pontes de hidrogênio com o átomos da extremidade da cadeia lateral de resíduos de lisina dos NLS acomodados em  $P_2$ , posição essa já observada anteriormente como essencial para importação nuclear; III) Resíduo  $Q^{181}$ , que faz ponte de hidrogênio com nitrogênio da extremidade de resíduos de lisina ou arginina posicionados em  $P_5$ ; IV) Interações hidrofóbicas dos resíduos  $W^{142}$  e  $W^{184}$  com a cadeia lateral resíduo do NLS que ocupar  $P_5$ ; V) Resíduos  $W^{231}$  e  $D^{192}$  que realizam interações hidrofóbicas com resíduos do NLS em  $P_3$  e  $P_2$ , respectivamente.

Em relação ao sítio secundário há resíduos conservados os quais aparecem sempre interagindo com os resíduos constituintes de um NLS bipartido. Foi dado destaque a  $P_2'$ , em virtude dos outros resíduos da ImpA que constituem  $S_2$  não apresentarem interações com todos ligantes estudados: I) O resíduo  $N^{361}$  e formando pontes de hidrogênio com átomos da cadeia principal do NLS em  $P_2'$ ; II) O resíduo  $E^{396}$ , que forma ponte salina com átomos de nitrogênio posicionados nas extremidades de resíduos básicos do NLS em  $P_2'$ ; III) O  $W^{357}$  que apresenta interações hidrofóbicas com resíduos longos posicionados também em  $P_2'$ .

Pouco podemos inferir com os dados cristalográficos obtidos até o momento sobre os resíduos da ImpA da região que constitui o *linker*. É uma região positivamente carregada, o que não favorece a presença de muitos resíduos básicos e não foram observadas interações intermoleculares significativas, isto é, comuns a todas estruturas de ImpA cristalizadas na presença de peptídeos NLS. Conforme Fontes e colaboradores, essa região C-terminal do linker apresenta importância, contudo até o momento as interações intermoleculares são específicas para cada NLS (FONTES et al, 2003a).

Todos os resíduos destacados, tanto em  $S_1$  quanto em  $S_2$ , encontram-se conservados em animais, conforme pode ser observado no alinhamento dessas seqüências (Figuras 38 e 39). Dessa maneira, a interação dos NLSs com esses resíduos chave parece ser essencial para



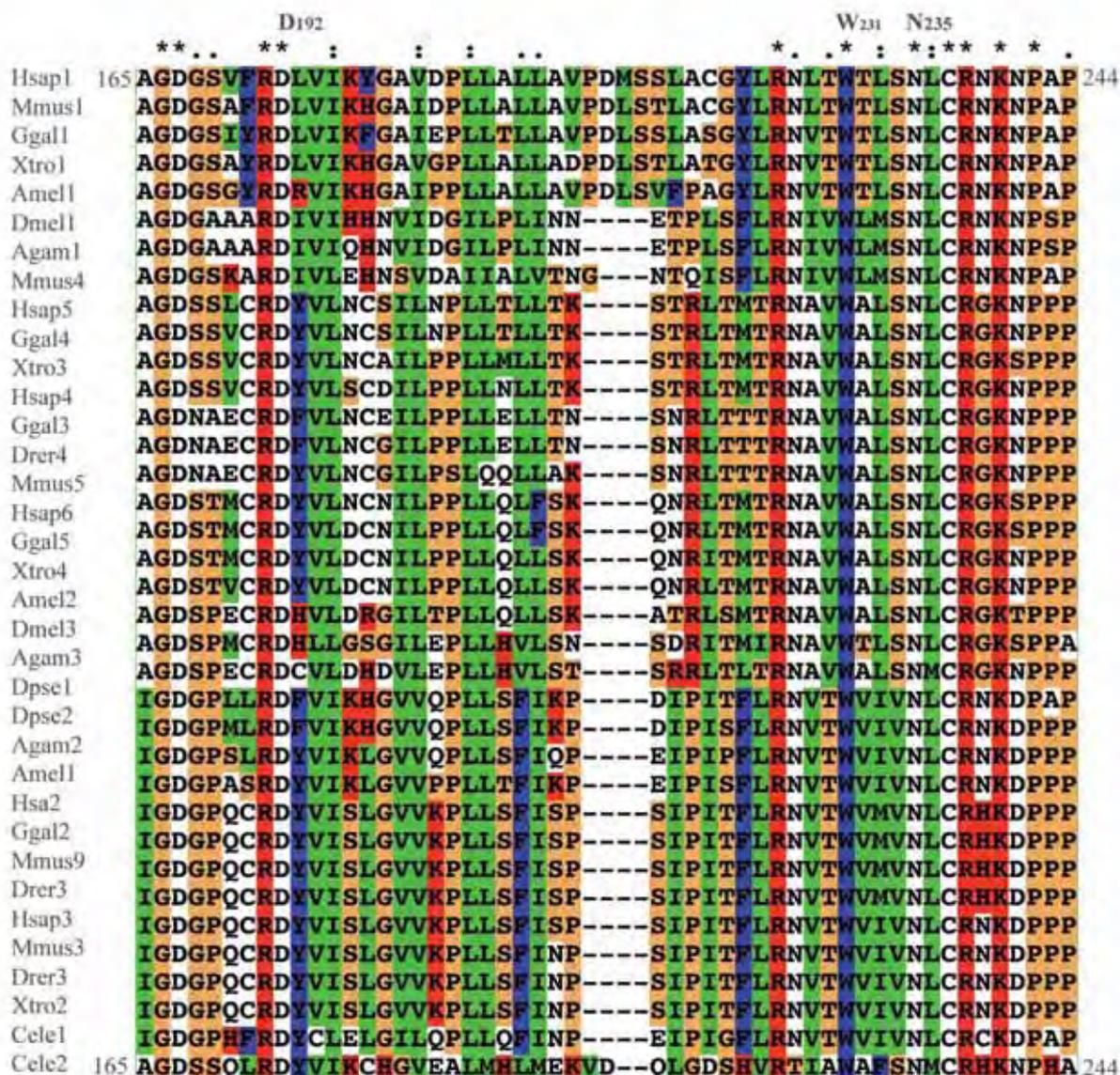


Figura 38- Alinhamento dos resíduos 135 a 164 da ImpA de diferentes organismos utilizando o programa ClustalX. As cores laranja, vermelho, azul e verde identificam os grupos de resíduos GPST, HKR, FWY e ILMV respectivamente. ‘\*’ indicam resíduos conservados em todas sequencias alinhadas; ‘:’ indicam grupo de resíduos fortemente conservador e ‘.’ indicam resíduos fracamente conservados. Os resíduos identificados acima do alinhamento correspondem aos essenciais para reconhecimento de NLS. As abreviaturas referentes aos organismos encontram-se na Tabela 2.

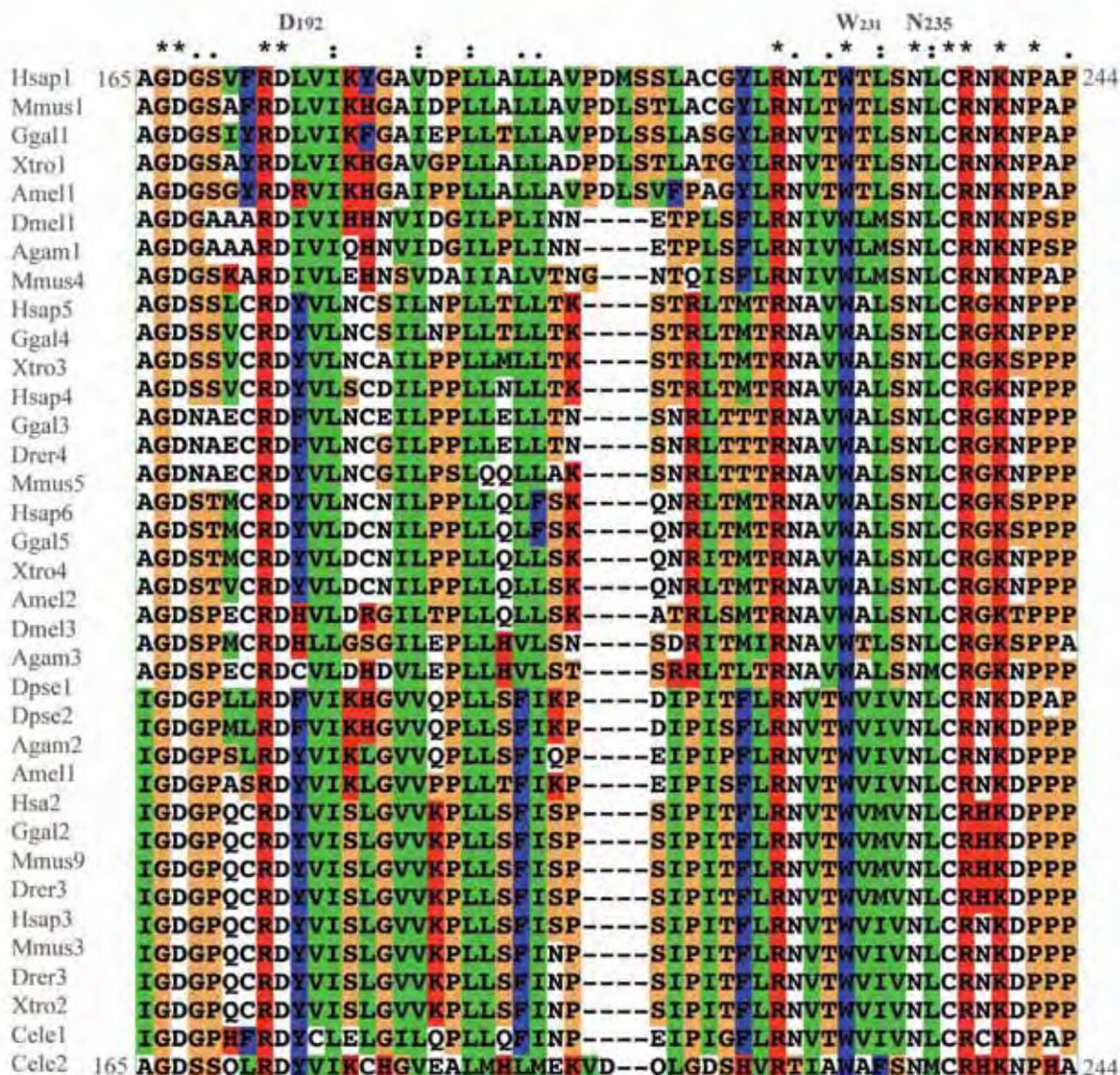


Figura 39- Alinhamento dos resíduos 165 a 244 da ImpA de diferentes organismos utilizando o programa Clustal. As cores laranja, vermelho, azul e verde identificam os grupos de resíduos GPST, HKR, FWY e ILMV respectivamente. ‘\*’ indicam resíduos conservados em todas sequencias alinhadas; ‘:’ indicam grupo de resíduos fortemente conservador e ‘.’ indicam resíduos fracamente conservados. Os resíduos identificados acima do alinhamento correspondem aos essenciais para reconhecimento de NLS. As abreviaturas referentes aos organismos encontram-se na Tabela 2.

## 5.6. A busca pelo NLS ideal.

Kosugi e colaboradores desenvolveram, por meio de mutações em um peptídeo NLS bipartido artificial, dois peptídeos bipartidos com capacidade de inibir o processo de importação nuclear, um deles inclusive atrapalhando a reciclagem da ImpA, impedindo a interação da ImpA com as proteínas responsáveis pelo processo de exportação nuclear. Esses peptídeos apresentaram como principais características a presença de 2 *clusters* altamente básicos, unidos por um linker de 10-12 resíduos, apresentando resíduos ácidos na extremidade N terminal, mais próxima a S<sub>1</sub> e prolínas na porção próxima ao segundo cluster, posicionado C-terminal (Figura 40). Esses NLSs estariam muito próximos de um NLS ideal, uma vez que enfoque deles foi exclusivamente inibição da importação nuclear (KOSUGI et al, 2008a).

```
BIMAX1  RRRRPRKRPLEWDEDEEPPRKRKRLW
BIMAX2  RRRRRRKRKREWDDDDDDPPKKRRRLD
```

Figura 40 – Inibidores específicos para ImpA (KOSUGI et al., 2008).

Um NLS ideal deve apresentar especificidade e grande afinidade exclusivamente a ImpA, entretanto deve permitir a reciclagem da mesma, caso contrário tanto ImpA quanto proteína contendo NLS poderiam tornar-se inutilizados, promovendo o acúmulo dos mesmo no núcleo e posteriores conseqüências danosas as células. Obedecendo a essas regras, a importação nuclear ocorre de maneira adequada. Compreendendo esse mecanismo, uma aplicação poderia ser a adição de um NLS a alguma substância para enviá-la para o núcleo.

Com os resultados cristalográficos obtidos até o momento, ainda há distância de um NLS ideal para uso aplicado, entretanto características essenciais aos NLS podem ser destacadas (Figura 41).

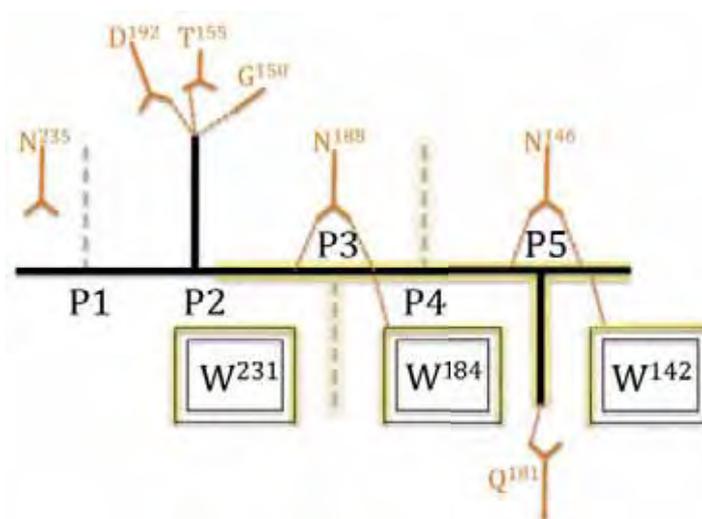


Figura 41 – Diagrama destacando posições chave em  $S_1$  e resíduos conservados da ImpA. Em laranja encontram-se resíduos que participam de interações polares e em amarelo as interações hidrofóbicas. Linhas cheias no NLS indicam posições essenciais; linhas tracejadas indicam ocupação opcional.

Em relação a ocupação do sítio principal ( $S_1$ ), duas posições são essenciais a  $P_2$  e  $P_5$ , onde  $P_2$  deve ser ocupada exclusivamente por uma lisina, que permite a formação de pontes de hidrogênio com resíduos e pontes salinas com resíduos conservados  $G^{150}$ ,  $T^{155}$  e  $D^{192}$  da ImpA e uma arginina não teria um resultado satisfatório nessa posição.

Já na posição  $P_5$ , que é a segunda posição mais importante, as interações hidrofóbicas com os carbonos da cadeia lateral do ligante tem destaque, então a ocupação dessa posição por uma lisina ou arginina não resulta em grandes diferenças, uma vez que ambos apresentam cadeias laterais longas que satisfazem a condição de interações hidrofóbicas com os triptofanos 142 e 184 da ImpA e formam ponte salina com  $Q^{181}$ .

A presença de resíduos hidrofóbicos em  $P_3$  ou  $P_4$  ajudam a manter boa superfície de contato entre ImpA e o NLS. Nessas posições a formação de pontes de hidrogênio com

átomos da cadeia principal são mais importantes que com suas cadeias laterais, por isso não é essencial a ocupação dos mesmos com resíduos de cadeias laterais longas. Entretanto, melhores resultados de afinidade são obtidos quando essas posições são preenchidas por esse tipo de resíduo, pois o número de contatos intermoleculares aumentam.

Para o sítio secundário ( $S_2$ ),  $P_1'$  tem sido considerado muito importante, porém em  $P_2'$  foram observadas as interações comuns a todos os peptídeos NLS que se ligaram a  $S_2$  (Figura 42), interagindo com resíduos da ImpA conservados em animais.

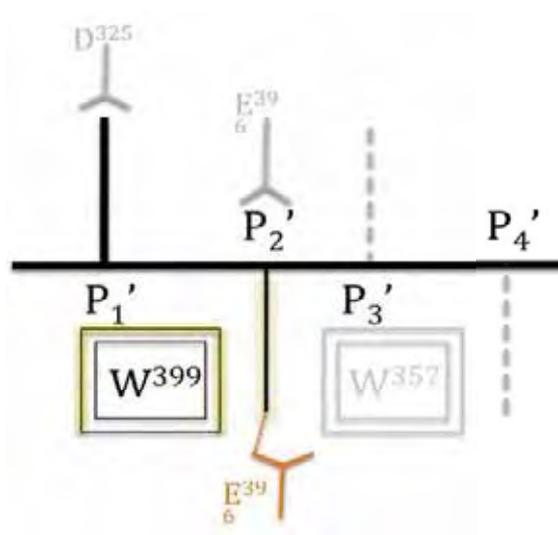


Figura 42 – Diagrama destacando posições chave em  $S_2$  e resíduos conservados da ImpA. Em laranja encontram-se resíduos que participam de interações polares; em cinza, resíduos da ImpA que não apresentam interações comuns a todos NLS estudados por cristalografia; em amarelo interações hidrofóbicas. Linhas cheias no NLS indicam posições essenciais; linhas tracejadas indicam ocupação opcional.

A respeito do linker, recentemente foi confirmado que o comprimento do mesmo, apresentando em torno de 10 -12 resíduos, proposto por Fontes em 2000 realmente influencia na ligação do sítio secundário. ( KOSUGI et al, 2008a). Além disso, a presença de resíduos de prolina próximos ao cluster básico que liga-se a  $S_1$  parece otimizar ligação de NLS, bem como a presença de resíduos ácidos próximos ao cluster que liga-se a  $S_2$ . Prolinas

antecedendo resíduos que irão se posicionar em  $S_1$  são interessantes por manter um pouco de rigidez, permitindo boa acomodação principalmente de NLSs não clássicos, ao contrário de uma região mais flexível, rica em glicinas como observado no peptídeo Ku70. Entretanto nenhuma interação marcante foi observada a respeito dessa interação.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Resíduos da ImpA chave para reconhecimento de NLS.

- Interações polares: W<sup>142</sup>, N<sup>146</sup>, W<sup>184</sup>, N<sup>188</sup>, N<sup>235</sup>, G<sup>150</sup>, T<sup>155</sup>, D<sup>192</sup> e Q<sup>181</sup> para S<sub>1</sub> ; E<sup>396</sup> e N<sup>361</sup> em S<sub>2</sub>;
- Interações hidrofóbicas: W<sup>142</sup>, W<sup>184</sup>, W<sup>231</sup> e D<sup>192</sup> em S<sub>1</sub> e W<sup>357</sup> em S<sub>2</sub>.

### 6.2. Peptídeos NLS.

- Duas etapas de purificação são importantes para minimizar a interferência de contaminante na interação de um peptídeo NLS à ImpA quando empregada *E.coli* como sistema de expressão.
- NLS com muitos resíduos básicos de cadeias longas são mais interessantes, mas não essenciais para seu reconhecimento;
- O peptídeo de Ku70 não corresponde a um NLS bipartido e apresenta conformação similar a SV40P. Interações hidrofóbicas com resíduos W<sup>273</sup> e P<sup>301</sup> da ImpA garantem essa conformação;
- O peptídeo TMNLS, desenvolvido para ser específico para ImpA de *M.musculus*, ligou-se conforme esperado;
- O peptídeo T52NLS, desenvolvido para ser específico para isoforma 5 de ImpA de *H.sapiens* , ligou-se a ImpA de *M.musculus* indicando que este não é tão específico quanto o esperado;

- T52NLS corresponde a um NLS não clássico, assim com a PLSCR1. Foi o primeiro ligante posicionado na conformação paralela no sítio  $S_2$  da ImpA, ressaltando a importância das posições  $P_1'$  e  $P_2'$  no reconhecimento de NLSs bipartidos.

### 6.3. Sítios de ligação de NLS.

- Em  $P_1$ , na ausência de um resíduo básico, resíduos curtos que permitam flexibilidade, facilitam a acomodação do NLS a ImpA;
- $P_2$  precisa ser ocupada por um resíduo de lisina para que ocorra formação de pontes de hidrogênio com a ImpA, essenciais para reconhecimento do NLS;
- $P_3$  e  $P_4$  ajudam a manter o NLS devido a pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com resíduos da ImpA e a cadeia principal do NLS;
- Na ausência de resíduos básicos longos, é recomendável a ocupação de  $P_3$  e/ou  $P_4$  por um resíduo hidrofóbico ou anfipático, que permita interações hidrofóbicas;
- Em  $P_5$  são importantes as interações hidrofóbicas com resíduos de cadeias longas.
- $P_2'$  precisa ser ocupada por resíduo de arginina para ligação efetiva de um NLS bipartido em  $S_2$ .

### 6.5.Linker.

- Prolinas antecedendo resíduos que irão se posicionar em  $S_1$  são interessantes por manter um pouco de rigidez, permitindo boa acomodação principalmente de NLSs não clássicos;
- Muitos resíduos curtos, como glicinas, presentes no NLS podem dificultar a sua ligação à ImpA em virtude do aumento da flexibilidade.

## 7. REFERÊNCIAS

- BLOW, D. **Outline crystallography for biologists**. Oxford University Press, 2002.
- BRÜNGER, A.T. The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v.355, p.472-474, 1992.
- CATIMEL, B., TEH, T., FONTES, M. R., JENNINGS, I. G., JANS, D. A., HOWLETT, G. J. Biophysical characterization of interactions involving Importin- during nuclear import. **The Journal of Biological Chemistry** , v.276 (36), 34189-34198, 2001.
- CHEN, M.-H., BEN-EFRAIM, I., MITROUSIS, G., WALKER-KOPP, N., SIMS, P. J., CINGOLANI, G. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in Importin- $\alpha$ . **The Journal of Biological Chemistry** , v.280,11 (11), p. 10599-10606, 2005.
- CINGOLANI, G., PETOSA, C., WEISS, K., MÜLLER, C. W. Structure of importin- bound to the IBB domain of importin-alpha. **Nature** ,v. 399 (6733), 221-229, 1999.
- CONTI, E., KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition os distinct nuclear localization signals by karyopherin  $\alpha$ . **Structure** , v.2000 (8), 329-338, 2000.
- 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** , v.94, 193-204, 1998.
- COOK, A., BONO, F., JINEK, M., CONTI, E. Structural biology os nucleocytoplasmic transport. **Annual Review of Biochemistry** , p. 647-671, 2007.
- DELANO, W.S. **The PyMOL molecular graphics system**. San Carlos: Delano Scientific, 2002. Disponível em <<http://www.pymol.org>>.
- DINGWALL, C., LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences-a consensus? . **Trends In Biochemical Science** , v.16 (12), 478-481,1991.
- DINGWALL, C., SHARNICK, S. V., LASKEY, R. A. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. **Cell** , v.30 (2), 449-458, 1982.
- DRENTH, J. **Principles of protein X-ray crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994. 311p.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystalogr. D**, v.60, p.2126-2132, 2004.

- FONTES, M. R. M., TEH, T., KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- $\alpha$ . **Journal of Molecular Biology** , v.297 (5), 1183-1194, 2000.
- FONTES, M. R. M., TEH, T., JANS, D., BRINKWORTH, R. I., KOBE, B. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by Importin- $\alpha$ . **The Journal of Biological Chemistry** , v.278 (30), 27981-27987, 2003a.
- FONTES, M. R. M., TEH, T., TOTH, G., JOHN, A., PAVO, I., JANS, D. A., et al. The role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of SV40 large T-antigen nuclear localisation sequence by importin-  $\alpha$ . **The Biochemical Journal** , v.375 (2), 339-349,2003b.
- GÖRLICH, D., HENKLEIN, P., LASKEY, R. A., HARTMANN, E. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. **The EMBO Journal** , v.15 (8),1996.
- GÖRLICH, D., PREHN, S., LASKEY, R. A., HARTMANN, E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell** , v.79 (5), 767-778,1994.
- GÖRLICH, D., VOGEL, F., MILLS, A. D., HARTMANN, E., LASKEY, R. A. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. **Nature** ,v. 377 (6546), 246-248,1995.
- HUBER, A. H., NELSON, W. J., WEIS, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of  $\beta$ -catenin. **Cell** ,v.90 (5), 871-882,1997.
- IMAMOTO, N., TACHIBANA, T., MATSUBAE, M., YONEDA, Y. A karyophilic protein forms a stable complex with the cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. **The Journal of Biological Chemistry** ,v. 270 (15), 8559-8565,1995.
- JANCARICK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.**, v.24, p.409-411, 1991.
- JANS, D. A., HÜBNER, S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. **Physiological Reviews** ,v. 76 (3), 651-685,1996.
- JANS, J. A., ACKERMANN, M. J., BISCHOFF, J. R., BEACH, D. H., PETERS, R. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. **The Journal of Cell Biology** ,v. 115 (5),1991.
- JONES, T.A.; BERGDOLL, M.; KJELDGAARD, M. **Crystallographic and modeling methods in molecular design. In: BUGG, C.E., EALICK, S.E. (Eds.). O: a macromolecule modeling environment.** New York: Springer-Verlag, 1990. p.189-195.

KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin  $\alpha$ . **Nature Structural Biology** ,v. 6 (4), 388-397, 1999.

KÖHLER, M.; SPECK, C.; CHRISTIANSEN, M.; BISCHOFF, F.R.; PREHN, S.; HALLER, H.; GORLICH, D. E HARTMANN, E. Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. **Molecular and Cellular Biology**. v.19, p.7782-91, 1999.

KOIKE, M.; IKUTA, T.; MIYASAKA, T.; SHIOMI, T. The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. **Experimental Cell Research**, v.250,401-413, 1999.

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. **Cell**, v.15, 940-949, 2008a.

KOSUGI, S.; HASEBE, M.; MATSUMURA, N.; TAKASHIMA, H.; MIYAMOTO-SATO, E.; TOMITA, M.; YANAGAWA, H. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of Importin  $\alpha$ . **The Journal of Biological Chemistry**, 2008b.

LANFORD, R. E., BUTEL, J. S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. **Cell** , v.37 (3), 801-813, 1984.

LANFORD, R. E., KANDA, P., KENNEDY, R. C. Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. **Cell** ,v. 46 (4), 575-582, 1986.

LANGE, A., MILLS, R. E., LANGE, C. J., STEWART, M., DEVINE, S. E., CORBETT, A. H. Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with Importin- $\alpha$ . **The Journal of Biological Chemistry** , v 282 (8), 5101-5105, 2007.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr**, v.26, p.283-91, 1993.

MAKKERH, J. P.S.; DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. **Current Biology**. v.6 (8), 1025-1027, 1996.

MATSUURA, Y., STEWART, M. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. **EMBO Journal** ,v 24, pp. 3681-3689, 2005.

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

MOORE, M. S., BLOBEL, G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature** , v.365 (6447), 661-663, 1993.

- McREE, D.E. **Practical protein crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993. 477p.
- MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.; DODSON, E. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. **Acta. Crystallogr. D**, v.53, p.240-255, 1997.
- NAVAZA, J. AMoRe: An Automated Package for Molecular Replacement. **Acta. Crystallogr. A**, v.50, p.157-163, 1994.
- NADLER, S. G., TRITSCHLER, D., HAFFAR, O. K., BLAKE, J., BRUCE, A. G., CLEVELAND, J. S. Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. **The Journal of Biological Chemistry** , v.272 (7), 4310-4315,1997.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol.**, v.276, p.307-326, 1997.
- RHODES, G. **Crystallography made crystal clear – A guide for users of macromolecular models**. Elsevier, 2006.
- SOROKIN, A. V., KIM, E. R., & OVCHINNIKOV, L. P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. **Biochemistry.**, V.72 (13), 1439-1457,2007.
- STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nature Reviews** , V.8, 195-208, 2007.
- TEH, T., TIGANIS, T. E KOBE, B. Crystallization of importin  $\alpha$ , the nuclear import receptor. **Acta Crystallogr.** v.D55, p.561-3, 1998.
- VETTER, I. R., ARNDT, A., KUTAY, U., GÖRLICH, D., WITTINGHOFER, A. Structural view of Ran-Importin- interaction at 2.3 Å resolution. **Cell** , V. 97 (5), 635-646,1999.
- WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, n.8, p.127-134, 1995.
- YANG,S.N.**Insights into nuclear localization sequence binding by importin- $\alpha$** .2008.Tese (Doutorado em Bioquímica).Universidade de Queensland.School of Molecular and Microbial Sciences, Brisbane, QLD, Australia. Jan 2008.