



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Cíntia Akemi Fukuda

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

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

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

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

Fukuda, Cíntia Akemi.

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

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

Orientador: Marcos Roberto de Mattos

Fontes Capes: 20804008

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

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SIGLAS E ABREVIACÕES

Abs- Absorbância

ARM- Armandillo

CAS- Exportina *Cellular apoptosis susceptibility*

CD- Dicroísmo Circular

cNLS- Sequências de Localização Nuclear Clássica

DLS- Espalhamento Dinâmico de Luz

DNase- Desoxirribonuclease

DT- Difusão Translacional

DTN- Doença Tropical Negligenciada

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FEN1- Flap-Endonuclease 1

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

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Performance

HsImp α - Importina- α de *Homo sapiens*

IBB- *Importin Beta Binding*

IgG- Imunoglobulina G

Imp α - Importina- α

Imp β - Importina- β

IPTG- Isopropil β - d- tiogalactopiranosídeo

ITC- Calorimetria por Titulação Isotérmica

Kd- Constante de Dissociação

kDNA- DNA de Cinetoplasto

LC- Leishmaniose Cutânea

LMC- Leishmaniose Muco Cutânea

LmImp α - Importina- α de *Leishmania major*

LV- Leishmaniose Visceral

Meio LB- Meio Luria Bertani

MmImp α - Importina- α de *Mus musculus*

MW- Peso Molecular (*Molecular Weight*)

N- Estequiometria

NcImp α - Importina- α de *Neurospora crassa*

NE- Envelope Nuclear

NES- Sinais de Exportação Nuclear

NLS- Sequências de Localização Nuclear

NPC- Complexo Poro Nuclear

NPT- Número de Partículas, Pressão e Temperatura Constantes

NVT- Número de Partículas, Volume e Temperatura Constantes

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS- Organização Pan Americana de Saúde

OsImp α - Importina- α de *Oryza sativa*

Pd- Polidispersidade

PDVL- Fluoreto de Polivinilideno

PI- Ponto Isoelétrico

PMSF- Fluoreto de fenilmetilsufonila

RanGAP- Proteína de Ativação da Ran-GTPase

RanGTP- Guanosina trifosfato Ran

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

Rbp38- RNA *Binding Protein 38*

Rbp38 NLS- Peptídeo da Rbp38

Rg- Raio de Giro

R_H- Raio Hidrodinâmico

RMSD- Desvio da Raiz Quadrática Média

RMSF- Flutuação da Raíz Quadrática Média

RNase- Ribonuclease

RPA- Proteína de Replicação A

ScImp α - Importina- α de *Saccharomyces cerevisiae*

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

ssDNA- *Single Stranded DNA*

SV40- Antígeno T do Vírus de Símio 40

SV40 NLS- Peptídeo da SV40

TBS- Tampão Tris Salina

TCEP- Cloridrato de tris (carboxietil) fosfina

T_{Melting}- Temperatura de Melting

WHO- *World Health Organization*

ΔG - Energia livre de Gibbs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de dois Complexos de Poros Nucleares (NPCs)	2
Figura 2. Representação das conformações da Imp β de <i>Homo sapiens</i>	3
Figura 3. Representação da estrutura de Imp α de <i>Mus musculus</i>	4
Figura 4. Figura simplificada da Importação nuclear de proteínas.	6
Figura 5. Situação epidemiológica mundial da leishmania cutânea e visceral em 2018	10
Figura 6. Ciclo de vida da leishmania	12
Figura 7. Cromatograma de purificação da MmImp α	26
Figura 8. Gel de SDS-PAGE 12 % com alíquotas de MmImp α	27
Figura 9. Cromatograma obtido com a purificação da amostra de HsImp α	28
Figura 10. Gel de poliacrilamida 12 % com alíquotas de HsImp α	28
Figura 11. Placas de meio LB ágar mostrando as colônias de <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus e pLysS.....	29
Figura 12. Gel SDS PAGE 12 % mostrando antes e o teste de indução com IPTG variando entre 50 mM e 150 mM, com alíquotas retiradas a cada hora.	30
Figura 13. Gel SDS PAGE 12% e <i>western blot</i>	30
Figura 14. Géis de poliacrilamida a 12% das duas cepas mostrando a localização da LmImp α . 31	
Figura 15. Géis de poliacrilamida 12% com alíquotas dos experimentos de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando N-propanol e Ureia, respectivamente.	32
Figura 16. Cromatograma (A) mostrando o processo de purificação por afinidade a coluna de cobalto. Em (B), a imagem do gel de poliacrilamida 12 %	32
Figura 17. Cromatograma (A) da cromatografia com a coluna de níquel. Em (B) é a imagem do gel de poliacrilamida a 12 %	33
Figura 18. Cromatograma (A) do HPLC por troca iônica do tipo aniônica. O gel de poliacrilamida a 12 % (B) mostra desde o processo de crescimento e indução da bactéria	33
Figura 19. Cromatograma (A) da purificação por exclusão molecular. O Gel de eletroforese SDS PAGE 12 % (B).....	34
Figura 20. Cromatograma da corrida de afinidade pela coluna de níquel (A). Em (B) temos um gel de poliacrilamida a 12 %. Em (C) temos um gel de poliacrilamida a 12 % confirmatório.....	35
Figura 21. Espectro do CD da MmImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.	37
Figura 22. Espectro do CD da HsImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.....	38

Figura 23. Espectro do CD da LmImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.....	39
Figura 24. Curva de desnaturação térmica da MmImp α com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.....	40
Figura 25. Curva de desnaturação térmica da HsImp α com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.....	40
Figura 26. Curva de desnaturação térmica da LmImp α com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.....	41
Figura 27. Análise comparativa das estruturas secundárias das proteínas recombinantes MmImp α (Preto), HsImp α (Azul) e LmImp α (Vermelho).....	42
Figura 28. Espectro da fluorescência da LmImp α variando sua temperatura entre 5 °C e 25 °C.	43
Figura 29. Espectro da fluorescência da LmImp α isolada (roxo), juntamente com a SV40 NLS (verde) e Rbp38 NLS (rosa) à 10 °C. Onde pode-se verificar que a LmImp α pode ter afinidade com ambos peptídeos.	44
Figura 30. Espectro da fluorescência da LmImp α isolada (roxo), juntamente com a SV40 NLS (verde) e Rbp38 NLS (rosa) à 20 °C.	44
Figura 31. Termograma e Isoterma obtidos pela análise calorimétrica dos complexos LmImp α /Rbp38 (A) e LmImp α /SV40 NLS (B) à 10 °C.	45
Figura 32. Termograma e Isoterma obtidos pela análise calorimétrica dos complexos LmImp α /Rbp38 (A) e LmImp α /SV40 NLS (B) à 20 °C.	46
Figura 33. Sobreposição das quatro principais estruturas formadas a partir dos <i>clusters</i> mais populosos do modelo teórico da LmImp α	47
Figura 34. Dados do RMSD (A), Raio de Giro (B) e RMSF (C) do modelo teórico da LmImp α durante os 100 ns de simulação.....	47
Figura 35. Sobreposição do molde de OsImp α - 4B8J (cinza) e o modelo teórico gerado por modelagem comparativa para a LmImp α (roxo).....	48
Figura 36. Complexo LmImp α (roxo) / Rbp38 NLS (verde) com ΔG e K_d da interação.	48
Figura 37. Sobreposição com as estruturas centrais correspondentes aos três <i>clusters</i> mais populosos na simulação de dinâmica molecular com o complexo.....	49
Figura 38. Gráfico de RMSD	49
Figura 39. Sobreposição entre dímeros ScImp α - 1BK5 (ciano) e LmImp α (roxo).	50

Figura 40. Gráficos de RMSD (A) e raio de giro (B) para o dímero teórico de LmImp α durante 10 ns de simulação de dinâmica molecular.	50
Figura 41. Sequência das Imp α alinhadas. Em vermelho estão destacados os triptofanos de cada sequência.	51
Figura 42. Dímero do cristal de ScImp α (PDB: 1BK5).....	54
Figura 43. Figura dos principais pontos de interação do dímero da LmImp α (vermelho e azul)..	55
Figura 44. Região da mutação da ScImp α , comparação a ScImp α mutada (rosa) e não mutada (verde) e a LmImp α (azul), onde em verde é a tirosina, resíduo não mutado da ScImp α , em rosa é o ácido aspártico, resíduo mutado da ScImp α e em azul temos a leucina, resíduo da LmImp α ...	56
Figura 45. Região da mutação da ScImp α com o código de cores por resíduo onde em amarelo são as cadeias carbônicas, em vermelho são os oxigênios e em branco os hidrogênios. A disposição dos resíduos é a mesma da imagem anterior.	56
Figura 46. Esquema simplificado da interação do complexo LmImp α / Rbp38 NLS	57
Figura 47. Esquema das principais interações entre os dímeros de LmImp α	57
Figura 48. Árvore Filogenética das Imp α	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela da sequência consenso de cNLS monopartida e bipartida, respectivamente.....	7
Tabela 2. Comparação das sequências consenso de cNLSs (FONTES; TEH; KOBE, 2000) com a sequência do peptídeo da Rbp38, onde em vermelho estão as partes diferentes e em verde as partes que coincidem com o consenso. Estão comparadas duas possíveis sequências de ligação da Rbp38 NLS, a primeira sendo com um comportamento monopartido, se ligando a apenas um dos sítios de interação por vez e a segunda sendo caso ela se ligue de forma bipartida, se ligando aos dois sítios ao mesmo tempo.	21
Tabela 3. Comparação da sequência consenso de cNLS monopartida com a sequência da SV40 NLS (FONTES; TEH; KOBE, 2000), onde em azul está destacado a correspondência com a sequência consenso.	22
Tabela 4. Dados de DLS da MmImp α	36
Tabela 5. Dados de DLS da HsImp α	36
Tabela 6. Dados de DLS da LmImp α	36
Tabela 7. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de MmImp α	37
Tabela 8. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de HsImp α	38
Tabela 9. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de LmImp α	38
Tabela 10. Tabela comparativa dos PIs, massa molecular (kDa) e quantidade de triptofano das Imp α de <i>M. musculus</i> , <i>H.sapiens</i> , <i>N.crassa</i> , <i>L.major</i> , <i>S.cerevisiae</i> e <i>O. sativa</i> , respectivamente.	51
Tabela 11. Identidade das Imp α com a LmImp α	52

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
SIGLAS E ABREVIACÕES	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
SUMÁRIO	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Transporte Intracelular de Macromoléculas.....	1
1.1.1 Complexo Poro Nuclear	2
1.1.2 Importina- β	3
1.1.3 Importina- α	3
1.1.4 Via Clássica de Importação Nuclear	5
1.2 Sequência de Localização Nuclear (NLS)	6
1.2.1 cNLS do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS)	8
1.3 Leishmania e a Leishmaniose	8
1.3.1 Leishmaniose no Brasil e no mundo	9
1.3.2 Ciclo de vida.....	11
1.3.3 Leishmania major.....	12
1.3.4 Proteínas de parasitas do gênero Leishmania e seu transporte nuclear.....	12
1.3.5 Proteína Rbp38.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Clonagem e transformação das Imp α truncadas.....	15
3.1.1 Importina- α de Mus musculus (MmImp α).....	15

3.1.2 Importina- α de Homo sapiens (HsImp α)	15
3.1.3 Importina- α de Leishmania major (LmImp α)	15
3.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes MmImp α e HsImp α	15
3.3 Expressão, Indução e Obtenção de amostra da proteína recombinante de LmImp α para purificação	17
3.4 Purificação da proteína recombinante de LmImp α pelo método de Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC).....	18
3.4.1 HPLC por afinidade	18
3.4.2 HPLC por Troca iônica	19
3.4.3 HPLC por Exclusão Molecular	19
3.5 Concentração da amostra	19
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	20
3.7 <i>Western blot</i>	20
3.8 Síntese dos Peptídeos	21
3.8.1 Peptídeo Rbp38 (Rbp38 NLS)	21
3.8.2 Peptídeo do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS).....	21
3.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	22
3.10 Dicroísmo Circular (CD).....	22
3.11 Espectroscopia de Fluorescência.....	23
3.12 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	23
3.13 Modelagem, <i>Docking</i> e Dinâmica Molecular	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante MmImp α	26
4.2 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante HsImp α	27
4.3 Transformação e Expressão da Proteína Recombinante LmImp α	29
4.4 Lise Celular	31
4.5 Purificação da Proteína Recombinante LmImp α	32

4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz	36
4.7 Dicroísmo Circular	37
4.8 Espectroscopia de Fluorescência.....	41
4.9 Calorimetria por Titulação Isotérmica	45
4.10 Modelagem, Docking e Dinâmica Molecular	46
4.10.1. Modelo teórico da LmImp α	46
4.10.2. Docking da LmImp α com a Rbp38 NLS	48
4.10.3. Modelo teórico da LmImp α em dímero.	49
4.11. Comparação dos dados biofísicos e estruturais da LmImp α com as outras Imp α	51
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. LmImp α recombinante fica na porção insolúvel da lise celular.....	53
5.2. LmImp α varia sua forma conforme a variação da temperatura afetando sua ligação com a Rbp38 NLS.....	53
5.3. LmImp α possui características distintas das outras Imp α	58
5.4. Árvore Filogenética das Imp α	58
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

O estudo celular implica na análise microscópica das atividades bioquímicas da estrutura, observando as funções proteicas na célula. Proteínas são elementos que constituem a maior parte da massa celular seca. São essenciais para a maioria das funções celulares e fornecem forma e sustentação à célula (ALBERTS et al., 2010). A comunicação que existe entre o núcleo e o citoplasma é intrínseca para a regulação da atividade celular. A transcrição do RNA e a replicação do DNA são processos isolados em relação à síntese proteica e reação metabólica, pelo envoltório celular (COOK et al., 2007). Essa interação, que deve ocorrer entre essas duas regiões celulares, possui o envoltório nuclear como obstáculo físico a ser superado, isto demanda uma via eficiente de comunicação e transporte de macromoléculas entre cada interface (LANGE et al., 2007).

1.1 Transporte Intracelular de Macromoléculas

As células eucariontes são compostas por um núcleo e um citoplasma, que se comunicam através do transporte celular que ocorre através do Complexo Poro Nuclear (NPC), presente na membrana celular distribuído por todo o Envelope Nuclear (NE). Esse complexo facilita o transporte bidirecional entre o núcleo e o citoplasma e a regulação do transporte de diversos receptores, RNA e proteínas solúveis, tendo grande influência na regulação dos processos celulares como a expressão gênica e a progressão do ciclo celular (STEWART, 2007).

Para que isso ocorra, os mecanismos celulares devem se manter estáveis. As moléculas devem transitar entre os compartimentos, permitindo processos envolvendo metabolismo de ácidos nucleicos e proteínas. Dessa forma, destacam-se os meios de transporte existentes para a locomoção de moléculas entre o citoplasma e núcleo (STEWART, 2007). A composição do envoltório nuclear é a chave para o conhecimento de como ocorre a passagem de moléculas por tal região. Estruturas grandes, com cerca de 250 MDa, formadas por nucleoporinas, atravessam a membrana nuclear e compõem os NPCs.

Para que ocorra transição entre citoplasma e núcleo diversas vias estão presentes para a passagem de moléculas pelo NPC. Proteínas neutras e pequenas até 20 kDa migram devido a difusão passiva (GORLICH; KUTAY, 1999; KEMINER et al., 1999; KNUDSEN et al., 2009; LANGE et al., 2007). Partículas de 20 a 60 kDa migram com auxílio de nucleoporinas ou são filtradas por nucleoporinas seletivas (GÖRLICH, 1998). Uma grande parte das macromoléculas

que necessitam transitar para o interior do núcleo são transportadas de acordo com sequências de sinalização específicas que são reconhecidas por proteínas transportadoras.

As proteínas transportadoras, denominadas de Carioferinas ou Importinas e as Exportinas atuam no transporte bidirecional da maioria dos eventos de transportes nucleocitoplasmáticos. Essas proteínas fazem parte de um processo onde elas reconhecem as sequências de localização nuclear (NLS) e os sinais de exportação nuclear (NES). Este processo é denominado de Via Clássica de Importação Nuclear (CHRISTIE et al., 2016).

1.1.1 Complexo Poro Nuclear

O Complexo Poro Nuclear (NPC) é formado por dois anéis proteicos, presentes do lado interno e externo da membrana nuclear, e a partir destes é formado o canal central ou o corpo dos poros presentes no NPC. Ligados aos anéis externos estão localizados os filamentos citoplasmáticos e aos internos está a cesta nuclear, que fazem ligação com as proteínas para que ocorra o transporte de macromoléculas para o interior do núcleo (Fig. 1). (DAVIS, 1995)

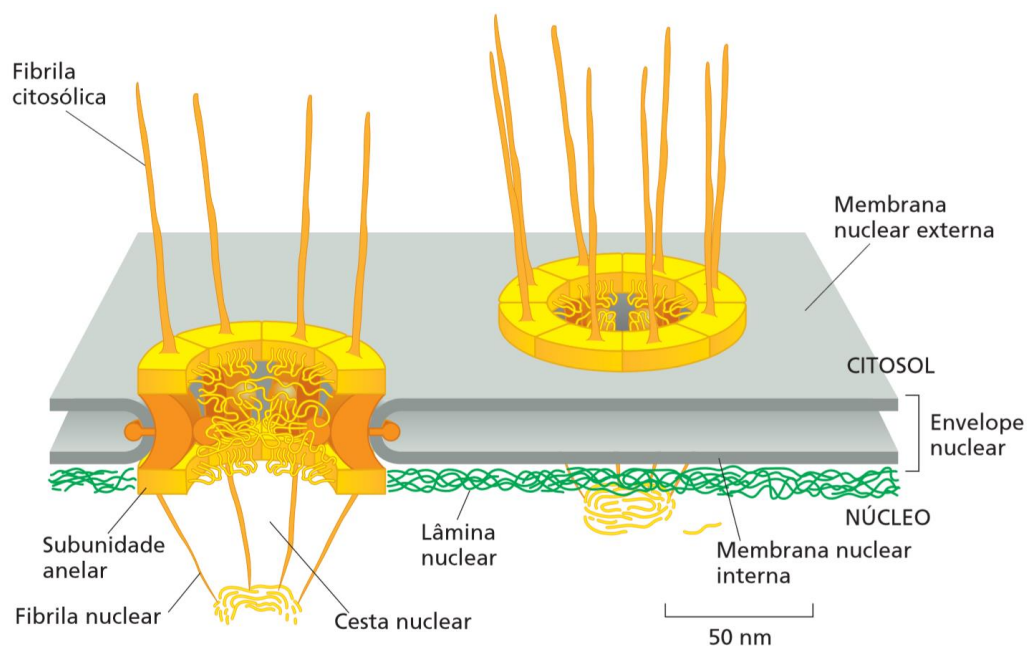


Figura 1. Esquema de dois Complexos de Poros Nucleares (NPCs), onde cada complexo é formado por fibrilas que se lançam para ambos os lados do complexo, onde, na face nuclear, elas convergem formando a cesta nuclear e também por duas subunidades anelares que por sua vez formam o canal central (ALBERTS et al., 2010).

1.1.2 Importina- β

A Importina- β (Imp β) é o responsável pelo transporte do complexo trimérico Importina- α -Imp β -Proteína carga através do poro nuclear através da sua interação com as nucleoporinas. Ela apresenta 19 repetições HEAT divididos em duas hélices (A e B) antiparalelas entre si unidas por um loop (CHOOK; BLOBEL, 2001; CONTI; MÜLLER; STEWART, 2006; STEWART, 2006). Devido as repetições HEAT, sua estrutura possui um alto grau de flexibilidade permitindo que ela mude sua conformação dependendo se ela está na sua forma livre ou complexada (Fig. 2) (CONTI; MÜLLER; STEWART, 2006).

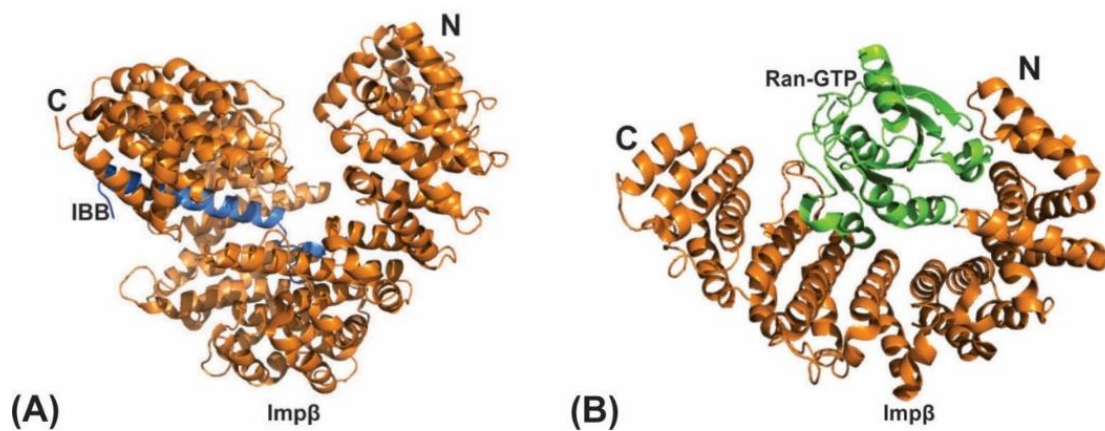


Figura 2. Representação das conformações da Imp β de *Homo sapiens*. (A) Imp β (Laranja) com o complexo IBB (Azul), PDB:1QGK; (B) Imp β (Laranja) com o complexo Ran-GTP (Verde), PDB:1IBR (CINGOLANI et al., 1999; VETTER et al., 1999).

1.1.3 Importina- α

A Importina- α (Imp α) apresenta uma região de ligação com a Importina- β (Imp β), denominada domínio IBB (*Importing Beta Binding*) (KOBÉ, 1999) e outra região formada por repetições de hélices- α , denominadas repetições em armadillo (ARMs), que permite o reconhecimento e ligação de sequências de localização nuclear (*Nuclear Localization Sequences*-NLS) presentes nas moléculas a serem transportadas (Fig. 3) (DINGWALL; LASKEY, 1991). Quando não há a presença da Imp β para atuar, formando o complexo de importação com a Imp α , o domínio IBB funciona como auto inibitório, ligando-se à região dos ARMs e impedindo a Imp α de se ligar às sequências NLS. Para que a sequência NLS seja reconhecida, a Imp β desloca o domínio auto inibitório IBB e se liga a ele, permitindo que a região ARMs fique livre para a identificação da sequência NLS específica para cada molécula.

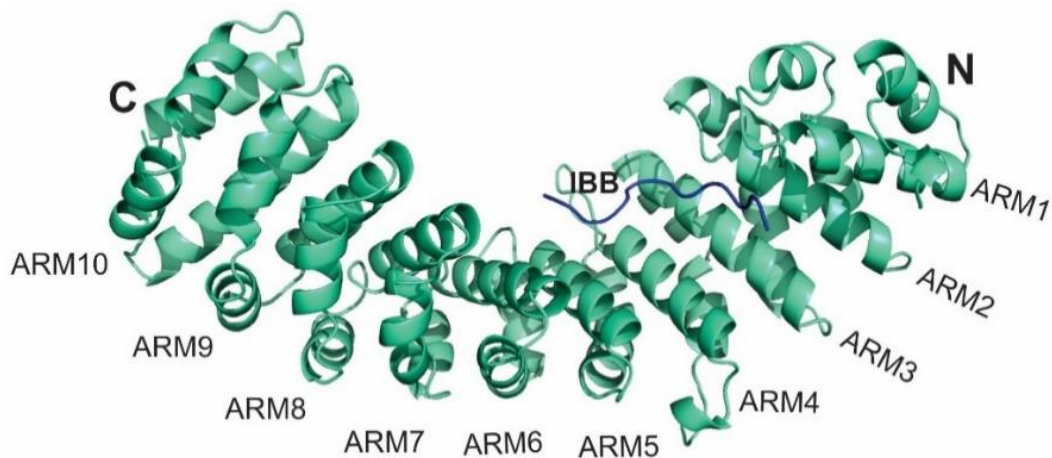


Figura 3. Representação da estrutura de Imp α de *Mus musculus*, PDB:1IAL. Imp α é composta por dois terminais (N e C), o domínio IBB (Azul), e as dez repetições ARMS (Verde claro) (KOBÉ, 1999).

A estrutura da proteína Imp α já foi elucidada e caracterizada em alguns organismos, incluindo *Mus musculus* (KOBÉ, 1999), *Homo sapiens* (DIAS et al., 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (CONTI et al., 1998), *Oryza sativa* (CHANG et al., 2012), *Arabidopsis thaliana* (WIRTHMUELLER et al., 2015) e *Neurospora crassa* (BERNARDES et al., 2014), esta última elucidada em nosso laboratório.

Essas estruturas apresentam identidade de sequência de 41-65% e alto grau de conservação estrutural (CONTI; KURIYAN, 2000; FONTES; TEH; KOBÉ, 2000). No entanto, algumas regiões dessas estruturas apresentam resíduos não conservados que podem estar relacionados a especificidades da proteína em cada organismo, sendo que alguns destes organismos apresentam mais de uma isoforma da Imp α (PUMROY; CINGOLANI, 2015).

Através da análise das sequências de aminoácidos dessas proteínas, foi possível classificá-las em três subfamílias: $\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\alpha 3$, sendo que membros de diferentes subfamílias tem cerca de 50% de identidade, enquanto membros da mesma família apresentam até 80% de identidade (KÖHLER, 1999). As Imp α da família $\alpha 1$ estão presentes em todos os eucariotos, enquanto as Imp α das famílias $\alpha 2$ e $\alpha 3$, são encontradas apenas em animais metazoários (MASON; FLEMING; GOLDFARB, 2002; MASON; STAGE; GOLDFARB, 2009). As diferenças entre as proteínas de cada família evidenciam as especificidades destas no reconhecimento de NLSs, dependendo do organismo e função que exercem. Além disso, as proteínas das diferentes famílias podem apresentar preferências por NLSs específicos (FANG et al., 2001; KÖHLER, 1999; MASON; FLEMING; GOLDFARB, 2002; SEKIMOTO et al., 1997). Um estudo funcional comparativo entre as proteínas Imp α expressas de *H. sapiens*, Imp $\alpha 2$ de *X. laevis* e Imp $\alpha 1$ de *S. cerevisiae*,

mostrou diferenças, entre as proteínas das diferentes famílias, na eficiência de importação de determinados substratos com NLS, especialmente quando eram oferecidos dois ou mais substratos ao mesmo tempo (KÖHLER, 1999). Ou seja, um mesmo peptídeo NLS pode apresentar variações na afinidade e no modo de ligação quando interage com Imp α de famílias distintas. Tal característica pode ser empregada na análise, desenvolvimento e manipulação de NLSs específicos que atuam em processos e vias metabólicas de determinado organismo.

1.1.4 Via Clássica de Importação Nuclear

A Via Clássica de Importação Nuclear é a mais bem caracterizada das alternativas de importação de acordo com o reconhecimento de sequências de sinalização específica (Fig. 4) (LANGE et al., 2007). Este transporte ocorre a partir da formação do complexo de importação formado pela Imp α , a Imp β e a proteína cargo. Ao se ligar à Imp α , a Imp β desloca o domínio auto inibitório (domínio IBB), formando um heterodímero. Essa conformação possibilita o reconhecimento e ligação das sequências de localizações nucleares clássicas (cNLS) na porção côncava da Imp α (CONTI et al., 1998; FONTES; TEH; KOBE, 2000; STEWART, 2006, 2007). Após a identificação da NLS, a Imp β se ancora às fibrilas citosólicas do NPC e por meio de interações há o transporte do complexo trimérico (Imp α -Imp β -Proteína cargo) pelos poros. Uma vez no núcleo, o complexo é dissociado pela interação com a RanGTP, causando mudanças conformacionais que resultam na liberação do complexo. Com o domínio auto inibitório da Imp α livre, ele passa a competir com a NLS da proteína importada (LEE et al., 2003).

A interação do domínio IBB com a nucleoporina e o receptor de exportação CAS-RanGTP, auxiliam na reciclagem da proteína Imp α , deixando o substrato dentro do núcleo e levando a proteína de volta ao citoplasma, em que ela poderá servir para uma nova importação, após sua dissociação mediada pela Ran-GAP (proteína de ativação da Ran-GTPase) (LANGE et al., 2007). A Imp β , é reciclada para o citoplasma por meio da formação de um complexo Imp β -RanGTP, que, assim como a Imp α , se dissocia do seu complexo no citoplasma, por meio da Ran-GAP, ficando disponível para um novo ciclo de importação (STEWART, 2006).

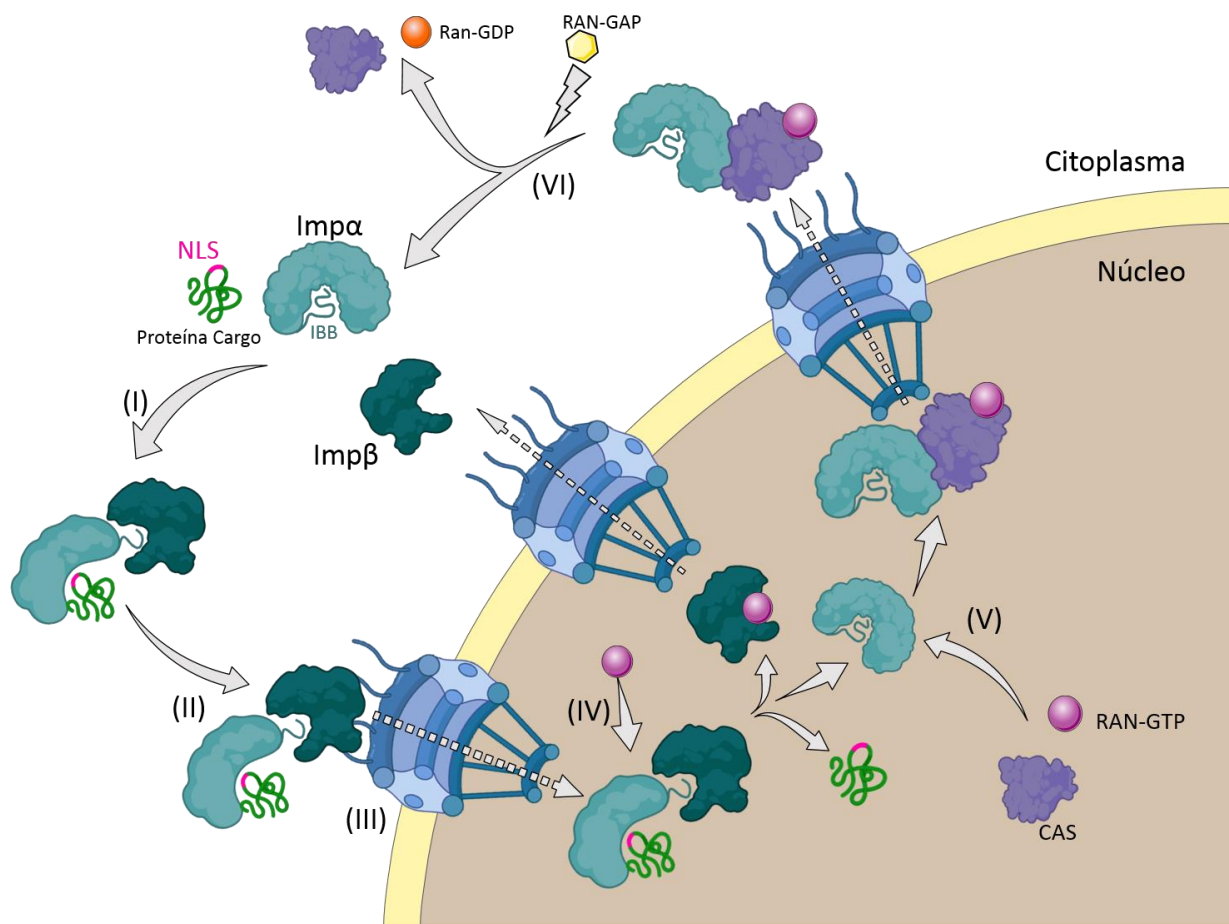


Figura 4. Figura simplificada da Importação nuclear de proteínas. (I) Montagem do complexo de importação Imp α -Imp β -Proteína cargo no citoplasma; (II) Ligação do complexo com o NPC; (III) Translocação através do Poro nuclear; (IV) Dissociação do complexo pela ligação da Ran-GTP com a Imp β ; (V) Imp α liga-se ao complexo de exportação CAS-Ran-GTP e é exportada para o citoplasma; (VI) Proteína Ran-GAP hidrolisa o complexo liberando a Imp α para o citoplasma para realização de outro transporte nuclear (Autoria própria, 2021).

1.2 Sequência de Localização Nuclear (NLS)

As sequências de localização nuclear (NLSs) são partes essenciais do mecanismo de transporte nuclear mediado por Importinas. Na via clássica de importação nuclear, as proteínas que apresentam as chamadas NLSs clássicas (cNLSs) são reconhecidas pela Imp α , que funciona como um adaptador para a ligação com a Imp β , a qual promove o transporte para o interior do núcleo. As cNLSs são caracterizadas pela presença de um ou mais grupos de aminoácidos básicos (KOBÉ, 1999). As cadeias laterais básicas das cNLSs interagem especificamente com resíduos dos aminoácidos triptofano e asparagina, presentes na porção côncava da Imp α (CONTI et al., 1998; CONTI; KURIYAN, 2000; FONTES; TEH; KOBÉ, 2000; STEWART, 2006, 2007) As cNLSs são divididas em dois grupos: as monopartidas, que apresentam um grupo de aminoácidos

básicos e são exemplificadas pela cNLS do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS; ¹²⁶PKKKRKV¹³²) (FONTES; TEH; KOBE, 2000), e as bipartidas, exemplificadas pela cNLS da Nucleoplasmina (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰) (FONTES; TEH; KOBE, 2000) ou da flap-endonuclease 1 (FEN1 NLS, ³⁵¹SSAKRKEPEPKGSTKKKAKT³⁷²) (DE BARROS et al., 2012) que apresentam dois grupos de aminoácidos básicos. As cNLSs bipartidas ligam-se a dois sítios de ligação da proteína Imp α (sítios principal e secundário) ao mesmo tempo, enquanto as monopartidas se ligam, preferencialmente, ao sítio de ligação principal.

Para as cNLS monopartidas a Imp α deve apresentar uma lisina na posição P2 e assim seguir o seguinte padrão: K(K/R)X(K/R) (LANGE et al., 2007). Já para as cNLS bipartidas, elas possuem o seguinte padrão: KRX₁₀₋₁₂KRXK, onde os dois grupos são separados por uma região de *linker* formado por 10 a 12 aminoácidos (Tab.1) (DINGWALL; LASKEY, 1991; LANGE et al., 2007).

Tabela 1. Tabela da sequência consenso de cNLS monopartida e bipartida, respectivamente.

Sítio Secundário					<i>Linker</i>	Sítio Principal					
P0'	P1'	P2'	P3'	P4'		P1	P2	P3	P4	P5	P6
	K	R	K/R				K	K/R		K/R	
		K	R		X ₁₀₋₁₂		K	R		K	

As especificidades das interações Imp α /NLS foram amplamente discutidas (CHRISTIE et al., 2016), uma vez que essas características poderiam ser usadas como ferramentas importantes para encontrar outros peptídeos NLS potenciais em proteínas nucleares ou mesmo para o desenvolvimento de alvos para inibir a importação nuclear ou desenho de peptídeos específicos para a área conhecida como "*drug delivery*" (YASHIRODA; YOSHIDA, 2005). A eficiência de importação de Imp α de diferentes classes pode variar quando a interação com o mesmo substrato (KÖHLER, 1999; KOSUGI et al., 2009) e as configurações de NLS, incluindo os resíduos N-terminais, poderiam definir o perfil de ligação diferencial de um determinado peptídeo (CHANG et al., 2012). Duas classes de NLSs "atípicas" (classes 3 e 4) foram consideradas como específicas para o sítio secundário e outra classe (classe 5) foi considerada como "específica para plantas" (KOSUGI et al., 2009), onde seus N-terminais têm um papel fundamental no reconhecimento por Imp α . Estudos cristalográficos e calorimétricos utilizando Imp α de arroz (CHANG et al., 2012) e fungo *N. crassa*, pertencentes à família α 1, mostraram que peptídeos NLS se ligam usando modos diferentes ou com diferentes afinidades no sítio de ligação menor em comparação com Imp α da família α 2 (BERNARDES et al., 2020).

Em contraste com estes resultados (BERNARDES et al., 2014; CHANG et al., 2012, 2013), que destacaram o papel do sítio secundário de ligação para Imp α da família $\alpha 1$, o trabalho publicado por nosso grupo (BERNARDES et al., 2017) demonstrou que o NLS NIT-2 de *N. crassa* se liga com uma elevada afinidade ao sítio principal de ligação de Imp α de *N. crassa*. Assim, a combinação dos estudos mostram que ambos os sítios de ligação, principais e secundários, desempenham um papel essencial na translocação de diferentes proteínas, conferindo especificidade para os organismos que possuem uma única cópia do gene que codifica Imp α , ao contrário dos mamíferos, cujo o genoma codifica sete isoformas de Imp α (MASON; STAGE; GOLDFARB, 2009; PUMROY et al., 2017).

1.2.1 cNLS do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS)

A interação da cNLS monopartida SV40 NLS com a Imp α foi apresentada através da elucidação das estruturas de Imp α de levedura e mamífero (CONTI et al., 1998; FONTES et al., 2000) complexadas ao peptídeo. Desde então essa sequência é utilizada como referência para estudos envolvendo a Imp α , tanto análises estruturais quanto ensaios de importação nuclear e interação proteína-proteína.

1.3 Leishmania e a Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecto contagiosa podendo ser considerada uma zoonose que afeta milhões de pessoas no mundo. É causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Estes parasitas são caracterizados pela presença do cinetoplasto (kDNA), uma organela rica em DNA que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria (NEVES et al., 2005; REY, 2010).

Ela faz parte de um grupo de doenças nomeadas de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grupo diverso de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países. Populações que vivem em locais sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos são as mais afetadas. Por apresentar características clínicas e epidemiológicas distintas por regiões, pode ser dividida em três grupos distintos de acordo com a OMS sendo elas a leishmaniose cutânea (LC), muco cutânea (LMC) e visceral (LV) sendo a LC a forma mais branda da doença e a LV a forma mais agressiva que leva a morte caso não tratada adequadamente.

1.3.1 Leishmaniose no Brasil e no mundo

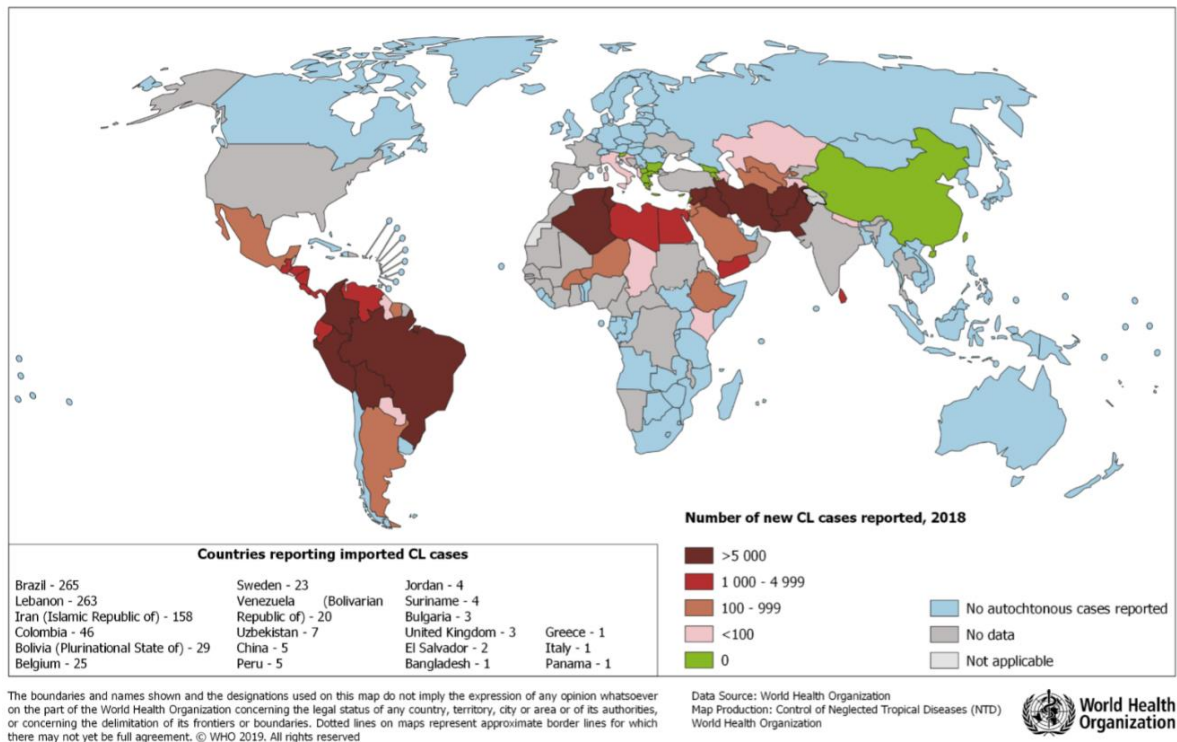
As leishmanioses causam cerca de 20.000 a 40.000 mortes por ano no mundo, mas, como ocorre na maioria das DTN, os números são geralmente subestimados devido a subnotificação na Ásia e África (ALVAR et al., 2012). De acordo com a OMS, em 2017, 94% das notificações de casos novos de leishmaniose foram concentrados em sete países, incluindo o Brasil e em 2018, 92 países ou territórios foram considerados endêmicos para a LC e 83 para a LV. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e estão em risco de infecção e estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de LC ocorrem anualmente, porém a OMS ressalta que boa parte dos casos são assintomáticos ou são subnotificados (Fig. 6) (<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>).

Nas Américas, a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) estima que, 75% dos casos de LC são concentrados em 10 países sendo que 4 deles estão localizados na América, incluindo o Brasil e também é um dos países que mais possuem casos de LV juntamente com a Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Somália (<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>).

Outro problema causado pela LV é a sua co-infecção com pacientes HIV positivos, uma vez que pacientes HIV positivos são mais vulneráveis a terem LV e seu tratamento se torna muito arriscado com altas chances de morte, a LV por sua vez acelera a replicação do HIV fazendo com que os pacientes tenham sintomas mais severos. Mundialmente falando, 35 países já notificaram essa coinfeção, sendo a maioria dos países localizados na Europa, onde cerca de 70% dos casos notificados de LV foram com pacientes HIV positivos (https://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/).

Atualmente, o tratamento da leishmaniose é dependente do uso de diferentes drogas, no entanto, todos os compostos quimioterapêuticos aprovados para doenças de tripanossomatídeos sofrem de alta toxicidade que limitam sua eficácia. Assim, uma busca por alvos antiparasitários seletivos deve ser uma abordagem poderosa para encontrar futuras fontes terapêuticas para o planejamento de novas drogas mais específicas (NUSSBAUM et al., 2010). Estes dados mostram que o estudo sobre leishmanioses tem sua necessidade e importância para a descoberta de novas drogas, vacinas e outros métodos para erradicar a doença.

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2018



Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018

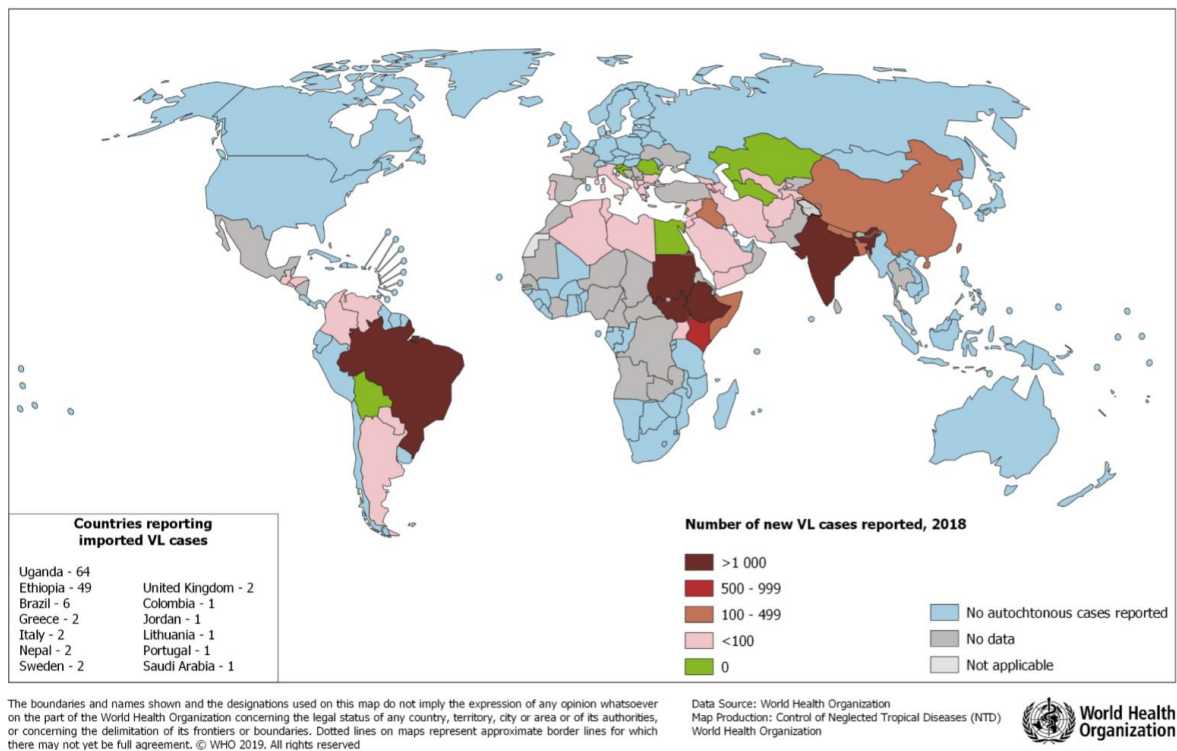


Figura 5. Situação epidemiológica mundial da leishmania cutânea e visceral em 2018, respectivamente (<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>).

1.3.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida desses parasitas é um ciclo heteroxênico, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro para completarem seu ciclo de vida, passando por uma fase promastigota extracelular, no aparelho digestivo de insetos hematófagos dos gêneros *Lutzomyia* (novo mundo) ou *Phlebotomus* (velho mundo) (Fig. 5). A transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre no momento da picada do mosquito fêmea contaminado com o parasita na forma promastigota metacíclico. Neste momento, a forma parasitária é inoculada na corrente sanguínea, sendo então fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário, como os macrófagos. Dentro destas células, os parasitas passam por modificações morfológicas se transformando na sua forma amastigota, caracterizada pela ausência de flagelo, sendo exclusivamente intracelular, encontrada somente no hospedeiro vertebrado. Estes amastigotas se dividem por bipartição até o momento em que ocorre a lise da célula hospedeira. Neste momento, os amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro. De acordo com a espécie haverá uma resistência maior à diferentes temperaturas, caracterizando as diferentes formas clínicas da doença. Caso um inseto do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* se alimente desse vertebrado, poderá ingerir as formas amastigotas. Ao chegarem ao intestino médio do inseto, o parasita novamente se diferencia em promastigota procíclico que por sua vez se dividem e maturam em promastigota metacíclico no intestino e seguem até a probóscite do inseto, podendo assim infectar um novo hospedeiro mamífero. (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; NEVES et al., 2005; REY, 2010).

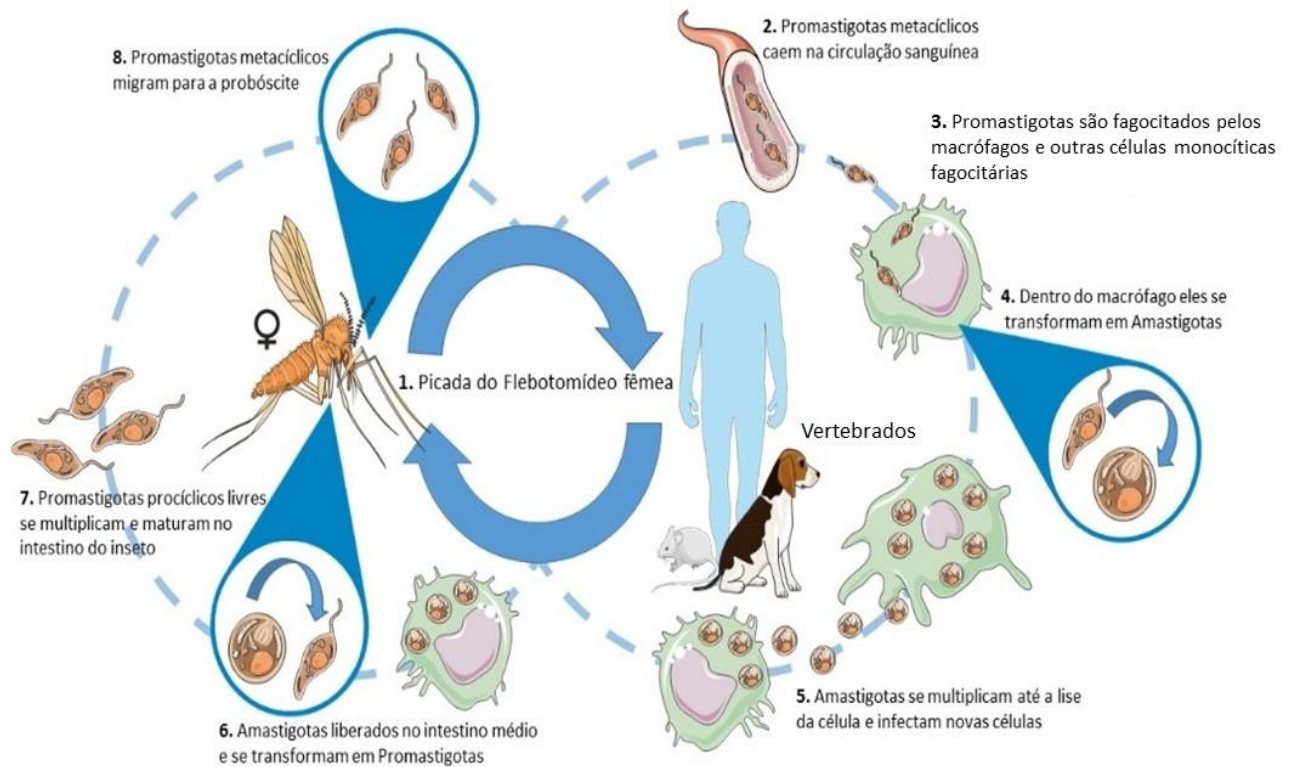


Figura 6. Ciclo de vida da leishmania. (Autoria própria, 2020)

1.3.3 *Leishmania major*

A *Leishmania major* foi uma das primeiras espécies a serem descobertas e é responsável pela maioria dos casos de LC no Velho mundo, principalmente no litoral mediterrâneo, Oriente Médio, subcontinente indiano e Ásia central juntamente com a *Leishmania tropica*. A *L. major* é endêmica também nas áreas rurais da Rússia, Irã Iraque e Ásia Central. A leishmaniose causada por essas espécies é caracterizada pelas infecções que ficam limitadas à pele, não dando origem a metástases nas mucosas e nem invadem outros órgãos. (BRAY, 1974; JERONIMO; SOUZA; PEARSON, 1987; REY, 2010).

1.3.4 Proteínas de parasitas do gênero *Leishmania* e seu transporte nuclear

Diferentes estudos identificaram proteínas encontradas exclusivamente em parasitas da família Trypanosomatidae, como por exemplo a proteína Rbp38, que está envolvida em diversas atividades nos núcleos celulares (LIRA et al., 2007; LIU et al., 2006; SBICEGO et al., 2003). Outras proteínas, como a Proteína de Replicação A (RPA), a principal proteína de ligação ao DNA de cadeia simples em eucariotos, apresentam diferenças estruturais notáveis entre os parasitas tripanossomatídeos (*L. amazonensis* e *T. cruzi*) e outras RPA de outros eucariotos, afetando sua

interação com o ssDNA (PAVANI et al., 2014, 2016). Esses estudos foram realizados pelos grupos das professoras Maria Isabel Cano (IB-UNESP) e Maria Carolina Elias (Inst. Butantan) com a colaboração do nosso grupo nos ensaios estruturais e publicados em *FEBS Letters* e *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Nestes estudos, foi demonstrado que essas proteínas possuem sequências putativas de NLS, que poderiam se ligar à Imp α e esses complexos podem ser importados para o núcleo.

1.3.5 Proteína Rbp38

A Rbp38 (*RNA Binding Protein 38*) é uma proteína exclusiva dos tripanosomatídeos que foi primeiramente descrita em *L. tarentoale*, com a função de manutenção e estabilização do RNA mitocondrial (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). Posteriormente ela foi estudada em *T. brucei* onde ela apresentou também uma possível função no processo de replicação do kDNA (LIU et al., 2006; SBICEGO et al., 2003). Por fim, outro estudo em *L. amazonenses* mostra que, além das duas funções acima citadas, a Rbp38 pode participar de eventos no DNA nucleico, uma vez que ela possui a habilidade de ligação com o DNA telomérico, mostrando assim sua alta diversidade funcional nos tripanosomatídeos (FERNANDES et al., 2019; LIRA et al., 2007).

Com essa alta diversidade funcional, foi questionado por Fernandes e colaboradores como ela seria transportada entre estes compartimentos e ao estudar sua sequência eles visualizaram que seus primeiros 26 aminoácidos na porção N-terminal correspondem a uma sequência sinal responsável pelo reconhecimento e transporte para interior mitocôndria e na porção C-terminal, eles encontraram um possível NLS não clássico que possui potencial de ser reconhecido pela Imp α e assim permitir o transporte para o interior nucleico (FERNANDES et al., 2019).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como foco o estudo estrutural com a Imp α de *L. major* com a finalidade de avançar no entendimento do transporte de proteínas de leishmania para o interior do núcleo celular e compreender suas especificidades em relação a proteínas de mamíferos.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- i. Produção da proteína Imp α de leishmania recombinante;
- ii. Caracterização biofísica da proteína;
- iii. Comparação biofísica da Imp α de *Leishmania major* com a de *Mus musculus* e *Homo sapiens*
- iv. Testes de afinidade da Imp α de *Leishmania major* com o NLS da proteína Rbp38 e do antígeno do vírus de símio 40
- v. Elucidação de um modelo da Imp α de *Leishmania major* nativa e com a presença do NLS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e transformação das Imp α truncadas

As três Imp α foram truncadas e fusionadas a uma cauda de histidina (6xHis) em seu N-terminal correspondente ao seu domínio IBB.

3.1.1 *Importina- α de Mus musculus (MmImp α)*

A sequência da proteína de MmImp α isoforma 2, foi truncada (70-529), e clonada no vetor pET-28a (Novagen). As bactérias *Escherichia coli*, linhagem BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o vetor e os clones selecionados, cedidas por nosso colaborador, Prof. Kobe, da Universidade de Queensland, Austrália.

3.1.2 *Importina- α de Homo sapiens (HsImp α)*

A sequência da proteína de HsImp α isoforma 2, foi truncada (71-529). O vetor então foi inserido na bactéria *E. coli*, linhagem BL21 (DE3) *Codon Plus* por choque térmico e transformadas seguindo o protocolo descrito por Teh e colaboradores (TEH; TIGANIS; KOBE, 1999). Os experimentos de clonagem e transformação foram realizados juntamente com a mestranda Tainá da Silva Dorte.

3.1.3 *Importina- α de Leishmania major (LmImp α)*

A sequência da proteína de LmImp α foi truncada (70-539) e clonada no vetor pET-30a (Novagen). O vetor então foi inserido na bactéria *E. coli*, linhagem BL21 (DE3) *Codon Plus* e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Ambas realizadas por choque térmico e suas transformações foram baseadas no protocolo citado anteriormente para a HsImp α (item 3.1.2).

3.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes MmImp α e HsImp α .

A metodologia aqui descrita tem como base o protocolo anteriormente descrito em Fontes *et al.*, 2000 (FONTES; TEH; KOBE, 2000). As bactérias *E. coli* contendo os plasmídeos de expressão pET-30a armazenadas como cultura permanente em nitrogênio líquido (-196 °C), foram pré-inoculadas em tubos tipo falcon contendo 15 ml de meio LB (Luria Bertani) líquido e os antibióticos cloranfenicol e canamicina (50 mg/ml cada). Os pré-inóculos foram mantidos sob

agitação a 200 rpm, 37 °C, *overnight* para crescimento das culturas. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi adicionado em erlenmeyers contendo 500 ml de meio LB líquido e os antibióticos cloranfenicol e canamicina (50 mg/ml cada) e mantidos sob agitação a 200 rpm, 37 °C até atingir a densidade óptica Abs= 600 nm, medida em espectrofotômetro. Após essa etapa, foi adicionado em cada erlenmeyer 5 ml de IPTG (Isopropil β- d- tiogalactopiranosídeo) a 100 mM, para indução da produção das proteínas recombinantes. Os erlenmeyers foram submetidos a uma agitação de 200 rpm, 28 °C, por 4 horas. Ao fim desse período, o conteúdo dos frascos foi centrifugado à 4 °C, 6000 rpm por 30 min para sedimentação das células bacterianas, permitindo a separação destas (em *pellets*) do meio de cultura.

Os *pellets* obtidos após a centrifugação foram submetidos a lise celular para ruptura das células bacterianas e obtenção das proteínas solúveis, através da suspensão das células através da adição de Tampão (50 mM de HEPES, pH 7,0, 5 mM de Imidazol, 1 mM de MgCl₂, 500 mM de NaCl) contendo lisozima (1 mg/ml), 1 mM de PMSF, 0,1 mM de TCEP, DNase, RNase e os inibidores de proteases aprotinina, leupeptina e pepstatina (1 µg/ml cada). As soluções foram mantidas em gelo, por cerca de 1 hora e agitadas, periodicamente. Ao fim desse período, as soluções foram centrifugadas a 6000 rpm por 30 min, 4 °C e a porção sobrenadante, onde espera-se encontrar as proteínas solúveis, armazenadas para a etapa posterior de purificação por cromatografia líquida. A cada etapa foi retirado uma alíquota para monitoramento dos processos que foram analisados através de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% utilizando um marcador de peso molecular.

A purificação das proteínas contidas nos extratos obtidos após a lise celular foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de níquel His-Trap FF Crude 5 ml (GE Healthcare), acoplada ao aparelho ÄKTA Purifier System (GE Healthcare). Após a injeção do extrato na coluna, foi realizada a eluição de moléculas com ligação inespecífica com a passagem de tampão A contendo 20 mM de HEPES pH 7,0, 1 M de NaCl e 5 mM de Imidazol para a HsImpα e 15 mM de Imidazol para a MmImpα. Posteriormente, elas foram eluídas e coletadas em frações de 1,5 mL, através do fluxo de tampão A junto a um gradiente de 0 a 100 % de tampão B contendo 20 mM de HEPES pH 7,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol, para ambas.

Os picos de eluição observados através do cromatograma obtido foram coletados separadamente e amostras de cada pico foram submetidas a análise por gel de eletroforese SDS-PAGE 12 % para verificação das frações mais puras utilizando marcador de peso molecular. Em seguida, as frações mais puras foram submetidas a diálise para remoção do tampão com Imidazol

para tampão contendo 20 mM de Tris HCl pH 8,0 e 100 mM de NaCl, que permite a manutenção da estabilidade das proteínas.

Para a diálise, as amostras foram armazenadas em membranas e mergulhadas em tampão sob agitação constante à 8 °C, *overnight*. Em seguida, essas amostras foram concentradas, utilizando o dispositivo de ultra filtração Vivasparin 20, 30kDa (GE Healthcare) e armazenadas a temperatura de -20 °C.

3.3 Expressão, Indução e Obtenção de amostra da proteína recombinante de LmImp α para purificação

A expressão da LmImp α se deu da mesma forma do que as outras duas Imp α (item 3.2) e para a indução foram testadas concentrações diferentes de IPTG (50 mM, 100 mM e 150 mM) retirando alíquotas antes da indução e depois de 2 a 5 horas de indução para análise através de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% e assim definir a concentração adequada de IPTG bem como o tempo de indução.

Para a obtenção da amostra a partir do *pellet* de LmImp α foram testados três métodos distintos, sendo um através da parte solúvel da lise celular e os outros dois através do isolamento de corpúsculo de inclusão. Alíquotas foram retiradas de todas as etapas de todos os protocolos a fim de monitoramento e análise por gel de eletroforese SDS-PAGE 12%.

Método 1- Obtenção da amostra íntegra a partir do solúvel seguindo o mesmo protocolo utilizado para as outras duas Imp α (item 3.2).

Método 2- Obtenção da amostra a partir do isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando Ureia (CLARK; SCHWARZ; RUDOLPH, 1999).

Cada 1 g de pellet foi ressuspensionado em 5 ml de solução A (0,1 M Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) com a adição de lisozima (1,5 mg/ml), incubado no gelo por 30 min, em seguida foi sonificado a 30 W com 20 segundos de pulso e 40 segundos de descanso por 30 min. Em seguida adicionou-se 3 mM de MgCl₂, DNase e RNase (10 µg/ml cada) e incubado a temperatura ambiente por 30 min sob agitação constante. Após foi adicionado uma solução B (20 mM de EDTA, 2 % de Triton X-100, 0,5 mM de NaCl) e a amostra incubada no gelo, em seguida a solução foi centrifugada a 8000 rpm por 15 min a 4 °C e o pellet foi ressuspensionado em 40 ml de solução C (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5 e 20 mM de EDTA) e novamente centrifugado e por fim o pellet foi novamente ressuspensionado

com a solução D (500 mM de NaCl, 8 M de Ureia, 20 mM Tris pH 7,5, 1 M de β -mercaptoetanol e 25 mM de Imidazol) e centrifugado mais uma vez a 8000 rpm por 15 min a 4 °C.

A parte solúvel foi submetido a uma diálise escalonada para *refolding* onde seu tampão inicial era composto por 500 mM de NaCl, 7 M de Ureia, 20 mM Tris pH 7,5 e a cada diálise diminuía-se 1 M de ureia a fim de que todos os agentes denaturantes presentes no extrato, fossem retirados através de uma membrana semipermeável, permitindo a separação de moléculas em solução através dos poros desta membrana. A diálise foi realizada de maneira escalonada para evitar a precipitação proteica e ao final da diálise escalonada, a amostra foi submetida a uma última diálise para o tampão A de purificação composto por 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 M de NaCl e 5 mM de Imidazol.

Método 3- Obtenção de amostra a partir do Isolamento de Corpúsculo de Inclusão utilizando N-Propanol (SINGH et al., 2015).

Cada 0,3 g o pellet foi suspenso em 5 ml de Tris pH 8,5 a 50 mM, sonificado a uma potência de 20 W, 55 segundos de pulso e 55 segundos de descanso por 10 ciclos e centrifugado a 8000 rpm, 4 °C por 15 min. Resuspendeu-se então em 5 ml de solução 1 (50 mM Tris pH 8,5 e 2 % de Deoxicolato de Sódio), sonificado e centrifugado novamente. Em seguida ele foi ressuspenso em 5 ml de solução 1, centrifugado e lavado duas vezes em água. Por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 5 ml de solução 2 (50 mM de Tris pH 8,5, 10 % de Sucrose, 0,5 mM de EDTA, 6 M de N-Propanol e 2 M de Ureia) juntamente com os inibidores de protease, aprotinina, pepstatina e leupeptina a 1 mg/ml cada, incubado em temperatura ambiente e centrifugado a 8000 rpm, 4 °C por 15 min.

3.4 Purificação da proteína recombinante de LmImpa pelo método de Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC)

3.4.1 HPLC por afinidade

Para os testes de cromatografia por afinidade foram testados dois tipos de coluna sendo elas a coluna de Níquel His-TrapTM FF Crude 5 ml (GE Healthcare) e a de Cobalto HiTrap TALON Crude 5 ml (GE Healthcare), acopladas ao aparelho ÄKTA Purifier System (GE Healthcare). Após a injeção do extrato na coluna, foi realizada a eluição de moléculas com ligação inespecífica através da passagem de tampão A contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 M de NaCl e 5 mM de

Imidazol. Posteriormente, a proteína foi eluída através do fluxo de 1 ml/min a um gradiente de 0 a 100 % de tampão B, contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol.

3.4.2 HPLC por Troca iônica

A cromatografia por troca iônica do tipo aniônica foi realizada com a coluna Resource™ Q 1 ml (GE Healthcare) acoplada ao aparelho ÄKTA Purifier System (GE Healthcare). Após a injeção do extrato dialisado a partir da amostra de cromatografia por afinidade em tampão C (20 mM de Tris HCl pH 8,0 e 100 mM de NaCl), posteriormente a amostra foi fracionada através de um gradiente de 0 a 100 % de tampão D (20 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 M de NaCl) com um fluxo de 0,5 ml/min.

3.4.3 HPLC por Exclusão Molecular

Esta cromatografia foi realizada no mesmo aparelho ÄKTA Purifier System (GE Healthcare) que as demais com a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) e fase móvel sendo o tampão C (20 mM de Tris HCl pH 8,0 e 100 mM de NaCl). A amostra obtida a partir da cromatografia por afinidade foi dialisada em tampão C, injetado no sistema e fracionado em um fluxo de 0,5 ml/minuto.

3.5 Concentração da amostra

Uma vez confirmada a presença da proteína através do gel de eletroforese SDS-PAGE 12 %, a amostra foi submetida a dois tipos de concentração, sendo a primeira uma tentativa utilizando o mesmo método da HsImpα e MmImpα por ultra filtração com o filtro Vivasparin 20, 30 kDa (GE Healthcare). No outro método a amostra passou por uma filtração com agitação mínima utilizando o Amicon stirred cell millipore (Merck) com um filtro millipore de 30 kDa (Merck), e então, através de uma membrana semipermeável, a amostra foi colocada no açúcar e por osmose reversa ela foi concentrada e armazenada a temperatura de -20 °C.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A cada etapa de todos os processos, desde a clonagem até a concentração da amostra foram retiradas alíquotas para realizar a averiguação da amostra e possíveis contaminantes através do seu tamanho molecular por SDS-PAGE.

O sistema de SDS-PAGE foi constituído de gel de estaqueamento (poliacrilamida 15 %, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,1 %) e o de resolução (poliacrilamida 6 %, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1 %), além de persulfato de amônio (PA) 10 % e tetrametiletlenodiamina (TEMED). Os géis foram preparados no sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) e também no sistema miniVE Modular Vertical Unit (GE Healthcare).

As amostras foram solubilizadas em um tampão SDS-PAGE (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, SDS 2 % e azul de bromofenol 0,001 %). O tampão de corrida da amostra era constituído de TrisHCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1 % pH 8,3 e os ensaios foram realizados com uma voltagem constante de 120 V.

Para controle e verificação do tamanho molecular das amostras a cada gel foi corrido um marcador padrão sendo ele da *Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder* ou *BlueELF Prestained Protein Marker- Jena Bioscience*.

Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) 0,1 %, ácido acético 10 % e etanol 50 % e descorado em solução de ácido acético 10 % e etanol 30 %, para posterior análise.

3.7 Western blot

As amostras do teste de indução foram submetidas ao experimento de *western blot* para confirmação da presença da LmImpa. Inicialmente, as amostras contidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % foram transferidas, para a membrana de PVDF Amersham HyBond™ -P (GE Healthcare) utilizando o sistema MiniVe Vertical Electrophoresis System (GE Healthcare) que, em seguida, foi saturada em solução de bloqueio contendo TBS 1 X, 3 g de leite em pó desnatado; 0,05 % Tween® 20, *overnight*. O próximo passo foi a incubar a membrana em temperatura ambiente com TBS 1X, 3 g de leite em pó desnatado, 0,25 % Tween® 20, por 2 horas. Após a incubação a membrana foi lavada cinco vezes por 5 minutos cada lavagem com TBS 1 X. Nessa mesma solução, a membrana foi incubada, por 1 hora, junto ao anticorpo monoclonal anti-histidina

produzido em rato, diluído a 1:3000 (Sigma-Aldrich) e lavada, cinco vezes, com TBS 1 X por 5 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada em solução de bloqueio com o segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), em uma diluição 1:10000, seguido de cinco lavagens com TTBS 1 X, com duração de 5 minutos cada. A revelação foi feita em câmara escura seguindo o protocolo da *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare).

3.8 Síntese dos Peptídeos

3.8.1 Peptídeo Rbp38 (Rbp38 NLS)

A sequência NLS da proteína Rbp38 (Rbp38 NLS) utilizado neste projeto foi previamente identificada pela Prof^a. Maria I. Cano (Dept. de Ciências Químicas e Biológicas - UNESP, Botucatu). A Rbp38 NLS (³⁰³PIKESERRRGVPFSTGTSAP³²²) foi sintetizada pela empresa GenOne para garantir um grau de pureza maior do que 98 %.

Tabela 2. Comparação das sequências consenso de cNLSs (FONTES; TEH; KOBE, 2000) com a sequência do peptídeo da Rbp38, onde em vermelho estão as partes diferentes e em verde as partes que coincidem com o consenso. Estão comparadas duas possíveis sequências de ligação da Rbp38 NLS, a primeira sendo com um comportamento monopartido, se ligando a apenas um dos sítios de interação por vez e a segunda sendo caso ela se ligue de forma bipartida, se ligando aos dois sítios ao mesmo tempo.

	Sítio Secundário					Linker	Sítio Principal				
	P0'	P1'	P2'	P3'	P4'		P1	P2	P3	P4	P5
Consenso Monopartida		K	R	K/R			K	K/R		K/R	
Rbp38 NLS monopartida	E	R	R	R	G	E	R	R	R	G	
Consenso Bipartida			K	R		X ₁₀₋₁₂	K	R		K	
Rbp38 NLS bipartida	P	I	K	E	S	X ₁₀	G	T	S	A	P

3.8.2 Peptídeo do antígeno T do vírus de símio 40 (SV40 NLS)

O peptídeo de SV40 (SV40 NLS) (¹²⁶PKKKRKV¹³²) foi sintetizada pela empresa GenOne para garantir um grau de pureza maior do que 98 %.

Tabela 3. Comparação da sequência consenso de cNLS monopartida com a sequência da SV40 NLS (FONTES; TEH; KOBE, 2000), onde em azul está destacado a correspondência com a sequência consenso.

	Sítio Secundário					Sítio Principal						
	P0'	P1'	P2'	P3'	P4'	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
Consenso Monopartida		K	R	K/R			K	K/R		K/R		
SV40 NLS	K	K	R	K	V	P	K	K	K	R	K	V

3.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O DLS possibilita o cálculo do coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula (DT), a partir de seu movimento browniano em solução (AMARE; BURLEY, 1994). Após a obtenção do DT, calcula-se o raio hidrodinâmico da molécula (R_H) pela equação de Stokes-Einstein. Em seguida pode-se obter de maneira aproximada a massa molecular, estimada com a curva de calibração de proteínas globulares de massa conhecida.

Ensaio de DLS podem ser empregados também para verificar as características de agregação (polidispersidade, Pd) de uma amostra em solução, uma vez que amostras com baixo índice de Pd (< 15 %) apresentam probabilidade maior de cristalização (AMARE; BURLEY, 1994). Ainda, com a estimativa da massa molecular da amostra é possível se obter, em amostras com baixa polidispersividade, uma indicação do estado oligomérico da proteína em solução. Os experimentos de DLS foram executados com o sistema DynaPro™ Titan (Wyatt Technology). Com o software Dynamics 6.10, foram analisadas 100 medidas das Impα em variadas temperaturas (5 °C, 10 °C, 20 °C e 25 °C) em uma rampa de variação crescente e decrescente, após calibração automática da intensidade do feixe e estabilização da amostra por 5 minutos em tais temperaturas. Os experimentos de DLS foram realizados sob supervisão do Dr. Fábio Florença Cardoso.

3.10 Dicroísmo Circular (CD)

O CD é um método que pode ser utilizado para analisar a estrutura secundária de proteínas em solução e o enovelamento de proteínas recombinantes. A técnica consiste na incidência de uma luz polarizada nos sentidos horário e anti-horário sob uma cubeta contendo a amostra. Os experimentos que foram realizados nesta dissertação resultaram espectros correspondentes a média de 20 acumulações, já subtraído da medida do tampão (branco) e normalizado pela transformação da unidade de miligraus para elipicidade residual média $[\theta]$ (GREENFIELD, 2004). O experimento de CD foi realizado com as amostras das Impα, em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5

nm e uma velocidade de leitura de 100 nm/min. As medidas foram feitas utilizando o aparelho Jasco J-815 (JASCO Inc., Tokyo, Japan), equipado com um sistema peltier PTC-423-S para controle de temperatura, em uma faixa de 190 – 260 nm à 20 °C. A estimativa de conteúdo de estrutura secundária foi realizada com a utilização do programa CONTINN do pacote CDPro (SREERAMA; WOODY, 2004). Os experimentos foram realizados sob supervisão do Dr. Fábio Florença Cardoso.

3.11 Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência é direcionada em um ângulo reto em relação ao feixe incidente e detectada através de um monocromador por um fotomultiplicador. Varreduras automáticas dos comprimentos de onda são realizadas por monocromadores motorizados, que são controlados por dispositivos eletrônicos e pelo computador, no qual os dados são armazenados. O módulo ótico contém uma porta amostra, fendas, polarizadores e um espalhador de feixe para fotodiodos. O gráfico mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, fixando o comprimento de onda da luz de excitação. Este espectro representa a transição do nível vibracional do primeiro estado excitado para o estado fundamental (STRYER, 2016; WARD, 1985). O triptofano é altamente sensível ao seu ambiente local, portanto, as alterações conformacionais moleculares devido a transições conformacionais, associação de subunidades, ligação de substrato ou desnaturação afetam o ambiente local em torno do anel indol.

A espectroscopia de fluorescência fornece informações sobre o tamanho, forma molecular e as viscosidades locais do ambiente de um fluoróforo, além de oferecer uma visão sobre as mudanças nos tamanhos moleculares de proteínas e outras macromoléculas. As medições da espectroscopia de fluorescência estática das Imp α foram registradas usando um espectro fluorímetro Hitachi F-7000 com auxílio da doutoranda Hamine Cristina de Oliveira. Para tanto foi utilizada uma cubeta de comprimento de caminho de 1 cm com um comprimento de onda de excitação de 285 nm. A fonte de luz é uma lâmpada de xenônio de alta pressão, que oferece a vantagem de emissão contínua com comprimento de onda de $\lambda = 250$ nm até o infravermelho. Um monocromador é usado para selecionar o comprimento de onda de excitação.

3.12 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)

Os experimentos de ITC são realizados a fim de medir a variação de calor relacionada à interação entre as moléculas para verificar a afinidade da proteína com o NLS. Para tanto, foram

realizados experimentos com a proteína LmImp α junto com a Rbp38 NLS e a SV40 NLS. As medidas foram realizadas utilizando o microcalorímetro MicroCal iTC200 (GE Healthcare). As amostras de LmImp α foram tituladas com o peptídeo em concentração 10 a 20 vezes maior em relação a proteína. As titulações foram realizadas em 20 injeções de 2,0 μ l com intervalo de 240 segundos entre cada titulação, nas temperaturas de 10, 20 e 25 °C, com 800 rpm de velocidade de homogeneização. Foi realizada a titulação do peptídeo no mesmo Tampão da amostra da proteína para descontar o calor de diluição das titulações dos peptídeos na LmImp α . (KELLER et al., 2013; LADBURY; CHOWDHRY, 1996). Os experimentos de ITC foram realizados com auxílio da doutoranda Hamine Cristina de Oliveira.

3.13 Modelagem, *Docking* e Dinâmica Molecular

Ferramentas de bioinformática estrutural foram utilizadas para analisar complexos formados entre a LmImp α com a Rbp38 NLS, a fim de levantar e apoiar hipóteses sobre as bases estruturais das atividades inibitórias observadas nos experimentos biofísicos. Para tanto, um modelo teórico foi gerado no SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) utilizando como base a Imp α de *Oryza sativa*, PDB 4B8J (Identidade de 43.97%), (CHANG et al., 2012; WATERHOUSE et al., 2018). O modelo teórico gerado foi validado de acordo com a análise dos contatos de todos os átomos e geometrias com o programa MolProbity (WILLIAMS et al., 2018). Os estudos de *docking* molecular com a LmImp α e peptídeo Rbp38 foram realizados utilizando o servidor de *docking* proteína-peptídeo CABS-dock (CIEMNY et al., 2018).

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o modelo de LmImp α utilizando o programa GROMACS 2018.1 (JAMES et al., 2015) empregando o campo de força CHARMM-36 (HUANG et al., 2017). Todas as simulações foram realizadas numa caixa de carga neutra com 3 Å de distância do átomo mais distante solvatado em água e equilibrado com 100 mM de NaCl. O sistema foi minimizado com o algoritmo *Steepest Descent* até chegar em uma energia abaixo de 100 kJ/mol/min. Então, um conjunto NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes) gerando velocidades de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann em 315 K usando o termostato de redimensionamento em V (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) seguido de um conjunto NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) foi realizado utilizando o barostato de Berendsen a 1 bar (BERENDSEN et al., 1984). Posteriormente, uma etapa de 10 ns foi executada usando o termostato *Nose-Hoover* (HOOVER, 1985) e o barostato de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981). Para a computação das

interações não ligadas, foram selecionados os átomos dentro da faixa de 10 Å em paralelo com de uma função de switching para contabilizar as interações de *Van der Waals* até 12 Å. Além disso, os átomos de hidrogênio foram fixados usando a função LINCS.

A estabilidade das proteínas foi verificada observando os valores de RMSD (desvio da raiz quadrática média), RMSF (flutuação da raiz quadrática média) e o raio de giro (Rg). Além disso, a trajetória foi submetida a uma clusterização usando o método de gromos (DAURA; VAN GUNSTEREN; MARK, 1999). Com uma distribuição de RMSD de 2 Å. As estruturas centrais foram vistas nos quatro clusters mais populosos e serão usados para posteriores estudos de *docking*.

As estimativas de ΔG e K_d foram geradas com o *webservice* PRODIGY (PROtein binDing enerGY prediction) (XUE et al., 2016). Todas as imagens e mapas de interações foram feitas com os programas UCSF Chimera 1.13.1, Discovery Studio 2020, LIGPLOT+ e ClustalX 1.83 (BIOVIA DS, 2017; PETTERSEN et al., 2004; THOMPSON et al., 1997a; WALLACE ET AL., 1995). Os experimentos de modelagem, *docking* e dinâmica molecular foram realizados com auxílio do doutorando Áleff Ferreira Francisco.

3.13 Árvore Filogenética das *Impα*

Foram procuradas diversas sequências de *Impα* utilizando o site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando as sequências de Mm*Impα*, Hs*Impα*, Lm*Impα*, Sc*Impα*, Os*Impα*. O alinhamento foi realizado utilizando o site MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) e o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997). A árvore de máxima verossimilhança foi feita utilizando o programa PhyML (GUINDON; GASCUEL, 2003). O suporte da filial foi derivado da pontuação do *SH-like* e χ^2 baseado nos testes de razão de verossimilhança. (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006). Também foi realizado uma segunda árvore utilizando o método Bayesiano e a probabilidade posterior. (KAESS et al., 2010). Para a construção da árvore foram utilizadas 175 *Impα* de diversos organismos incluindo mamíferos, plantas, fungos, leveduras, insetos, ovíparos entre outros. E para a visualização da árvore foi utilizado o programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Devido à falta de conhecimento de uma *Impα* em procariotos, optou-se por manter uma árvore filogenética sem raiz.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante MmImp α

Ao verificar o gel de poliacrilamida à 12 % com as amostras da expressão da proteína recombinante MmImp α seguiu-se para o processo de purificação (Fig.8). A purificação da proteína MmImp α recombinante se deu por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) por afinidade da cauda de histidina com a coluna de níquel que separou as proteínas presentes na fração solúvel do extrato total de *E. coli*. A amostra de MmImp α foi eluída com 40 % de Tampão B (20 mM de Hepes pH 7,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol). O cromatograma (Fig. 7) mostra o volume (ml) pela intensidade da absorbância (mAU).

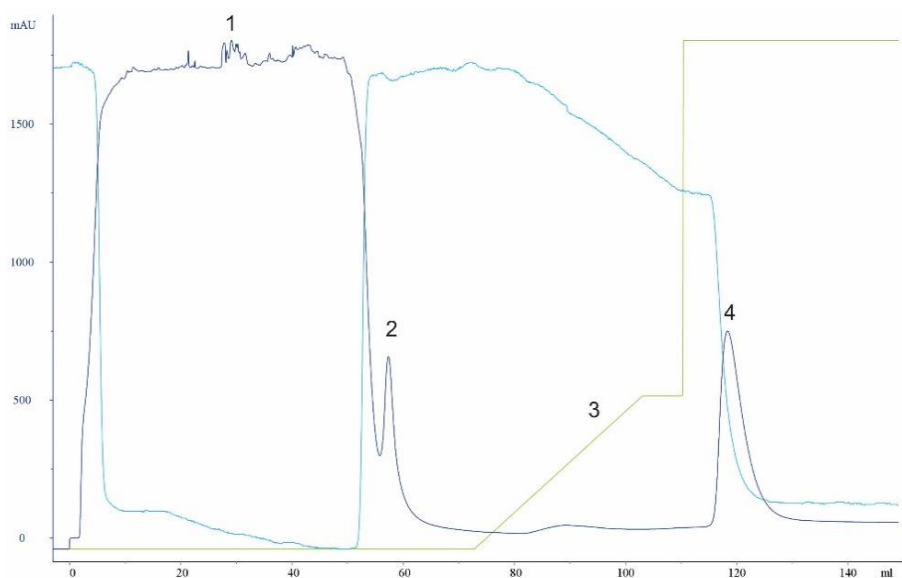


Figura 7. Cromatograma de purificação da MmImp α , onde 1 são as impurezas que passaram pela coluna sem se ligarem, 2 são impurezas que saíram com a lavagem da coluna com o Tampão A (20 mM de Hepes pH 7,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol), 3 são impurezas que tinham baixa afinidade com a coluna e saíram com o aumento da porcentagem do Tampão B e 4 é o pico da proteína em 100 % do Tampão B.

Para verificar a pureza da amostra, foi realizado outro gel de poliacrilamida à 12 % onde foi possível ver na altura de 55 kDa a presença de uma banda forte e limpa (Fig. 8), mostrando assim que a purificação teve um resultado satisfatório.

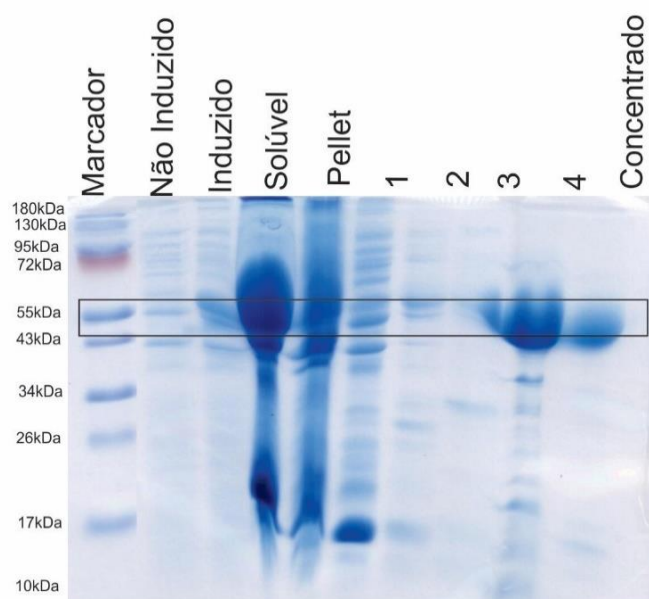


Figura 8. Gel de SDS-PAGE 12 % com alíquotas de MmImp α , onde o Não Induzido e o Induzido são antes e depois da adição de IPTG, Solúvel e Pellet são os resultados após a lise celular, os números de 1 a 4 são referentes a Figura 7 e o último é a amostra concentrada após a centrifugação.

4.2 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante HsImp α

Após a verificação da expressão de HsImp α por meio de um gel poliacrilamida 12 % vendo amostras antes e após a indução com a adição de IPTG, seguiu-se para a etapa de purificação (Fig.10). A purificação da proteína HsImp α recombinante se deu por HPLC por afinidade a coluna de níquel que separou as proteínas presentes na fração solúvel do extrato total de *E. coli*. A amostra foi eluída com 28 % de tampão B (20 mM de Hepes pH 7,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol). O cromatograma (Fig. 9) mostra o volume (ml) pela intensidade da absorbância (mAU).

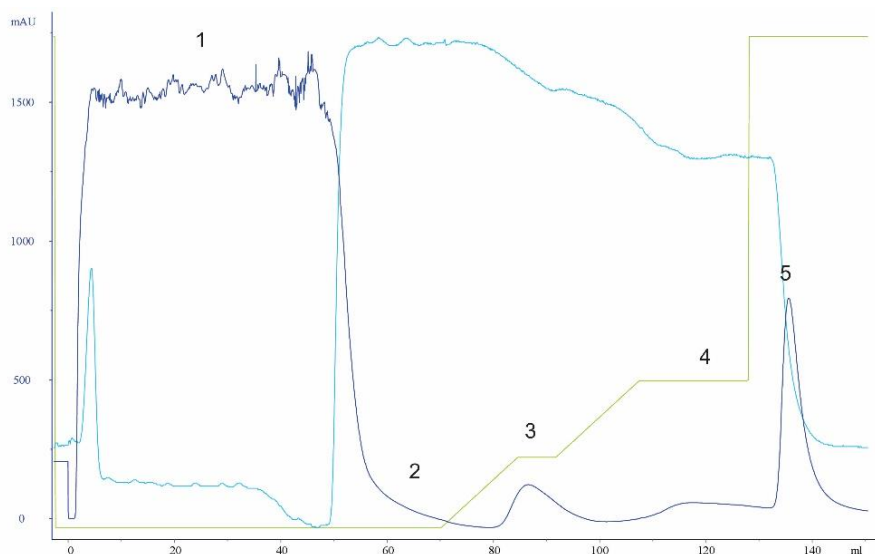


Figura 9. Cromatograma obtido com a purificação da amostra de HsImp α onde 1 são impurezas que passaram pela coluna sem terem interação com a mesma, 2 impurezas que saíram ao se passar Tampão A (20 mM de Hepes pH 7,0, 500 mM de NaCl e 5 mM de Imidazol), 3 e 4 são impurezas que saíram em porcentagens diferentes de Tampão B e 5 é o pico da proteína em 100 % do Tampão B.

Em seguida, realizou-se um experimento gel de poliacrilamida a 12 % para a verificação da proteína desde seu processo de crescimento, indução, purificação e concentração onde foi possível verificar na altura de 55 kDa a aparição bem evidente da proteína (Fig. 10).

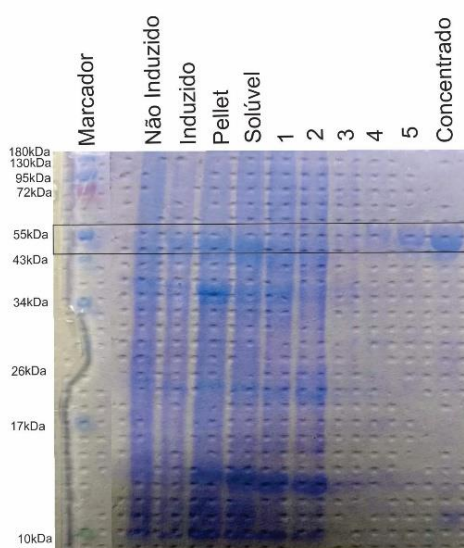


Figura 10. Gel de poliacrilamida 12 % com alíquotas de HsImp α mostrando o processo de expressão (Não Induzido e Induzido), Lise Celular (Solúvel e *Pellet*), Purificação (1 a 5) e a amostra após concentração. Os números de 1 a 5 correspondem as etapas de purificação mostrados na Figura 9.

4.3 Transformação e Expressão da Proteína Recombinante LmImpa

A transformação do plasmídeo pET-30a ocorreu utilizando as linhagens *E. coli* BL21(DE3) *Codon Plus* e *E. coli* BL21(DE3) pLysS em meio LB Ágar. Foram feitos 4 tipos de placas onde nelas continham 15 ml de meio Ágar, 1,0 µl/ml dos antibióticos Cloranfenicol e Kanamicina e uma variação de 50 µl, 100 µl, 200 µl e 300 µl das linhagens de *E. coli*. Para a *E. coli* BL21(DE3) *Codon Plus* foi escolhida a placa contendo 200 µl e para a *E. coli* BL21(DE3) pLysS foi escolhido a placa contendo 300 µl de célula (Fig.11), as demais não houve crescimento das bactérias.

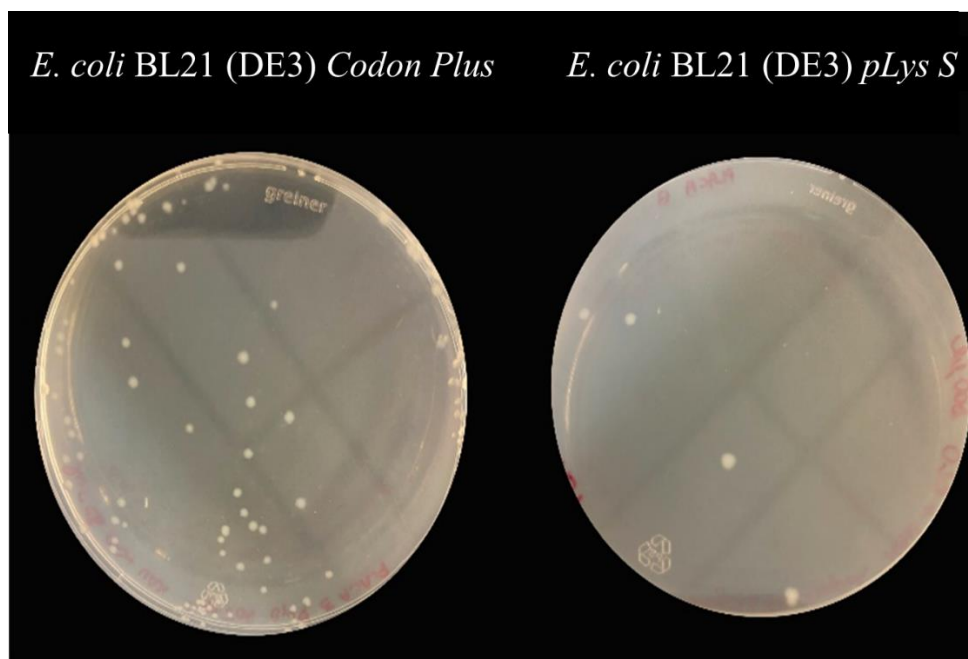


Figura 11. Placas de meio LB ágar mostrando as colônias de *E. coli* BL21 (DE3) *Codon Plus* e pLysS que cresceram e que foram coletadas para a realização dos experimentos, a esquerda, as colônias de *E. coli* BL21(DE3) *Codon Plus* e a direita, as colônias de *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

Em seguida foram realizados os testes de indução com IPTG com ambas as amostras onde após a medição da densidade óptica foi retirado uma alíquota para ser a amostra não induzida. Foram feitos testes com concentrações diferentes de IPTG, 50 mM, 100 mM e 150 mM à 28 °C, e a cada hora, foi retirado uma alíquota para verificação em gel de poliacrilamida 12 % (Fig. 12).

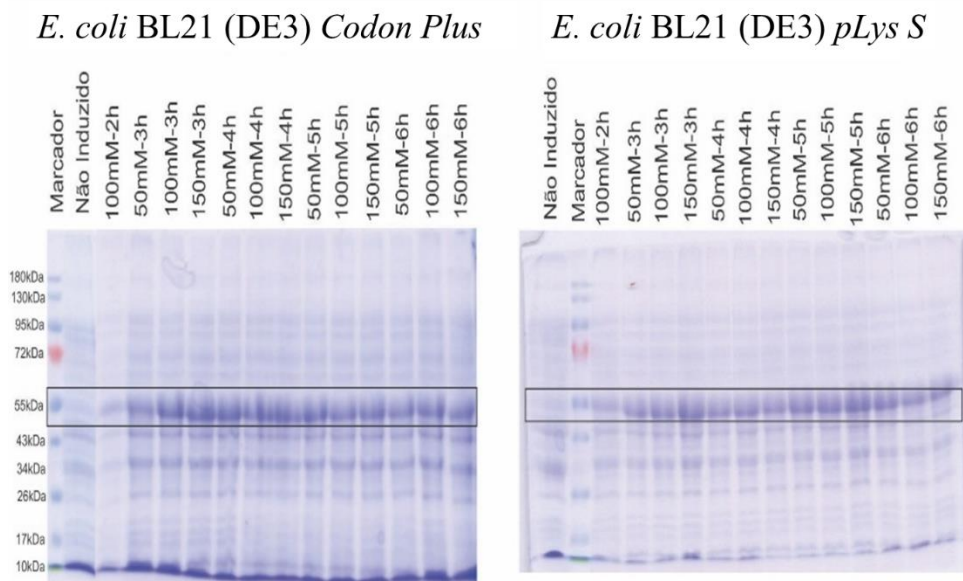


Figura 12. Gel SDS PAGE 12 % mostrando antes e o teste de indução com IPTG variando entre 50 mM e 150 mM, com alíquotas retiradas a cada hora.

Para tanto, após o teste de indução, separou-se alíquotas das frações de 100 mM de IPTG de 3 horas e 4 horas de ambas amostras para o teste de *western blot* para confirmação da presença da proteína recombinante utilizando a MmImpα como padrão (Fig. 13).

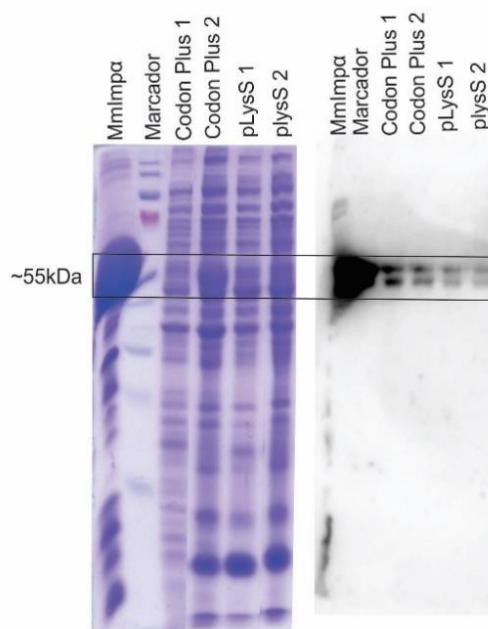


Figura 13. Gel SDS PAGE 12% e *western blot*, para a verificação da presença da LmImpα, utilizou-se a MmImpα como padrão, as amostras de *Codon Plus 1* e pLysS 1 são as amostras do teste de indução com 100 mM de IPTG por 3 horas de indução e a *Codon Plus 2* e pLysS 2 são amostras com 100 mM de IPTG por 4 horas de indução.

4.4 Lise Celular

Após a confirmação da presença e o processo de indução da LmImp α , foi feita uma expressão em larga escala e o *pellet* foi armazenado a -20 °C. O *pellet* foi lisado com o mesmo tampão de lise da MmImp α e HsImp α , sonificado e foi realizado o teste de solubilidade.

Verificando o gel de eletroforese 12 % (Fig. 14), pode-se reparar que para a *Codon plus* a proteína fica localizada na fração insolúvel e na pLysS, apesar de boa parte permanecer na fração insolúvel, há sinais de que ela também está presente na fração solúvel, sendo assim, essa porção solúvel foi separada para testes de cromatografias por afinidade a níquel, cobalto, por troca iônica e por exclusão molecular.

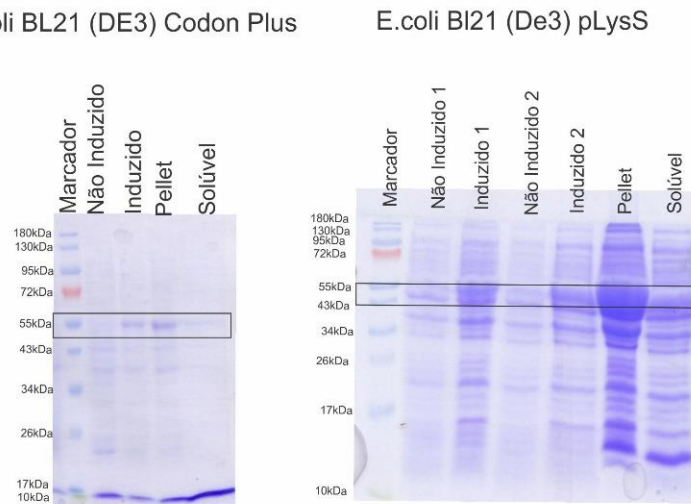
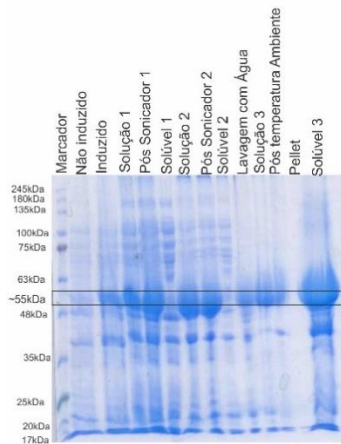


Figura 14. Géis de poliacrilamida a 12% das duas cepas mostrando a localização da LmImp α , sendo que em ambas ela fica mais alocada na porção insolúvel (*pellet*) da amostra, porém a pLysS apresenta uma certa quantidade na sua porção solúvel também.

Com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS seguiu-se o mesmo protocolo das outras importinas, utilizando o solúvel para a obtenção da LmImp α . Já com a linhagem da *Codon Plus*, os *pellets* foram submetidos a mais dois testes na tentativa de obter a proteína. Primeiro foi realizado o teste de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando N-propanol cujo resultado foi satisfatório pois a proteína se manteve no solúvel final após o procedimento. O segundo teste foi o isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando Ureia que também se mostrou eficaz, seguindo assim, para a etapa de *refolding* da proteína com diálises escalonadas e posterior cromatografia por afinidade a níquel (Fig. 15).

Isolamento de Corpúsculo de Inclusão Utilizando N-Propanol



Isolamento de Corpúsculo de Inclusão Utilizando Ureia

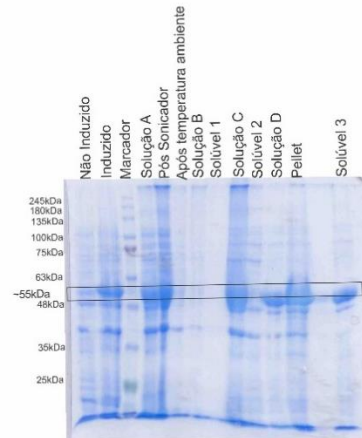


Figura 15. Géis de poliacrilamida 12% com alíquotas dos experimentos de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando N-propanol e Ureia, respectivamente.

4.5 Purificação da Proteína Recombinante LmImp α

Para obtenção da LmImp α purificada, primeiramente foi realizado uma cromatografia por afinidade e foram testadas duas colunas, a de Cobalto (Fig. 16) e a de Níquel (Fig. 17). A coluna de cobalto não se mostrou muito eficiente uma vez que a cauda de histidina não apresentou afinidade a coluna saindo juntamente com as impurezas tanto quando injetada e quando ocorreu a lavagem.

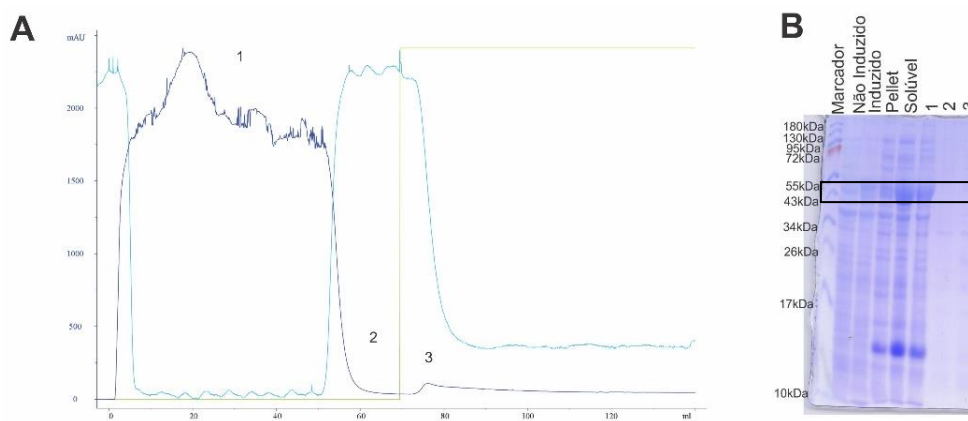


Figura 16. Cromatograma (A) mostrando o processo de purificação por afinidade a coluna de cobalto, onde 1 é o momento da amostra passando pela coluna, 2 o processo de lavagem da coluna com o tampão A contendo 5 mM de Imidazol e 3 quando foi dado 100 % de tampão B com 100 mM. Em (B) é a imagem do gel de poliacrilamida 12 % desde o processo de indução até a purificação onde os números 1,2,3 correspondem as fases da cromatografia descrita em (A).

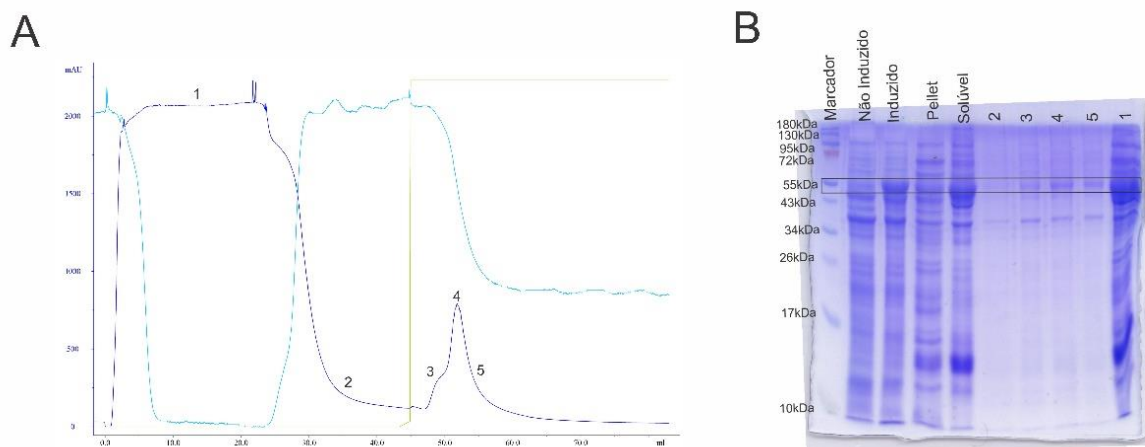


Figura 17. Cromatograma (A) da cromatografia com a coluna de níquel onde 1 é o momento da injeção da amostra, 2 o processo de lavagem da coluna com o tampão A contendo 5 mM de Imidazol, 3, 4 e 5 são partes do pico de 100 % de tampão B com 100 mM de imidazol. Em (B) é a imagem do gel de poliacrilamida a 12 % desde o processo de indução até a purificação onde os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem as fases da cromatografia descrita em (A).

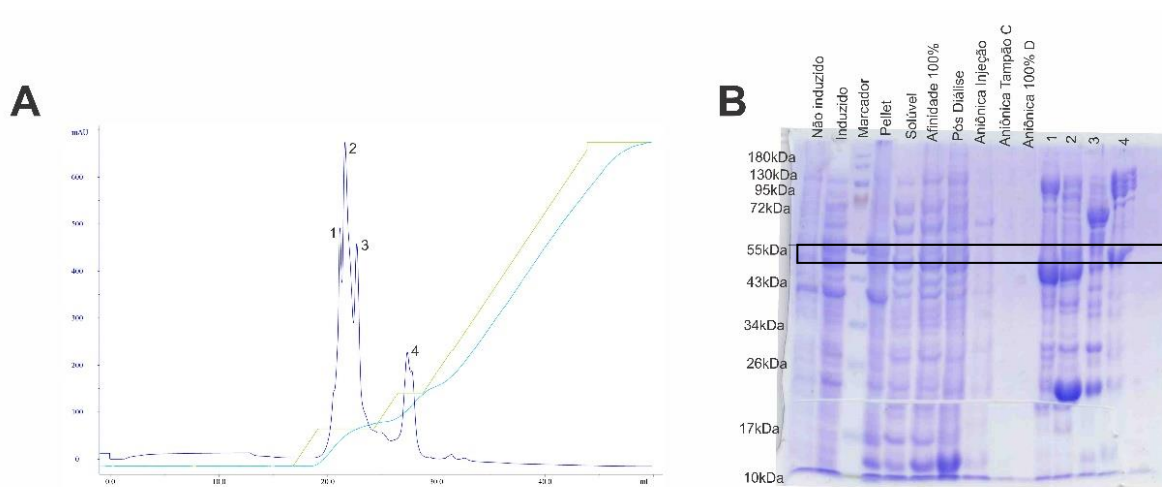


Figura 18. Cromatograma (A) do HPLC por troca iônica do tipo aniônica onde 1, 2, 3 e 4 são os picos que apareceram durante a cromatografia. O gel de poliacrilamida a 12 % (B) mostra desde o processo de crescimento e indução da bactéria (Não induzido e Induzido), a Lise celular (*Pellet*, *Solúvel*), a amostra obtida após a purificação por afinidade a coluna de níquel e a amostra seguida da diálise realizada para troca de Tampão B para o Tampão C e por fim as etapas da cromatografia por troca iônica em si, a injeção da amostra, a lavagem com Tampão C, 100 % do Tampão D e de 1 a 4 são os picos que foram descritos em (A) que foram dados conforme o gradiente de Tampão D foi aumentando.

Com a coluna de níquel, primeiramente foram realizados os testes seguindo o mesmo protocolo da HsImp α colocando 100 % de Tampão B assim que a lavagem com Tampão A foi finalizada a fim de verificar se a LmImp α teria afinidade a coluna (Fig. 17). Para refinar a purificação por afinidade foi realizado uma cromatografia por troca iônica do tipo aniônica (Fig. 18) e outro teste com uma cromatografia por exclusão molecular (Fig. 19).

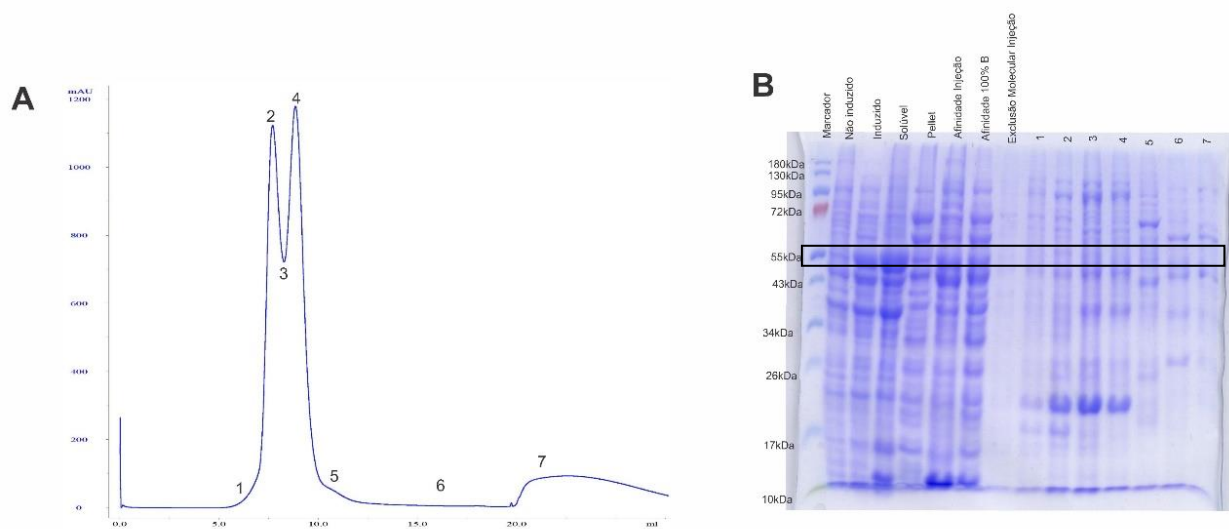


Figura 19. Cromatograma (A) da purificação por exclusão molecular onde de 1 a 7 representam as fases da cromatografia. O Gel de eletroforese SDS PAGE 12 % (B) mostra as etapas anteriores a cromatografia que foram o crescimento, indução e lise da bactéria, os momentos de injeção da amostra para a realização da cromatografia por afinidade a coluna de níquel bem como o 100 % do Tampão B. Seguido disso iniciam-se as amostras do processo de exclusão molecular onde temos alíquotas do momento da injeção da amostra e os números de 1 a 7 correspondem as partes do cromatograma mostrados em (A).

Realizado estes experimentos com a parte solúvel da amostra, foi investigado a parte insolúvel da amostra por métodos de isolamento de corpúsculo de inclusão. Após serem realizados o processo de obtenção da LmImp α através do método utilizando 8 M de ureia e dialisado de forma escalonada, a solução foi injetada na coluna de níquel e ao final da corrida pode-se obter uma amostra mais pura do que nos testes anteriores e assim a amostra seguiu para uma diálise de troca de Tampão B para o Tampão C de armazenamento e posterior concentração (Fig. 20).

A concentração da proteína foi realizada de duas maneiras, sendo a primeira forma seguindo o protocolo da HsImp α e MmImp α por centrifugação, porém a LmImp α , diferentemente das outras, não suportou as altas rotações sendo inviável a utilização do método. Assim, houve

uma mudança nesta etapa para uma concentração por osmose reversa utilizando açúcar. Para tanto foi testado o açúcar cristal e o refinado, onde o açúcar cristal se mostrou mais vantajoso pelo fato de sua concentração acontecer de forma mais gradativa diferentemente do açúcar refinado onde, pelo fato da concentração acontecer de forma mais acelerada, a proteína precipitou conforme ocorria a concentração.

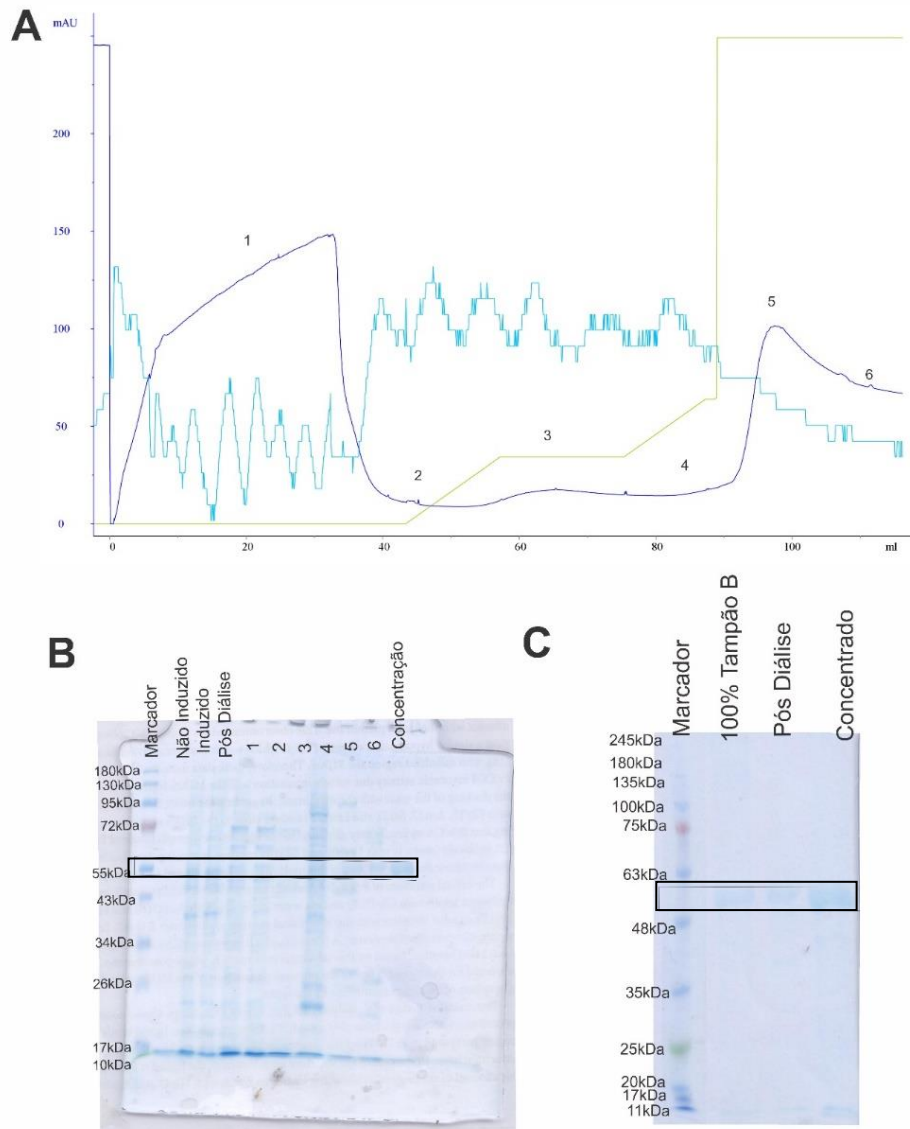


Figura 20. Cromatograma da corrida de afinidade pela coluna de níquel (A) após o processo de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando ureia onde 1 é o momento da injeção da amostra, 2 a lavagem da coluna com o tampão A, 3 e 4 são impurezas que saíram ao aumentar o gradiente de concentração do tampão B, 5 é a LmImp α ao atingir 100 % do Tampão B e 6 é o final da corrida. Em (B) temos um gel de poliacrilamida a 12 % mostrando a presença da proteína de interesse desde o processo de crescimento e indução na bactéria, após a diálise escalonada, 1 a 6 são os processos mostrados no cromatograma (A) e, por fim a amostra concentrada após 1 hora. Em (C) temos um gel de poliacrilamida a 12 % confirmatório mostrando três etapas onde temos alíquotas de 100 % de Tampão B (5 da

figura A), após a diálise da troca de Tampão B para o Tampão C de armazenamento e a proteína após todo o processo de concentração por osmose reversa utilizando açúcar.

4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz

Os experimentos de DLS foram realizados com as três Imp α truncadas e foi possível avaliar seus R_Hs, seus Pds e com esses dados estimar suas conformações.

Tabela 4. Dados de DLS da MmImp α

Temperatura	R_H	Pd	Conformação
5 °C	3,9 nm	17,4%	Monômero/Dímero
10 °C	4,0 nm	7,9%	Monômero/Dímero
20 °C	2,7 nm	12,5%	Monômero
25 °C	4,8 nm	11,0%	Dímero

Tabela 5. Dados de DLS da HsImp α

Temperatura	R_H	Pd	Conformação
5 °C	3,3 nm	10,9%	Monômero
10 °C	4,4 nm	13,5%	Dímero
20 °C	4,5 nm	16,4%	Dímero
25 °C	4,6 nm	10,4%	Dímero

Tabela 6. Dados de DLS da LmImp α

Temperatura	R_H	Pd	Conformação
5 °C	3,6 nm	14,5%	Monômero/Dímero
10 °C	4,8 nm	16,7%	Dímero
20 °C	7,1 nm	19,7%	Oligômero
25 °C	8,7 nm	23,3%	Oligômero

As conclusões da disposição oligomérica em solução se deram de acordo com o raio da amostra frente ao tamanho molecular da proteína informado, não levando em consideração o alongamento natural da molécula. O baixo índice de Pd (< 15 %) indica que a distribuição do tamanho molecular da amostra está homogênea. Os resultados foram realizados em rampa de temperatura, dos 5 °C aos 25 °C de forma crescente e depois de forma decrescente. A repetição das medidas foi realizada com as mesmas amostras.

A repetição do experimento de MmImp α medido com a mesma amostra não permitiram corroborar dos valores iniciais indicando que a amostra não suportou o aumento da temperatura

de forma estável, a proteína já apresentava sinais de estresse que podem ser observados com a diminuição abrupta do seu R_H à 20 °C. Em contrapartida, tanto a HsImp α quanto a LmImp α suportaram o aumento e diminuição da rampa de temperatura e mantiveram seus valores iniciais, denotando elevada estabilidade da estrutura terciária com a variação térmica durante os experimentos.

4.7 Dicroísmo Circular

Os experimentos de CD foram realizados com as três Imp α truncadas e foi possível avaliar sua estrutura secundária. Os principais parâmetros utilizados foram baseados nos ensaios com as amostras de Imp α de *Neurospora crassa* (NcImp α) e MmImp α reportadas pelo nosso grupo (TAKEDA et al., 2013). O processamento dos dados normalizados (avaliando a contribuição da solução, caminho óptico, concentração molar e tamanho molecular da amostra), os diferentes conjuntos de referência empregados com o algoritmo CONTIN permitiram a obtenção de padrões de estrutura secundária e os dados foram processados utilizando o programa K2D.

Tabela 7. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de MmImp α

Hélices α	51%
Folhas β	10%
“Aleatório”	38%
NRMSD	0.220

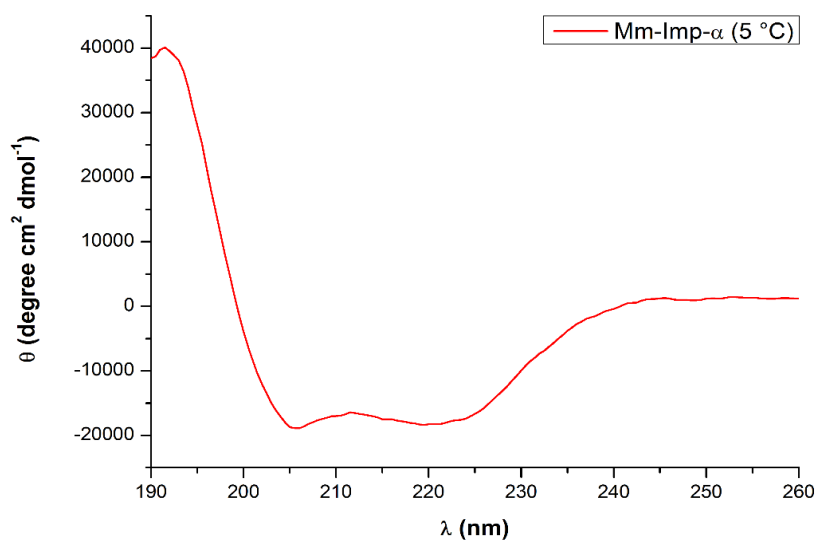


Figura 21. Espectro do CD da MmImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.

Tabela 8. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de HsImp α .

Hélices α	69%
Folhas β	4%
“Aleatório”	27%
NRMSD	0.216

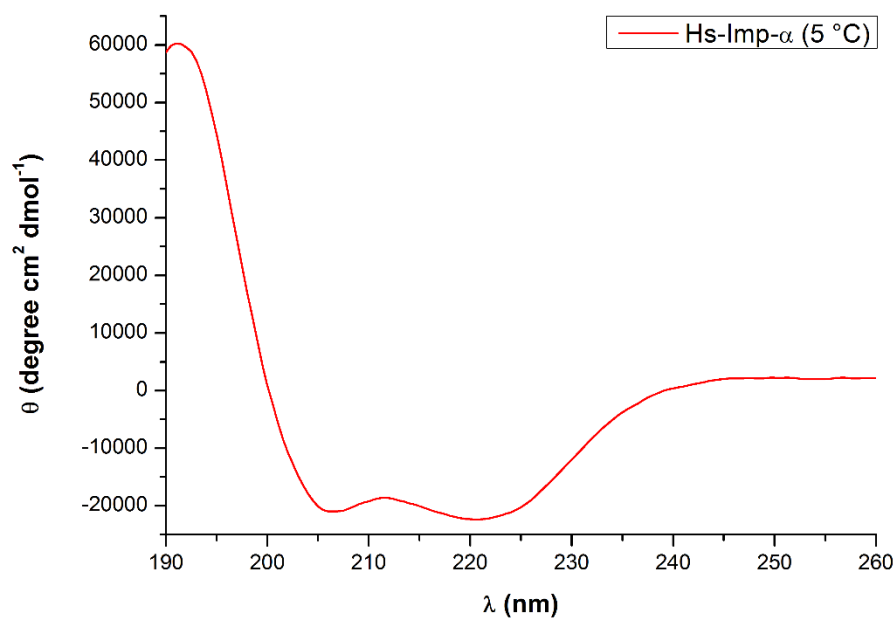


Figura 22. Espectro do CD da HsImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.

Tabela 9. Dados da estrutura secundária obtidas pelo CD da proteína de LmImp α .

Hélices α	10%
Folhas β	36%
“Aleatório”	55%
NRMSD	0.237

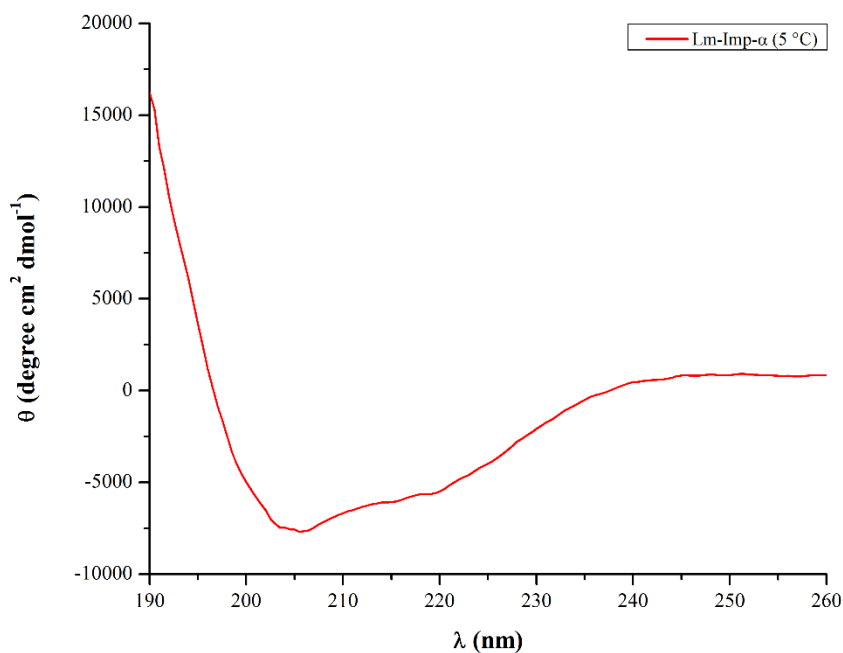


Figura 23. Espectro do CD da LmImp α à 5 °C no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm.

Tanto os dados de HsImp α quanto MmImp α estão condizentes com a estrutura da Imp α , com 51 % e 69 % de hélices- α , respectivamente. A LmImp α por sua vez não apresentou tal comportamento, com somente 10 % de hélices- α . Tal dado se deve provavelmente ao processo de obtenção da amostra onde a proteína foi desenovelada e depois passou por um processo de *refolding* onde suas hélices- α podem não ter sido re-enoveladas de maneira correta tornando elas um pouco mais abertas e o processamento dos dados de CD realizou a leitura como sendo folhas β ou como “aleatório”.

As amostras foram avaliadas sob aquecimento gradual, mantendo-se os demais parâmetros experimentais aumentando de 5 °C à 60 °C de 5 em 5 graus e por fim uma medida à 90 °C a fim de se obter o desenovelamento pelo estresse térmico. Os resultados serão mostrados a seguir.

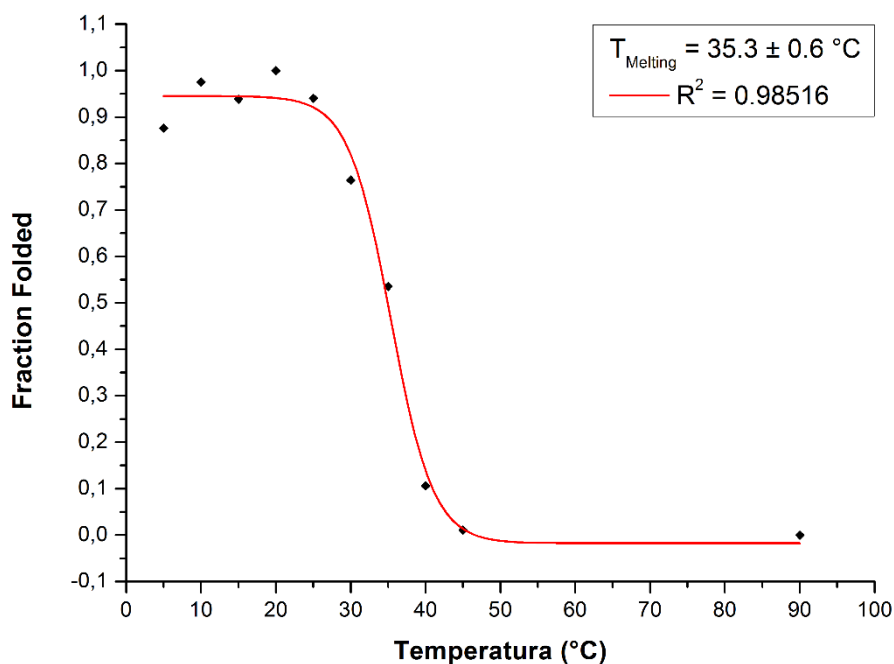


Figura 24. Curva de desnaturação térmica da MmImpα com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.

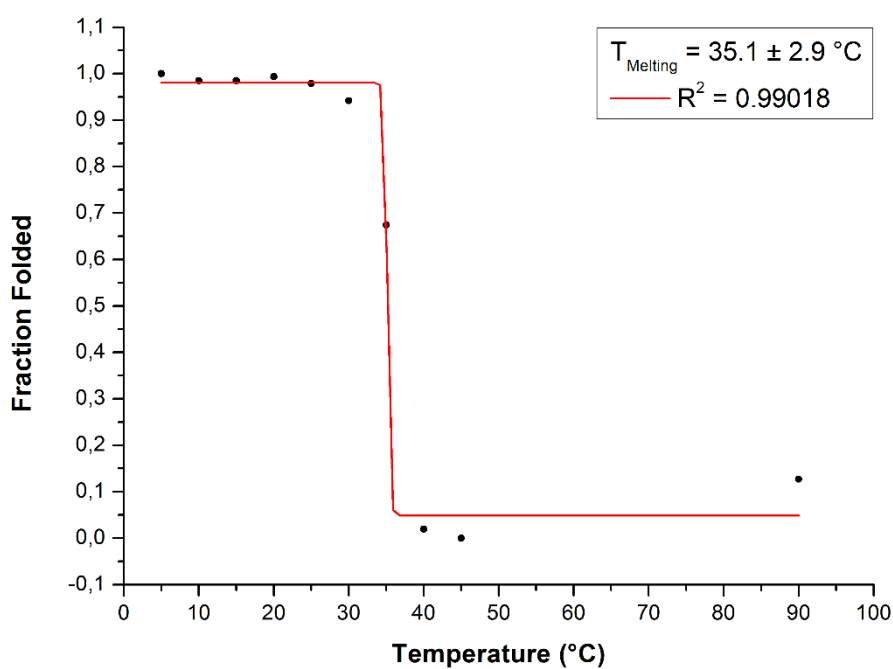


Figura 25. Curva de desnaturação térmica da HsImpα com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.

Comparativamente ao desenovelamento da MmImpα, a HsImpα apresentou melhor estabilidade estrutural até os 30 °C e, devido variação gradual térmica de 5 °C, a resposta da perda de organização estrutural secundário apresentou desenovelamento aparentemente brusco. Medidas a cada 1 °C entre 30 °C e 40 °C podem oferecer maior resolução desta desorganização estrutural

nesta faixa de temperatura. Entretanto, o ajuste da resposta ao estresse térmico já apresenta elevada conformidade aos dados experimentais ($R^2 > 99\%$).

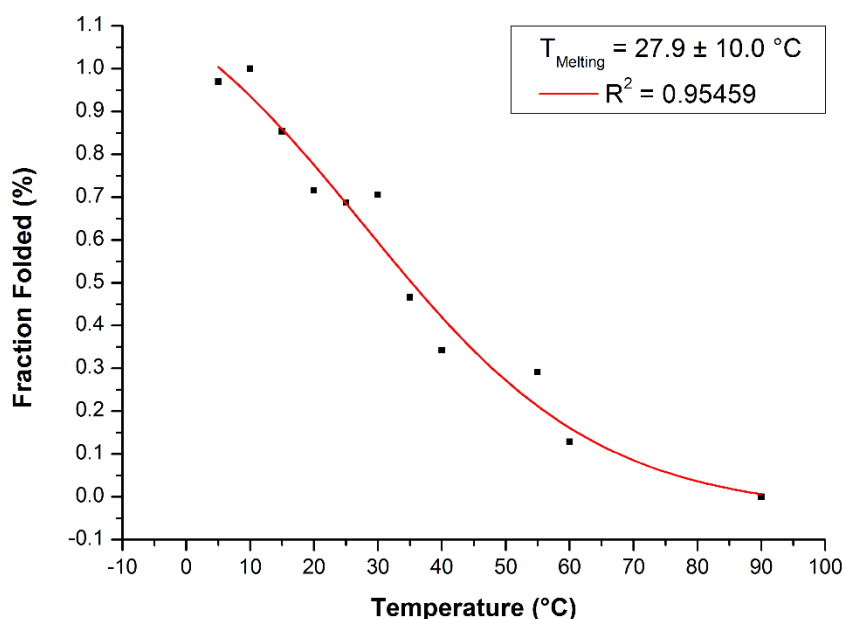


Figura 26. Curva de desnaturação térmica da LmImp α com variação de temperatura dos 5 °C à 90 °C.

Os resultados obtidos com a LmImp α são significativamente distintos ao observado com a mesma proteína de outros organismos (NcImp α , MmImp α e HsImp α). Contudo, os ensaios de DLS retornaram informações condizentes para organizações quaternárias de uma proteína de 55 kDa e permitiram visualizar espectros de CD esperados para a concentração e tamanho molecular da amostra, porém denota-se que a proteína apresenta elevado grau de desarranjo das hélices- α , mesmo aos 5 °C. Provavelmente, este grau de desarranjo das hélices- α permitiram a oligomerização da proteína em temperaturas mais elevadas.

4.8 Espectroscopia de Fluorescência

Os resultados da fluorescência mostraram a emissão de fluoróforos das proteínas MmImp α , HsImp α e LmImp α através da excitação dos resíduos de triptofano presentes nas mesmas. Os triptofanos ficam alocados nas porções de interação da Imp α com o peptídeo sendo assim, a emissão significa que seu sítio de interação está livre e disposto de forma aberta ao solúvel permitindo com que o NLS possa se conectar com a Imp α .

Tanto a MmImp α e a HsImp α possuem sete triptofanos enquanto que a LmImp α possui somente seis, o que justifica sua curva apresentar menor absorvância do que as outras duas e pelo fato da HsImp α estar em sua forma dimérica, alguns de seus triptofanos estão ocultos fazendo com

que sua emissão seja um pouco menor. Outro ponto é o deslocamento da curva da LmImp α para a esquerda podendo indicar que seu enovelamento não esteja igual ao das outras duas Imp α devido ao processo de *refolding* realizado para sua obtenção da amostra (Fig. 27).

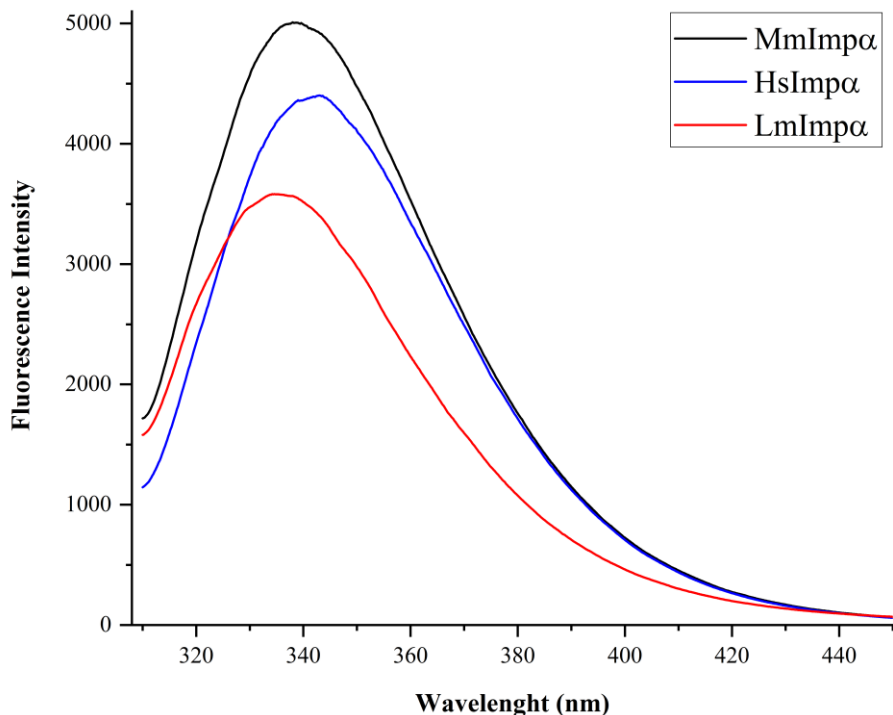


Figura 27. Análise comparativa das estruturas secundárias das proteínas recombinantes MmImp α (Preto), HsImp α (Azul) e LmImp α (Vermelho).

Levando em conta os dados obtidos no DLS, que mostrava à 5 °C a LmImp α estava em monômero, à 10 °C ela está numa transição entre monômero e dímero e em 20 °C e 25 °C ela fica em um estado oligomérico, realizamos um teste com a LmImp α variando a temperatura da mesma forma que nos demais experimentos (Fig. 28) e para finalidades bioestatísticas, foi realizado o teste T para garantir que os dados são ou não significantes.

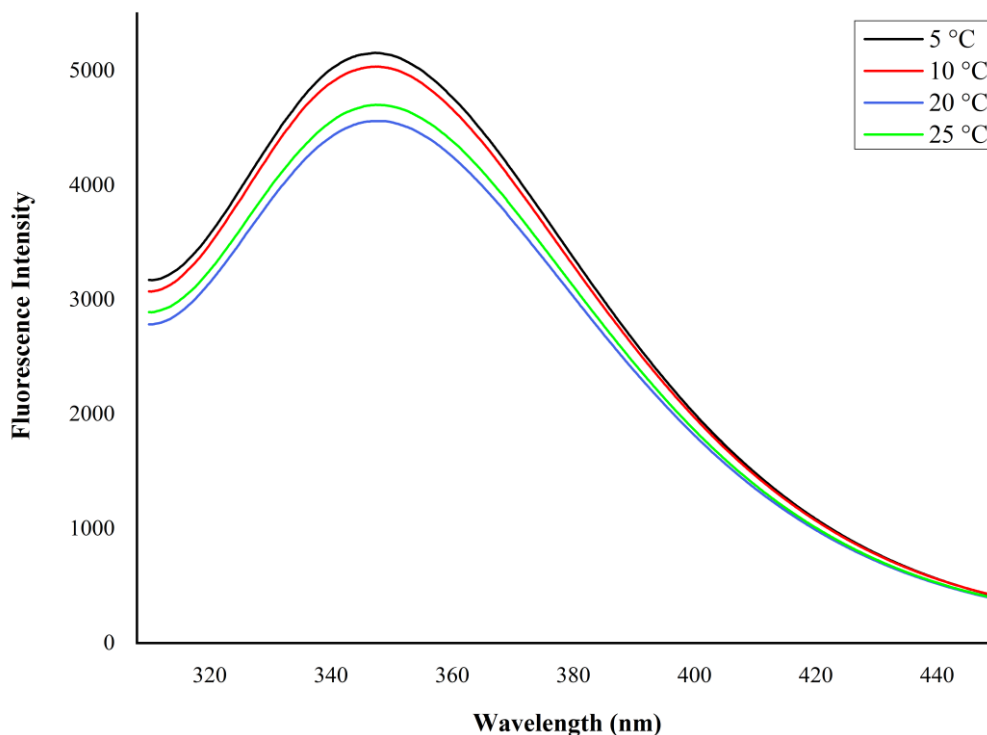


Figura 28. Espectro da fluorescência da LmImp α variando sua temperatura entre 5 °C e 25 °C.

O gráfico nos mostra que, à 5 °C a proteína está em sua forma monomérica, expondo os seus triptofanos, à 10 °C mesmo estando na transição entre monômero e dímero ainda há exposição dos triptofanos e 20 °C e 25 °C como oligômero. Houve apenas uma inversão nos dados de 20 °C e 25 °C, com *p-value* não significativamente estatístico, porém acreditamos que seja devido ao fato da proteína estar oligomerizada fazendo com que seus triptofanos não estejam totalmente expostos dependendo da conformação.

Para verificar a afinidade da LmImp α com a SV40 NLS e a Rbp38 NLS foram realizados testes da proteína em um mesmo meio que os peptídeos variando as temperaturas para verificar se sua conformação de fato alterava sua afinidade. Os resultados mostrados a seguir foram os resultados obtidos à 10 °C e 20 °C.

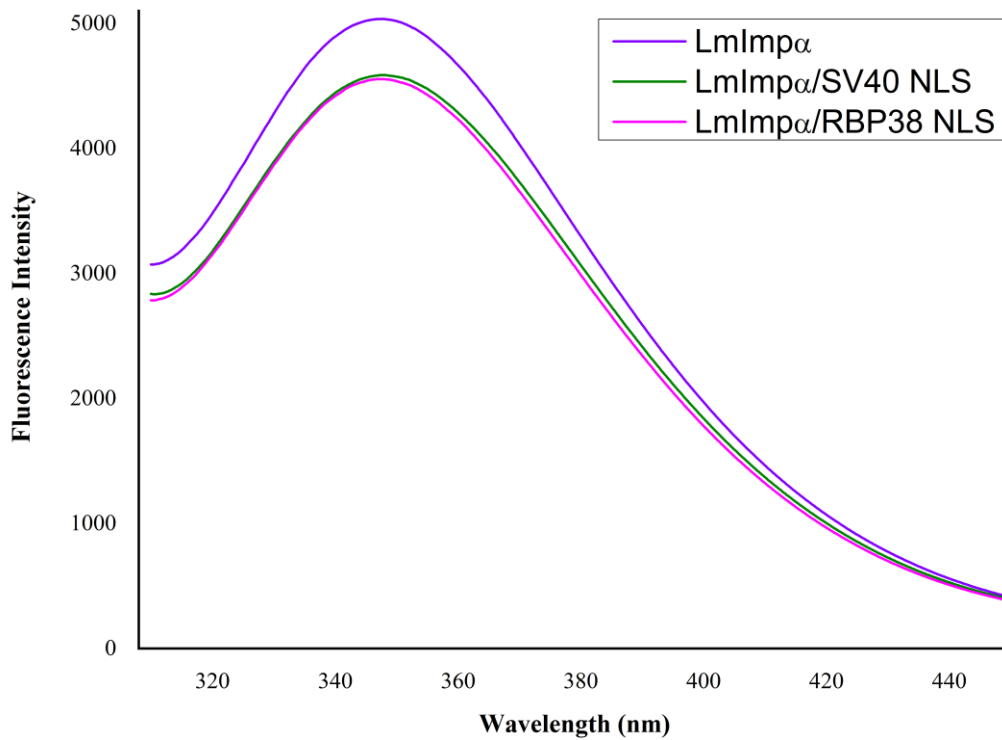


Figura 29. Espectro da fluorescência da LmImp α isolada (roxo), juntamente com a SV40 NLS (verde) e Rbp38 NLS (rosa) à 10 °C. Onde pode-se verificar que a LmImp α pode ter afinidade com ambos peptídeos.

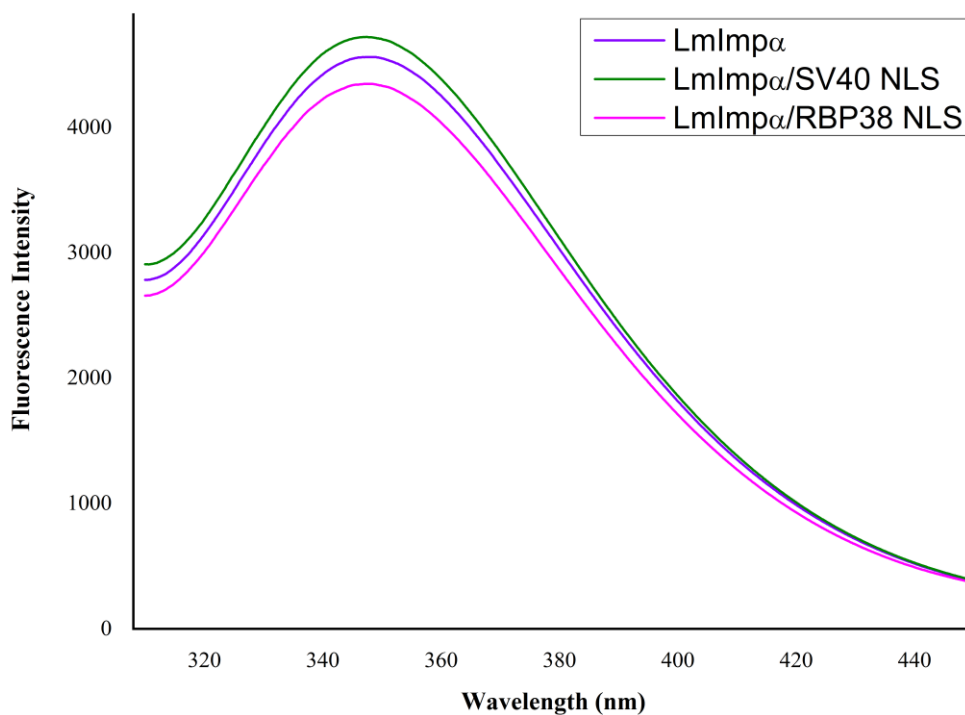


Figura 30. Espectro da fluorescência da LmImp α isolada (roxo), juntamente com a SV40 NLS (verde) e Rbp38 NLS (rosa) à 20 °C.

Ao processar os dados e realizar o teste T das curvas apresentadas nos espectros obtivemos os *p-value* à 10 °C mostraram diferença estatística e à 20 °C seu valor não se mostrou significativamente estatístico, sendo assim, a LmImp α não aparenta possuir afinidade com nenhum dos peptídeos à 20 °C provavelmente devido a sua oligomerização, porém ela aparenta possuir certa afinidade à 10 °C com ambos os peptídeos.

4.9 Calorimetria por Titulação Isotérmica

Os experimentos de ITC foram realizados na proporção proteína: peptídeo de 30:300 para verificar a afinidade que a proteína tem os com peptídeos, porém seus resultados mostraram-se inconclusivos, onde não pudemos processar os dados uma vez que os mesmos não formaram um padrão de afinidade. Os resultados mostrados a seguir são dos ITCs realizados à 10 °C e 20 °C.

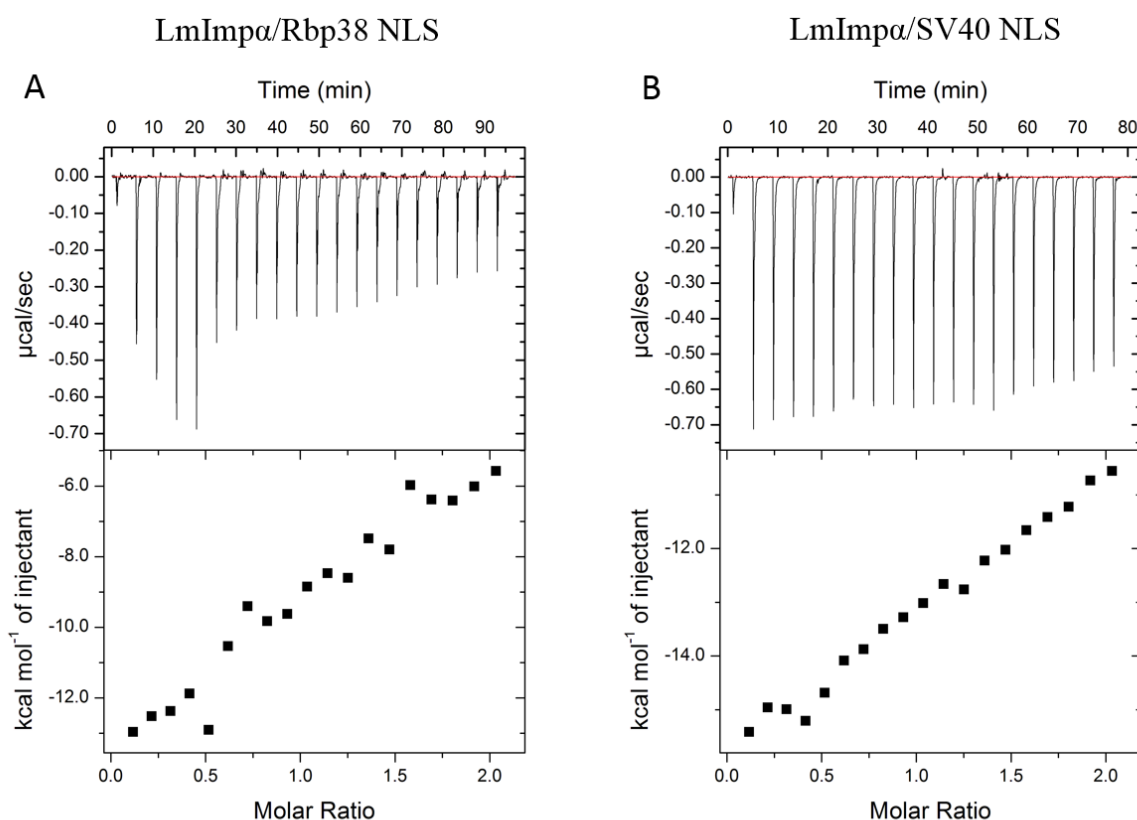


Figura 31. Termograma e Isotherma obtidos pela análise calorimétrica dos complexos LmImp α /Rbp38 (A) e LmImp α /SV40 NLS (B) à 10 °C.

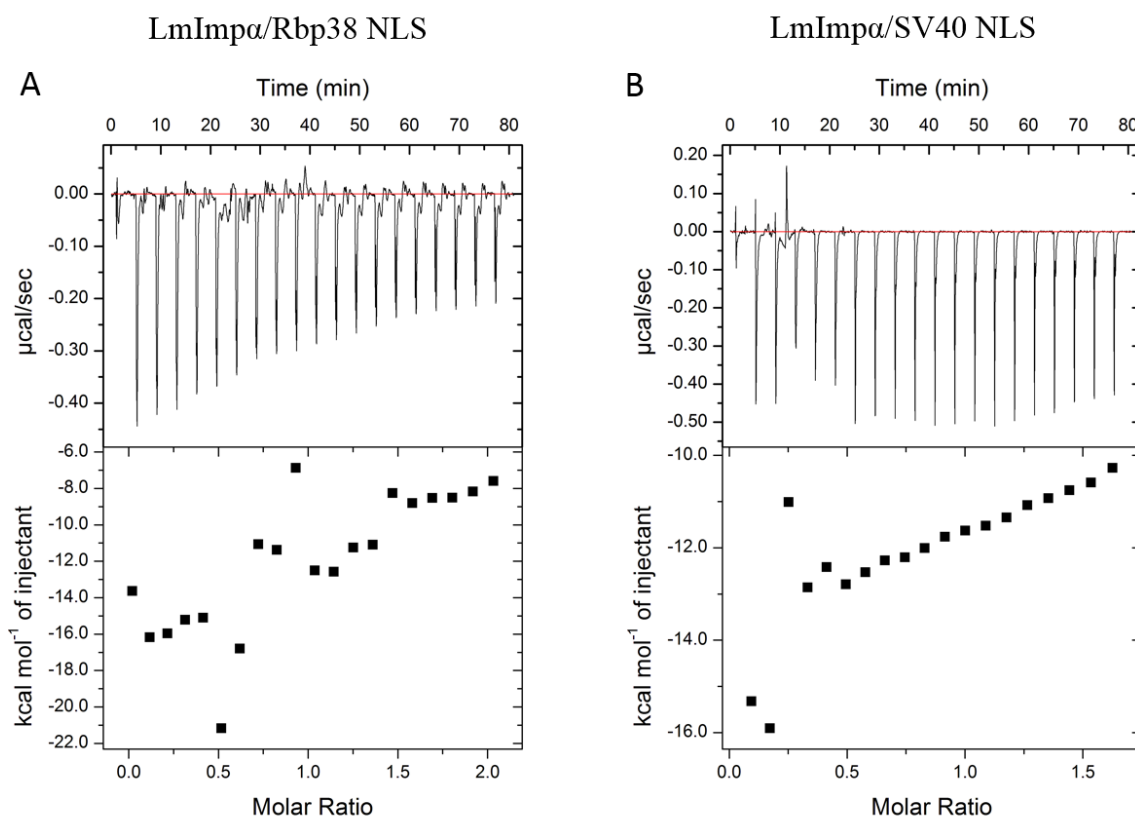


Figura 32. Termograma e Isotherma obtidos pela análise calorimétrica dos complexos LmImp α /Rbp38 (A) e LmImp α /SV40 NLS (B) à 20 °C.

4.10 Modelagem, Docking e Dinâmica Molecular

4.10.1. Modelo teórico da LmImp α

O modelo teórico da LmImp α ao se comparar com a estrutura utilizada de base, apresentou 98,3 % dos resíduos de aminoácidos e 97,2 % dos rotâmetros em regiões favoráveis no gráfico de Ramachandran (Fig.35). O modelo mostrou estabilidade numa simulação de 100 ns que pode ser observado pelo RMSD e pelo Raio de Giro (total e ao redor dos eixos) (Fig.34). Além disso, um estudo de *cluster* revelou que não há mudanças significativas entre as quatro principais estruturas que representam os *clusters* mais populosos da simulação (Fig. 33). O estudo de *clusters* se baseia em separar os modelos gerados em grupos similares utilizando um *cutoff* do valor do RMSD e a estrutura central é uma mediana do *cluster* inteiro e para validar o modelo foram utilizados os parâmetros do RMSD, que indica o quanto a estrutura se modifica da sua posição inicial, o Rg que verifica a geometria e o RMSF que verifica a variação da posição dos átomos durante a simulação.

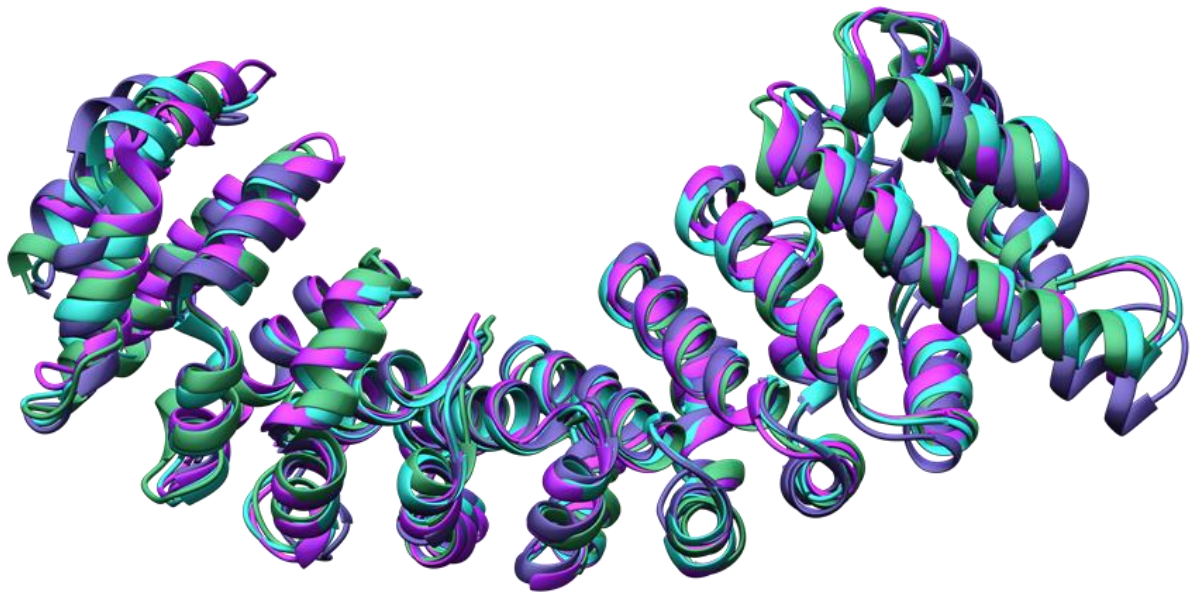


Figura 33. Sobreposição das quatro principais estruturas formadas a partir dos *clusters* mais populosos do modelo teórico da LmImp α .

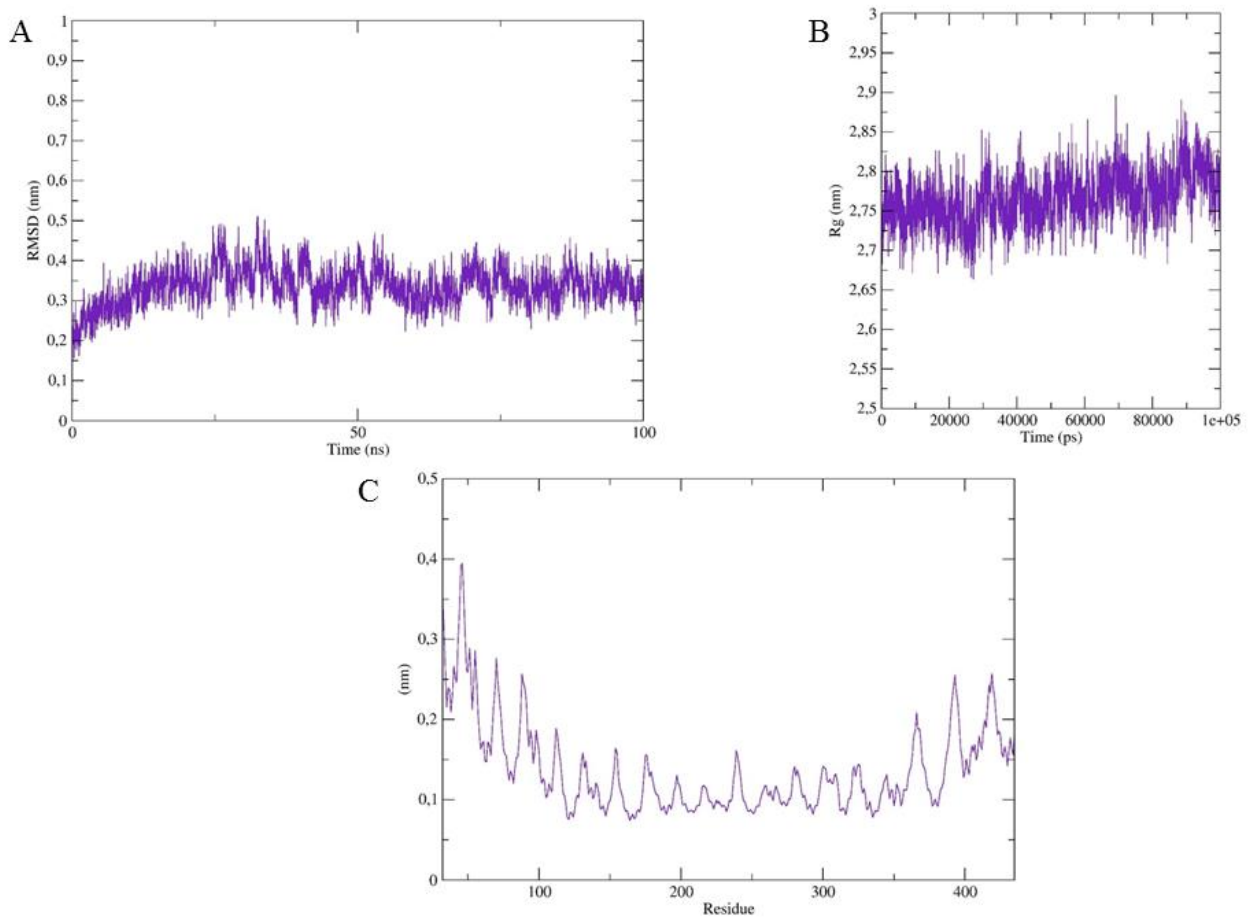


Figura 34. Dados do RMSD (A), Raio de Giro (B) e RMSF (C) do modelo teórico da LmImp α durante os 100 ns de simulação.

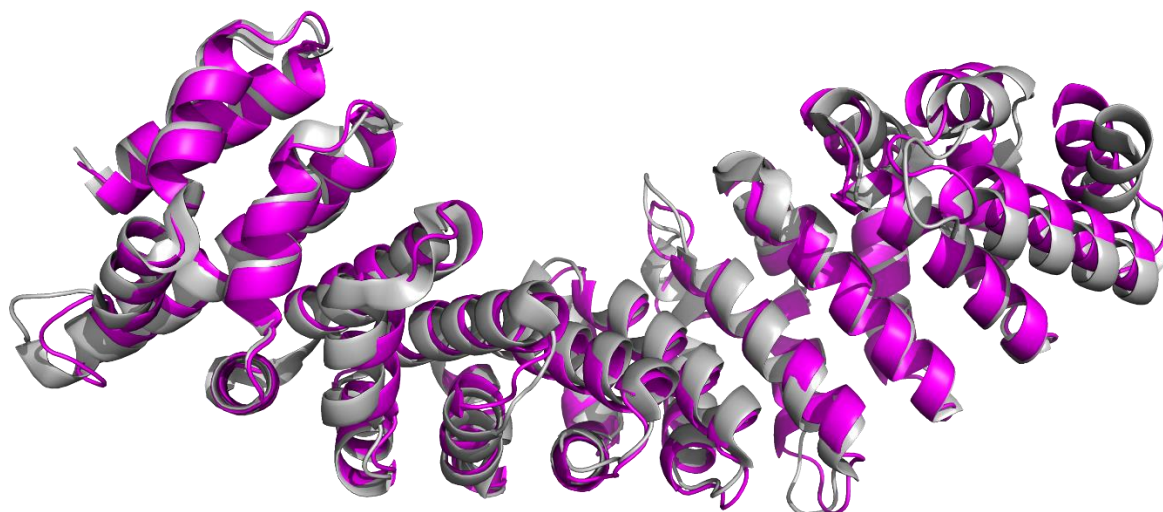


Figura 35. Sobreposição do molde de OsImp α - 4B8J (cinza) e o modelo teórico gerado por modelagem comparativa para a LmImp α (roxo).

4.10.2. Docking da LmImp α com a Rbp38 NLS

Os estudos de *docking* molecular entre a LmImp α e a Rbp38 NLS foram realizados com a estrutura central do cluster mais populoso da simulação anterior com a LmImp α . Foram gerados 10 complexos, dentre os quais, o modelo 9 além de apresentar o Rbp38 na configuração antiparalela, também atingiu uma conformação energeticamente favorável com um $\Delta G = -11$ kcal/mol e um K_d estimado de 18 nM à 37 °C (Fig. 36).

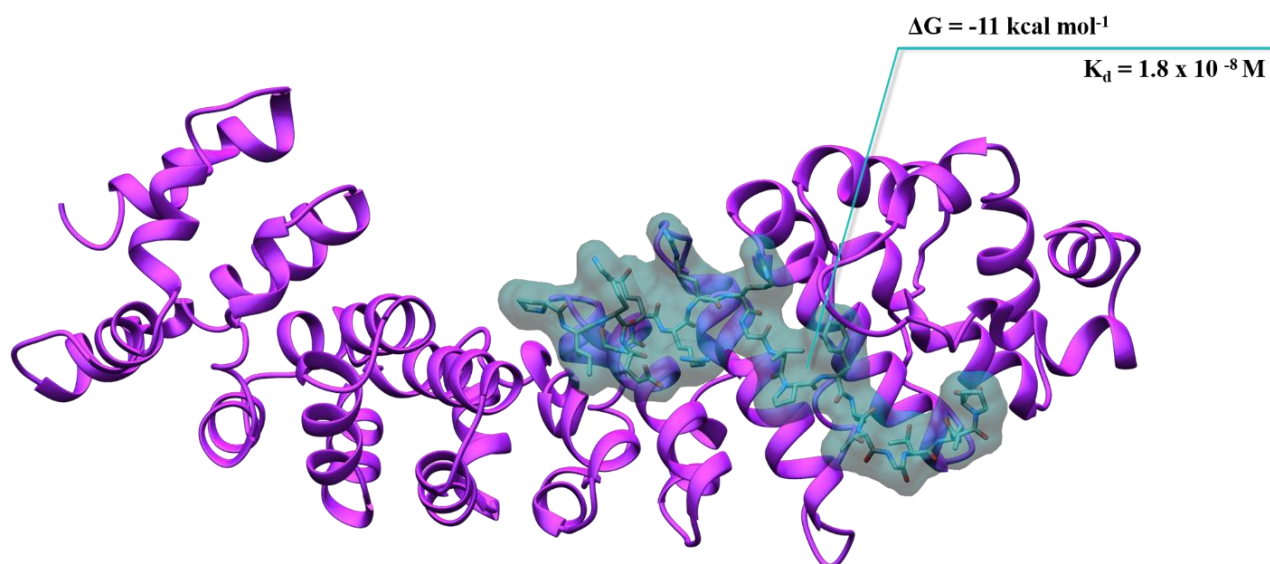


Figura 36. Complexo LmImp α (roxo) / Rbp38 NLS (verde) com ΔG e K_d da interação.

A simulação de dinâmica molecular do complexo gerado nos estudos de *docking* molecular demonstrou que o complexo só assume uma conformação mais estável após cerca de 60 ns de simulação. A Rbp38 NLS sofre as alterações conformacionais mais drásticas próximas ao término da simulação, demonstrando que o peptídeo ainda não atingiu a estabilidade (Fig. 38).

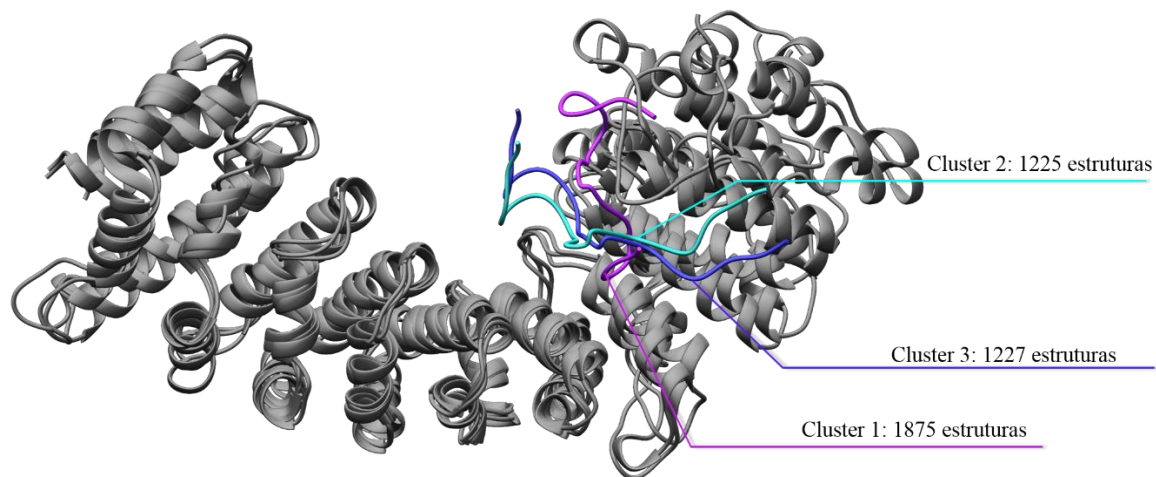


Figura 37. Sobreposição com as estruturas centrais correspondentes aos três *clusters* mais populosos na simulação de dinâmica molecular com o complexo.

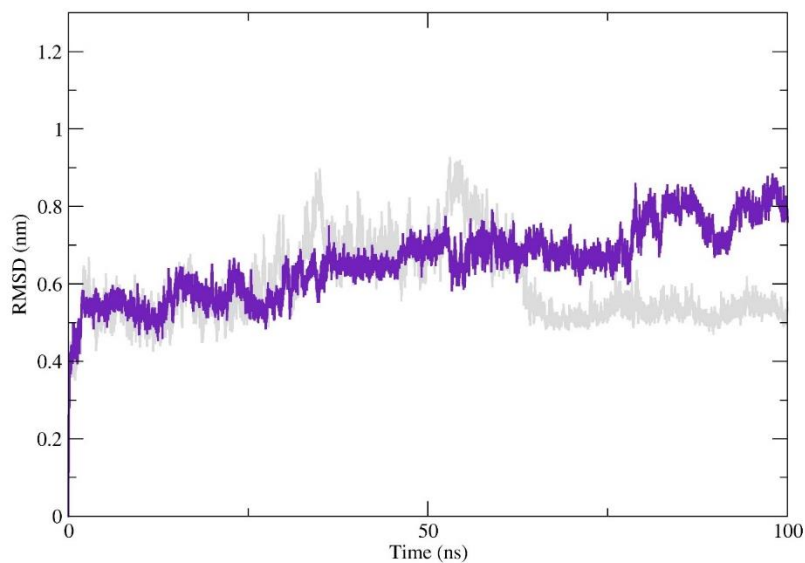


Figura 38. Gráfico de RMSD demonstrando o comportamento individual da LmImpα (cinza) e Rbp38 NLS (roxo) no decorrer dos 100 ns, pode-se verificar que o conjunto não alcançou a estabilidade.

4.10.3. Modelo teórico da LmImpα em dímero.

O dímero teórico gerado para a LmImpα apresentou poucas variações de RMSD durante 10 ns de simulação de dinâmica molecular, indicando que a estrutura tem uma estabilidade razoável. Análises do raio de giro durante a simulação revelaram que, na sua forma dimérica, a LmImpα atinge um máximo de 3,8 nm. A interface de interação do dímero apresentou maior

afinidade que o molde utilizado para construção do modelo dimérico, com um K_d estimado em três ordens de magnitude menor quando comparado com o molde da Impa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScImpa – 1BK5).

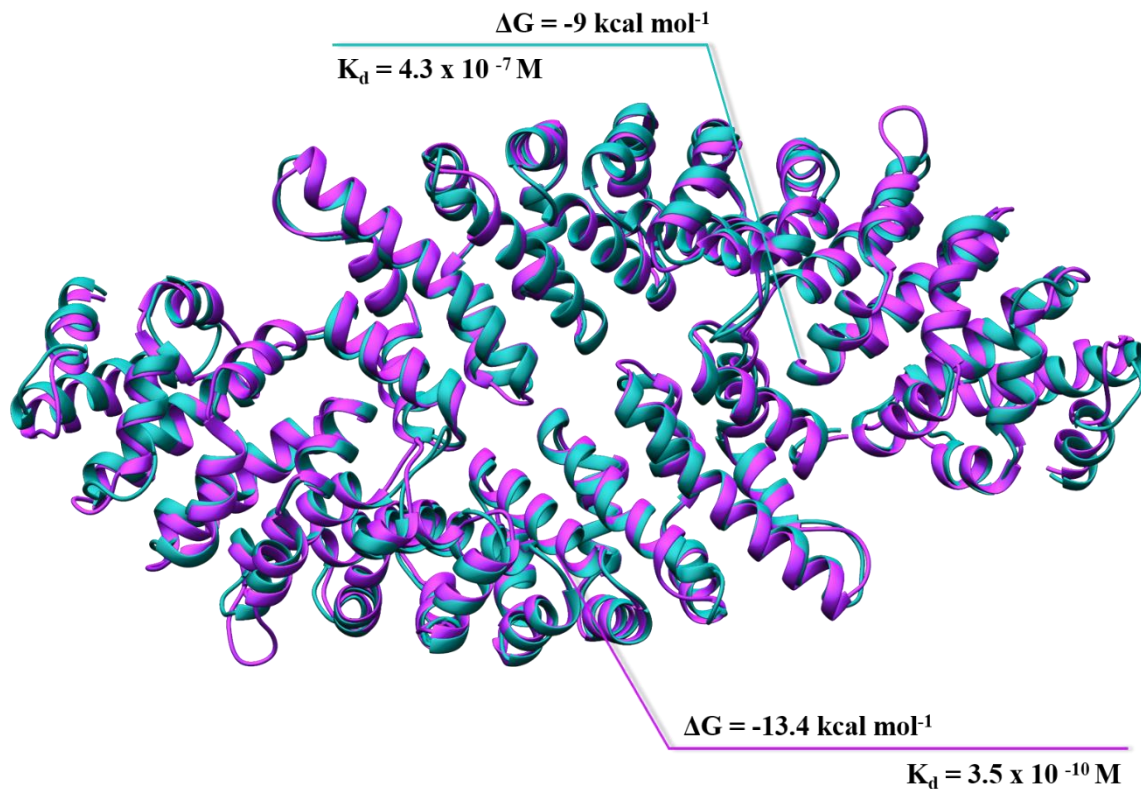


Figura 39. Sobreposição entre dímeros ScImpa- 1BK5 (ciano) e LmImpa (roxo). Comparativo entre afinidades para cada interface de interação de acordo com valores de ΔG e K_d destacados com linhas em cores correspondentes a cada dímero.

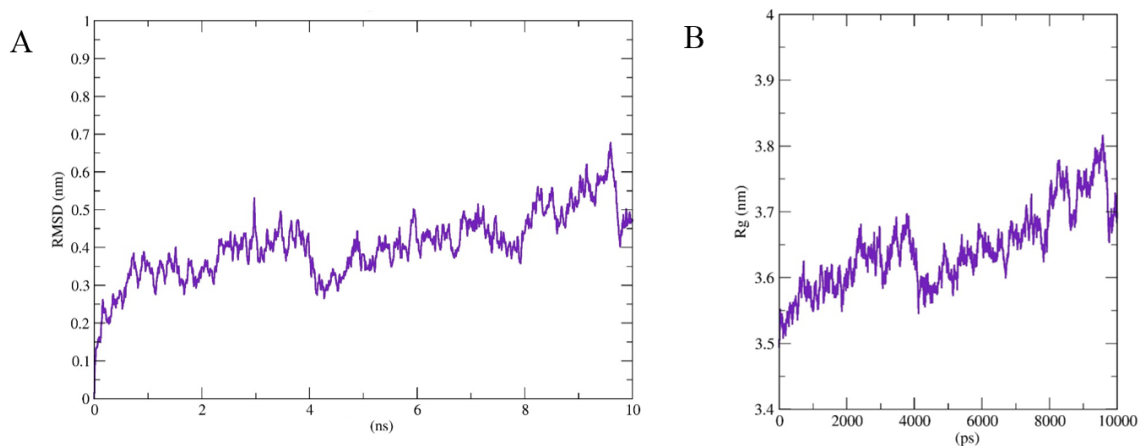


Figura 40. Gráficos de RMSD (A) e raio de giro (B) para o dímero teórico de LmImpa durante 10 ns de simulação de dinâmica molecular.

4.11. Comparação dos dados biofísicos e estruturais da LmImpα com as outras Impα.

Para efeito de comparação foi realizado uma busca no banco de dados PDB onde foram analisadas cinco estruturas cristalográficas de Impα de organismos distintos: *Mus musculus* (MmImpα), *Homo sapiens* (HsImpα), *Neurospora crassa* (NcImpα), *Saccharomyces cerevisiae* (ScImpα) e *Oryza sativa* (OsImpα). Foram analisados os pontos isoeletrônicos (PI), massa molecular (MW) e a quantidade de triptofano (N° Trip) bem como as suas localizações. Estes dados foram obtidos a fim de visualizar as semelhanças e diferenças entre as Impα já elucidadas com a LmImpα.

Tabela 10. Tabela comparativa dos PIs, massa molecular (kDa) e quantidade de triptofano das Impα de *M. musculus*, *H. sapiens*, *N. crassa*, *L. major*, *S. cerevisiae* e *O. sativa*, respectivamente.

	Importina-α					
	MmImpα	HsImpα	NcImpα	LmImpα	ScImpα	OsImpα
PDB	1IAL	4B18	5VQI		1BK5	4B8J
PI	4,96	4,93	5,07	4,61	4,87	5,1
MW (kDa)	49,84	49,66	50,94	50,37	46,67	49,60
N° Trip	7	7	7	6	7	7

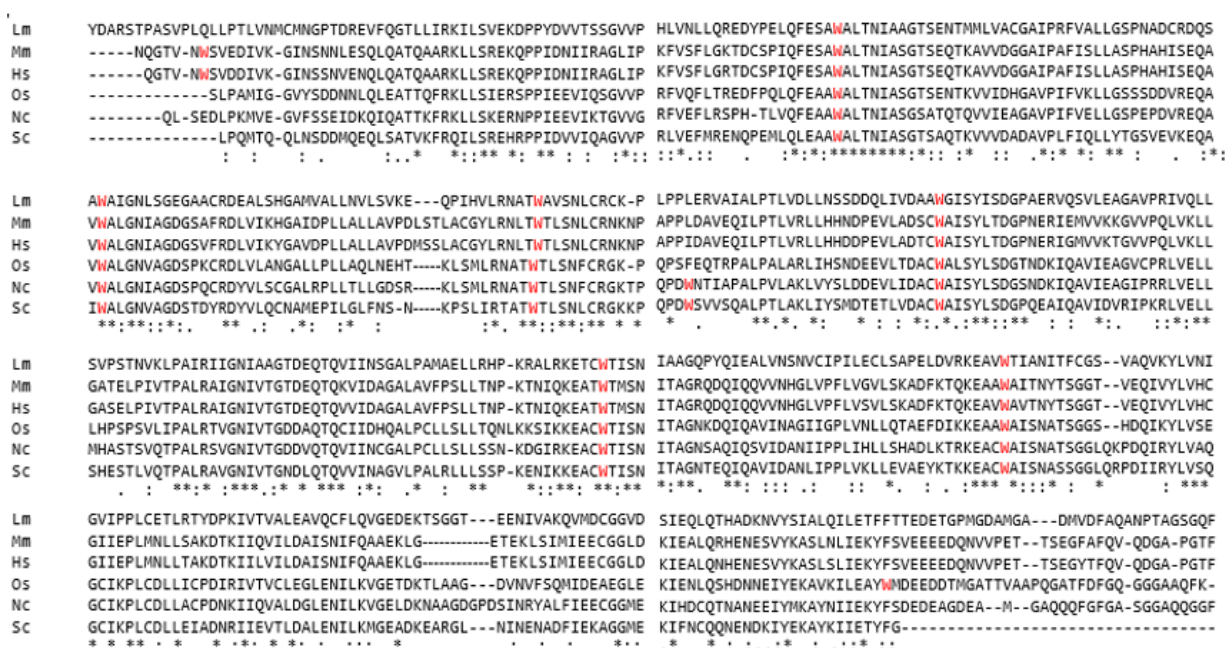


Figura 41. Sequência das Impα alinhadas. Em vermelho estão destacados os triptofanos de cada sequência.

Além de verificar esses dados, para gerar o modelo teórico foi feito um comparativo entre as Impα já elucidadas para verificar a similaridade da LmImpα e ela chega a ter cerca de 40% de identidade com as outras, mostrando que, ela possui algumas diferenças que podem estar refletindo nos resultados observados em todo o processo de obtenção da LmImpα.

Tabela 11. Identidade das Impα com a LmImpα

Espécie	Identidade
<i>Homo sapiens</i>	41.39 %
<i>Mus musculus</i>	43.33 %
<i>Neurospora crassa</i>	43,82 %
<i>Oryza sativa</i>	43,97 %
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	41,33 %

5. DISCUSSÃO

5.1. LmImp α recombinante fica na porção insolúvel da lise celular

Após os testes com o mesmo protocolo ao das outras Imp α , verificamos que a LmImp α permanece na porção insolúvel do lisado, sendo necessário então tentativas alternativas para retirá-la do insolúvel. Para resolver isso, foram realizados dois testes e desses dois, o experimento de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando ureia se mostrou o mais eficaz, que tem como base desenovelar a proteína e após o processo realizar o processo de *refolding* com uma série de diálises escalonadas para que a ureia possa ser retirada de forma gradual, auxiliando no processo enovelamento da LmImp α .

Seguindo esse passo, a cromatografia realizada volta a ser a mesma que o protocolo da HsImp α , mudando apenas o HEPES pH 7,0 para o Tris-HCl pH 8,0, na mesma concentração uma vez que o rendimento obtido após a cromatografia de afinidade a níquel se mostrou levemente melhor do que quando foi utilizado o HEPES. Em seguida realizou-se o processo de concentração onde a amostra não se mostrou favorável a centrifugação igual as outras Imp α sendo necessário testar um outro método onde primeiramente a amostra foi filtrada uma vez com um filtro de 30 kDa e agitação mínima. Então a amostra foi colocada em uma membrana semipermeável e, por osmose reversa, ela foi concentrada de forma gradual utilizando açúcar.

5.2. LmImp α varia sua forma conforme a variação da temperatura afetando sua ligação com a Rbp38 NLS

Analisando os experimentos de DLS pudemos verificar que a proteína varia bastante sua forma de monômero à 5 °C e oligômero em temperaturas superiores. Esse comportamento foi anteriormente verificado por Conti e colaboradores (CONTI et al., 1998; CONTI; KURIYAN, 2000) que mostraram que a ScImp α truncada se dimeriza ligando a porção C-terminal de uma com a porção N-terminal de outra proteína, podemos inferir que provavelmente essa dimerização está afetando o potencial de ligação da LmImp α com os peptídeos, por isso os dados de ITC não foram possíveis de serem processados e, como a dimerização ocorre na porção dos sítios de interação, eles fazem com que os triptofanos estejam menos ou mais expostos dependendo da sua forma de ligação.

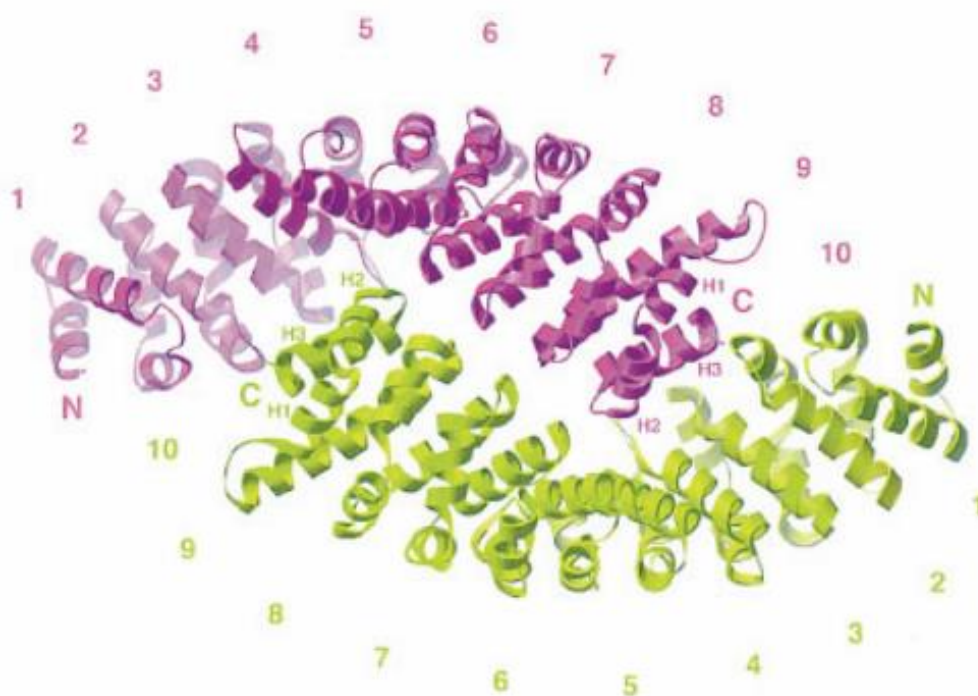


Figura 42. Dímero do cristal de ScImp α (PDB: 1BK5) onde as ScImp α (verde e magenta) se ligam na porção N-terminal de um com a porção C-terminal do outro inibindo parcialmente os sítios de interação (CONTI et al., 1998).

No dímero da ScImp α elas se ligam de uma forma que cobrem cerca de 13% da proteína e também cobrem resíduos fundamentais para a ligação dos peptídeos no sítio principal como a arginina 321 e a tirosina 283 que por sua vez impedem que o par asparagina-triptofano se ligue ao NLS. Para resolver isso, o grupo realizou uma mutação na sequência da ScImp α em que eles trocaram a tirosina 397 para um ácido aspártico (CONTI; KURIYAN, 2000). Com essa mutação o grupo conseguiu cristalizar a ScImp α com a SV40 NLS de forma monomérica.

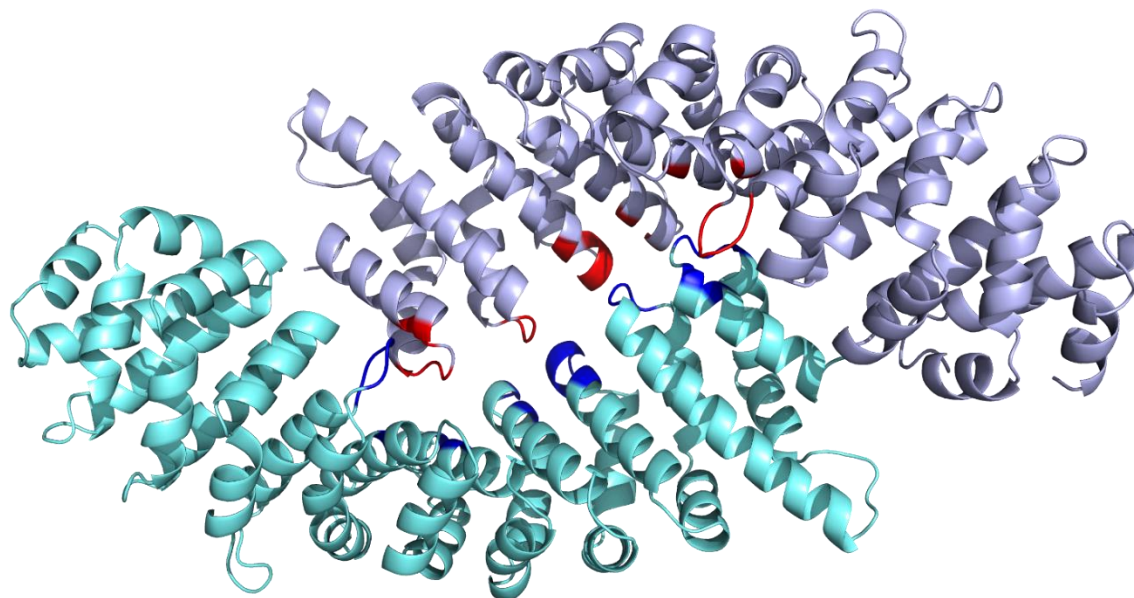


Figura 43. Figura dos principais pontos de interação do dímero da LmImp α (vermelho e azul).

Ao se comparar essa região mutada da estrutura cristalográfica da ScImp α (PDBs: 1BK5 e 1EE5) com a LmImp α podemos verificar alguns pontos, dentre eles que, a mutação tirosina (aromática, carga neutra, polar) para um ácido aspártico (ácido, carga negativa, polar) houve um carregamento negativo que auxiliou na não formação do dímero. Por sua vez a LmImp α , nesta mesma região da mutação, apresenta uma leucina que é um aminoácido alifático e apolar. Levando em consideração isso, inferimos que pela leucina ser hidrofóbica, ela pode estar auxiliando na oligomerização da proteína.

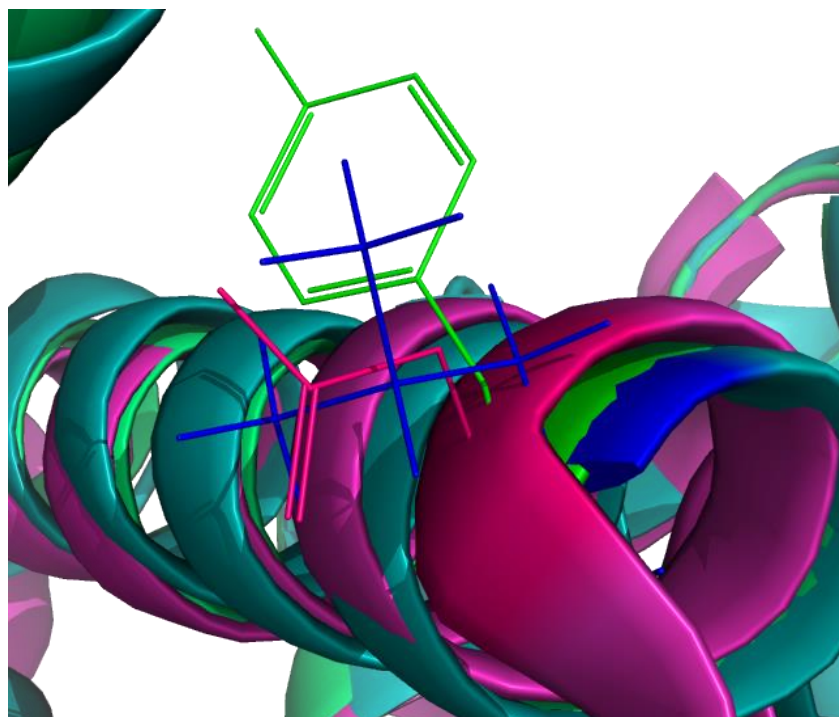


Figura 44. Região da mutação da ScImp α , comparação a ScImp α mutada (rosa) e não mutada (verde) e a LmImp α (azul), onde em verde é a tirosina, resíduo não mutado da ScImp α , em rosa é o ácido aspártico, resíduo mutado da ScImp α e em azul temos a leucina, resíduo da LmImp α .

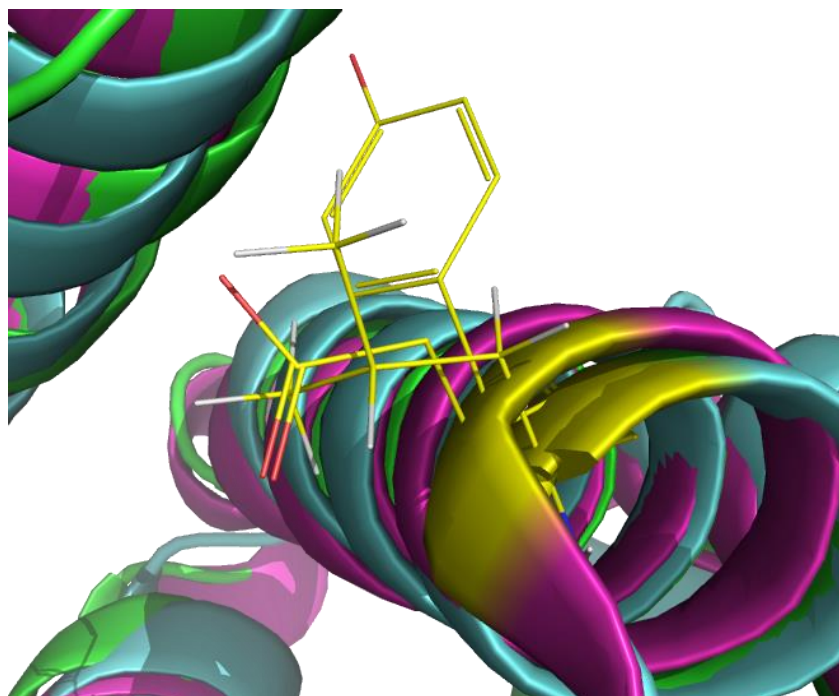


Figura 45. Região da mutação da ScImp α com o código de cores por resíduo onde em amarelo são as cadeias carbônicas, em vermelho são os oxigênios e em branco os hidrogênios. A disposição dos resíduos é a mesma da imagem anterior.

Observando os pontos de interações em comuns do complexo LmImp α /Rbp38 NLS com a forma dimérica da proteína, podemos reparar alguns pontos essenciais para a ligação do peptídeo no sítio de interação da LmImp α . Tais como os aminoácidos triptofano 276, arginina 242 e 318 e leucina 314. Ao comparar esses aminoácidos com o dímero e a proteína mutada e não mutada da ScImp α (CONTI et al., 1998; CONTI; KURIYAN, 2000), a mesma arginina está presente na ligação dos dímeros bem como alguns outros aminoácidos e a presença do triptofano 276 na ligação do dímero da LmImp α podem estar impedindo que o mesmo par asparagina- triptofano se ligue ao NLS. O complexo possui um Kd= $1,8 \times 10^{-8}$ M enquanto que a proteína dimérica possui um Kd= $3,5 \times 10^{-10}$ M mostrando que, provavelmente, o peptídeo não consegue desfazer a ligação entre duas LmImp α , levantando a hipótese que quando a proteína está em sua forma monomérica (5 °C) ela ligue com o peptídeo, como visto com os dados de espectroscopia de fluorescência.

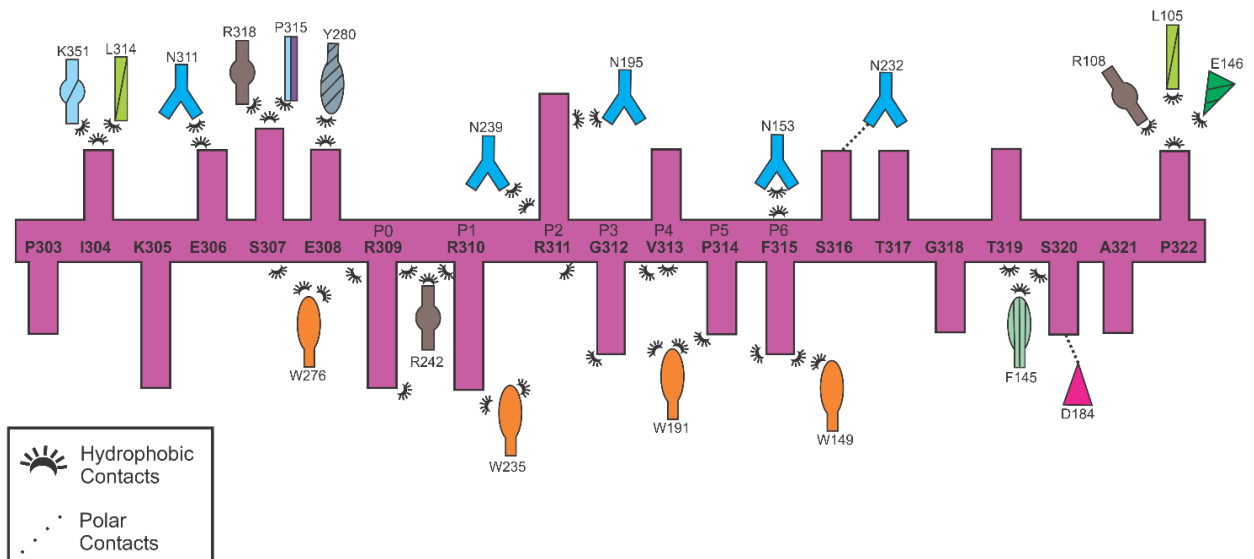


Figura 46. Esquema simplificado da interação do complexo LmImp α / Rbp38 NLS

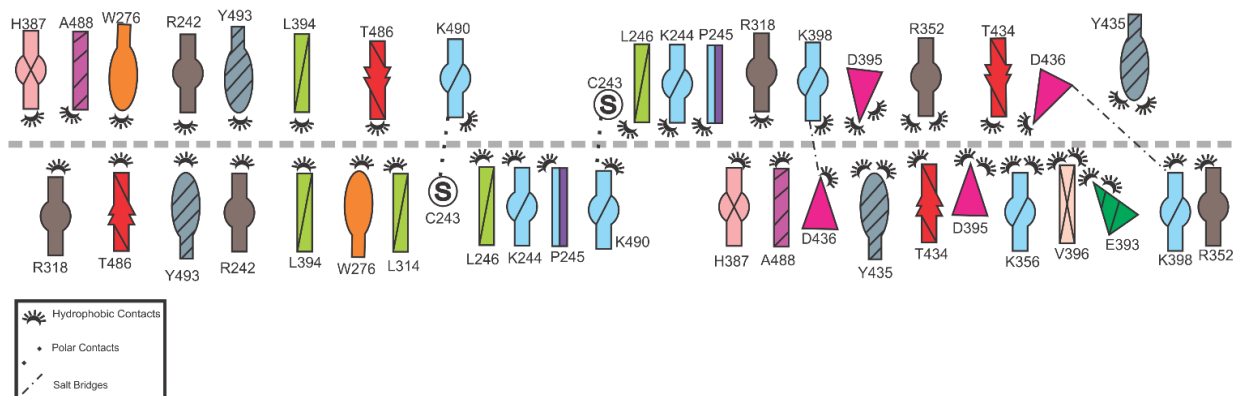


Figura 47. Esquema das principais interações entre os dímeros de LmImp α .

5.3. LmImp α possui características distintas das outras Imp α

Apesar da alta similaridade dentro da família das Importinas, a comparação da LmImp α com outras Imp α , revela características específicas da LmImp α . A primeira diferença é a ausência de um triptofano comparado com todas as outras Imp α . Essa ausência pode afetar no poder de ligação da Imp α com NLSs, pois os triptofanos são característicos nos sítios de ligações das Imp α e são resíduos responsáveis por boa parte das interações Imp α -NLS. Além disso, outro ponto é o PI que enquanto os outros PIs variam mais próximos de 5,0, o da LmImp α é 4,61 o que pode ser um dos fatores que faz com que no processo de expressão ela fique na porção insolúvel e o fato que ela fique mais estável em meios mais básicos do que as demais durante a cromatografia. Outro ponto é ao ver os dados de T_{Melting} obtidos pelo experimento de CD, podemos verificar que a LmImp α não suporta altas variações de temperaturas e para compensar ela se oligomeriza mais facilmente do que as outras que possuem o T_{Melting} mais elevado.

5.4. Árvore Filogenética das Imp α

Verificando a árvore filogenética das Imp α pode-se verificar que a LmImp α de fato é mais similar à OsImp α e a de ScImp α do que dos animais (Fig. 48). O que justifica tanto a sua identidade com essas Imp α quanto seu comportamento de dimerização e o fato da Rbp38 se ligar à NcImp α e não se ligar à MmImp α .

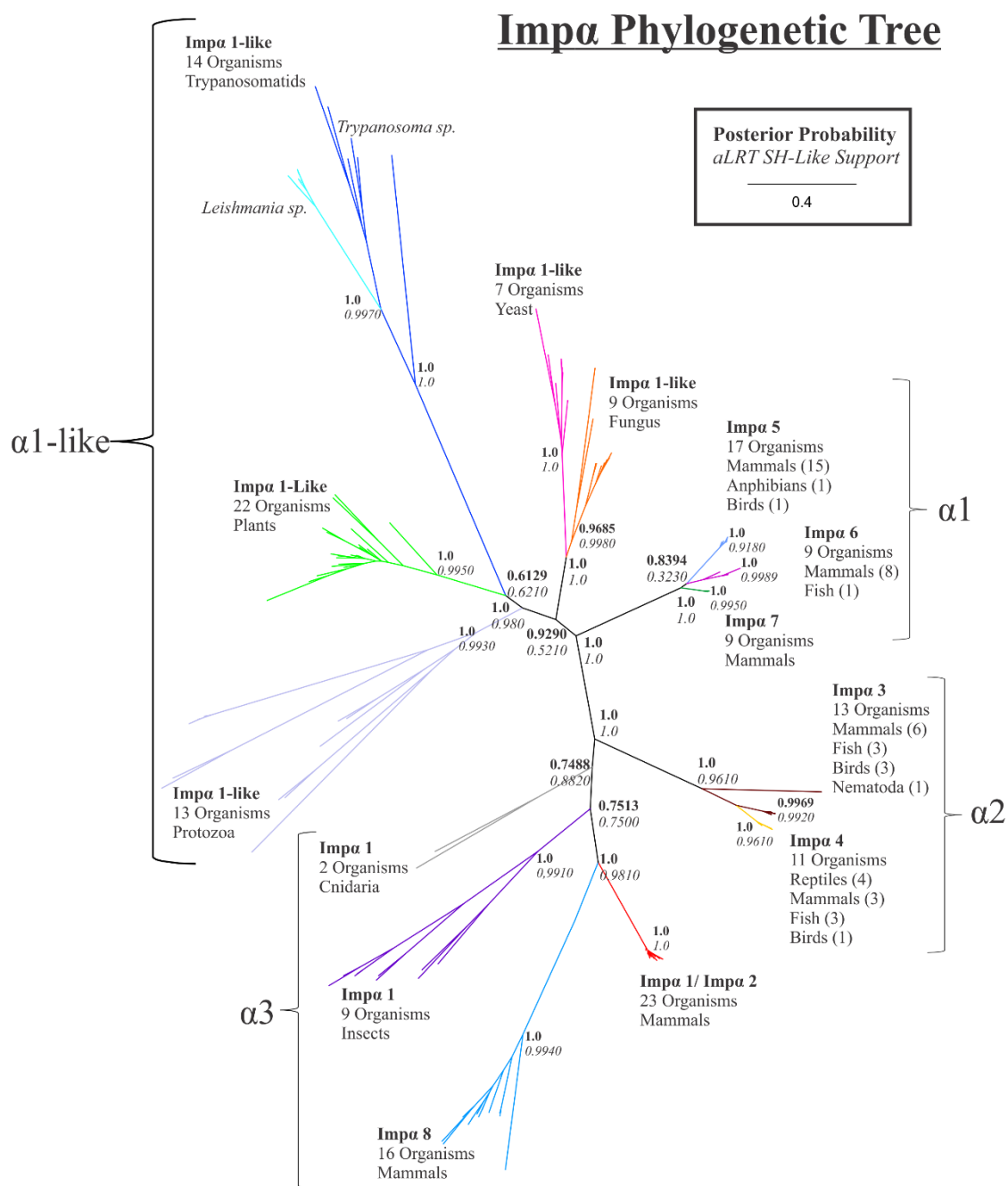


Figura 48. Árvore Filogenética das Impα. Onde estão mostrados os valores de probabilidade posterior (negrito) e aLRT SH Like support (Itálico) dos principais nós. Também estão mostrados a quantidade dos táxons de cada clado e as famílias das Impα.

6. CONCLUSÃO

O processo de obtenção da proteína recombinante LmImp α , apesar de possuir uma transformação e indução semelhante as outras Imp α estudadas em nosso laboratório, fica retida em maior concentração na fração insolúvel, após o processo de lise celular. Deste modo, uma etapa é necessária para obter a proteína viável para os testes biofísicos. Dentre as tentativas de remoção da LmImp α da parte insolúvel, o processo de isolamento de corpúsculo de inclusão utilizando ureia, foi o mais efetivo onde após o desenovelamento da proteína, por uma série de diálises que ocorreram de forma escalonada a proteína voltou a se enovelar e, assim, foi passado para o próximo passo que é a cromatografia de afinidade a níquel a fim de aumentar seu grau de pureza para a realização dos testes biofísicos. Seguido desse passo, durante a concentração utilizando o método de concentração por centrifugação a LmImp α não se mantinha viável então foi utilizado o método de concentração por osmose reversa utilizando uma membrana semipermeável e açúcar cristal.

Com os experimentos de CD e DLS foi possível verificar que a LmImp α se comporta de forma distintas das outras duas Imp α , ficando em forma monomérica somente a 5 °C enquanto que as outras se mantem de forma monomérica em temperaturas superiores e seu T_{Melting} é menor do que as outras mostrando que ela não suporta muitas mudanças de temperatura. Os experimentos de espectroscopia de fluorescência estática foram realizados com a LmImp α , HsImp α e MmImp α , que nos retornou informações sobre a viabilidade das proteínas e sua possível interação com o peptídeo Rbp38 NLS. Os resultados mostraram que as três proteínas têm afinidade com o peptídeo, sustentando a hipótese de que a Rbp38 é uma proteína que é transportada pela Via Clássica de Importação Nuclear pela Imp α .

De maneira a complementar os dados experimentais, modelos teóricos foram criados a fim de verificar o possível comportamento da LmImp α e corroborando ou não com os dados obtidos experimentalmente. Com isso foi possível criar um modelo teórico da LmImp α monomérica e dimérica, bem como com sua interação com a Rbp38 NLS. Com estes dados foi possível verificar que a ligação da proteína na forma dimérica é mais intensa comparado com o peptídeo, levantando a hipótese de que a LmImp α consegue se ligar ao peptídeo, porém somente quando ela está em sua forma monomérica.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. [s.l: s.n.].

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Den. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

AMARE, A. R. F.; BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Current Biology**, [s. l.], p. 357–359, 1994.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 539–552, 2006.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 64, 2007.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

BERNARDES, N. E.; FUKUDA, C. A.; DA SILVA, T. D.; DE OLIVEIRA, H. C.; DE BARROS, A. C.; DREYER, T. R.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

BERNARDES, N. E.; TAKEDA, A. A. S.; DREYER, T. R.; CUPERTINO, F. B.; VIRGILIO, S.; PANTE, N.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin- α . **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 474, n. 24, p. 4091–4104, 2017. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20170654>>

BERNARDES, N. E.; TAKEDA, A. A. S.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin- from *Neurospora crassa*. **Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 501–504, 2014.

BIOVIA DS. **Discovery Studio Modeling Environment**. San Diego: Dassault Systèmes. 2017.

BRAY, R. S. Leishmania. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], n. 3, 1974.

BUSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 126, n. 1, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

CONTI, E.; MÜLLER, C. W.; STEWART, M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic

transport. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 237–244, 2006.

CONTI, E.; UY, M.; LEIGHTON, L.; BLOBEL, G.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . **Cell**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 193–204, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

FONTES, M. R. M.; TEH, T.; KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and

bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 297, n. 5, p. 1183–1194, 2000.

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

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

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

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.

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

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

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

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

KAESS, M.; ILA, V.; ROBERTS, R.; DELLAERT, F. The Bayes tree: An algorithmic foundation for probabilistic robot mapping. **Springer Tracts in Advanced Robotics**, [s. l.], v. 68, n. STAR, p. 157–173, 2010.

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

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

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.21.11842>>

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

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

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

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

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

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

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

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

LIU, B.; MOLINA, H.; KALUME, D.; PANDEY, A.; GRIFFITH, J. D.; ENGLUND, P. T. Role of rbp38 in Replication of *Trypanosoma brucei* Kinetoplast DNA. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 5382–5393, 2006.

MASON, D. A.; FLEMING, R. j.; GOLDFARB, D. S. *Drosophila melanogaster* importin α 1 and

$\alpha 3$ can replace importin $\alpha 2$ during spermatogenesis but not oogenesis. **Genetics**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 157–170, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SBICEGO, S.; ALFONZO, J. D.; ESTÉVEZ, A. M.; RUBIO, M. A. T.; KANG, X.; TURCK, C. W.; PERIS, M.; SIMPSON, L. RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 560–568, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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