

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DE
MAMÍFEROS E PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE
LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS).

ANDRÉA COELHO DE BARROS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus 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.

Orientador: Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Dr^a. Agnes Alessandra Sekijima Takeda

**BOTUCATU – SP
2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DE
MAMÍFEROS E PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE
LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS).

ANDRÉA COELHO DE BARROS

MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

AGNES ALESSANDRA SEKIJIMA TAKEDA

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.

Orientador: Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Dr^a. Agnes Alessandra Sekijima Takeda

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SELMA MARIA DE JESUS**

Barros, Andréa Coelho de

Estudos estruturais com a Importina- α de mamíferos e peptídeos de sequências de localização nuclear (NLS) / Andréa Coelho de Barros. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientadora: Agnes Alessandra Sekijima Takeda

Capes: 20901003

1. Biofísica molecular. 2. Bioquímica.

Palavras-chave: Cristalografia de raios-X; FEN1; Importação nuclear; Importina- α ; Ku80; NLS; MLH1; PMS2.

AGRADECIMENTOS

- *Ao meu orientador, o Professor Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes, pelo voto de confiança, paciência, dedicação, experiências e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.*
- *A minha co-orientadora, a Doutora Agnes Alessandra Sekijima Takeda, pela PACIÊNCIA, confiança, dedicação, ensinamentos e, acima de tudo, amizade.*
- *Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, Carlos, Guilherme, Juliana, Marília, Natália, Patrícia e Rafael pela cooperação, companheirismo, troca de conhecimentos, tristezas e, principalmente, muitas alegrias.*
- *Aos colegas do departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, pela troca de conhecimentos.*
- *Aos amigos, sempre presentes em pensamento e coração.*
- *À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou o presente projeto de pesquisa (proc. 09/11510-4).*
- *À minha família:
meus pais, Luíz Antônio de Barros e Leiva Coelho;
meus irmãos, Milton André de Barros e Thiago Renato Coelho de Barros; pelo amor, ensinamentos, confiança, paciência e suporte emocional.*

*Gravitar para a unidade divina, esta é a meta da humanidade.
Para atingi-la três coisas são necessárias: a justiça, o amor e a ciência.*

(Paulo, Apóstolo)

RESUMO

A estabilidade e integridade do material genético são fundamentais para manutenção e continuação da vida. O genoma humano é composto por três bilhões de pares de bases, os quais codificam entre 30.000 – 40.000 genes, e é constantemente atacado por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas e uma infinidade de agentes mutagênicos ambientais que afetam sua integridade. Assim, é evidente que a estabilidade do genoma deve estar sob vigilância contínua. Isso é conseguido através de mecanismos de reparo de DNA, que se desenvolveram para remover ou tolerar lesões e erros no DNA. Dentre os mecanismos de reparo de DNA presentes nos organismos, eles podem ser divididos em: i) reparo por excisão de bases (BER), ii) excisão de nucleotídeos (NER), iii) mal-pareamento de bases (MMR) e iv) reparo de DNA por junção de terminais não homólogos (NHEJ). Para o que esses mecanismos funcionem de maneira adequada, é evidente a importância da interação entre proteínas responsáveis pela função de reparo, bem como é essencial a regulação da importação nuclear para localização correta das proteínas responsáveis pelos mecanismos mencionados. Dentre os mecanismos responsáveis pela regulação da importação nuclear, a via clássica constituída pelo heterodímero Importina- α/β é um dos principais mecanismos de deslocamento. Algumas proteínas de reparo parecem interagir somente com algumas isoformas da Importina- α (Imp α), indicando uma regulação adicional do processo de reparo, porém, pouco se sabe a respeito do reconhecimento das sequências de localização nuclear (NLS) dessas proteínas. Esse trabalho trata especificamente do estudo do complexo estrutural de complexos de Imp α com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA utilizando técnicas de cristalografia. A expressão e purificação da Imp α de *Mus musculus* truncada em sua porção N-terminal foi realizada, bem como a co-cristalização da Imp α com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA, correspondentes as sequências monopartidas das proteínas Ku80, PMS2 e MLH1 e a sequência bipartida da proteína FEN1. Dados de difração de raios-X foram coletados dos cristais obtidos e processados no intervalo de 2,1-2,38 Å de resolução. Com esses resultados, as estruturas contendo NLSs Ku80 e FEN1 foram elucidadas. O peptídeo NLS Ku80, relacionado ao reparo NHEJ, ligou-se à Imp α de maneira similar ao NLS do antígeno T da SV40, no sítio de ligação principal (S_1). Já o peptídeo NLS FEN1, relacionado ao reparo BER, ligou-se tanto ao sítio S_1 como ao sítio secundário (S_2), comprovando ser uma sequência bipartida. Além disso, a região de *linker* do peptídeo FEN1 com somente 10 resíduos, possibilitou uma melhor ligação com a Imp α com uma conformação mais estendida e possivelmente mais favorável para a ligação com a Imp α do que peptídeos que possuem de 11-12 resíduos. Posições específicas nos sítios de ligação foram confirmadas como essenciais, bem como resíduos da Imp α conservados nessas regiões, indicando a importância das interações intermoleculares nesses sítios. Essas informações indicam que essas proteínas podem ser transportadas de maneira independente para o núcleo pela Imp α , sem a necessidade da formação de complexos com outras proteínas envolvidas em reparo.

Palavras-chave: Importina- α , importação nuclear, NLS, cristalografia de raios-X, Ku80, FEN1, PMS2, MLH1.

ABSTRACT

The stability and integrity of the genetic material are essential for the maintenance and continuation of life. The human genome, comprising three billion base pairs coding for 30.000 – 40.000 genes, is constantly attacked by endogenous reactive metabolites, therapeutic drugs and a plethora of environmental mutagens that impact its integrity. Thus it is obvious that the stability of the genome must be under continuous surveillance. This is accomplished by DNA repair mechanisms, which were developed to remove or tolerate injuries and mistakes in DNA. In the DNA repair mechanisms available in the organisms, they can be divided in: i) base excision repair (BER), ii) nucleotide excision repair (NER), iii) mismatch repair (MMR) and iv) DNA repair by non-homologous end joining (NHEJ). To an adequate operation of these mechanisms, it is evident the importance of the interaction between proteins responsible for the function of DNA repair, as well as the regulation for nuclear import is essential for the correct localization of the proteins responsible for the mentioned mechanisms. In the group of the mechanisms responsible for nuclear import regulation, the classical pathway composed by Importin- α/β heterodimer is one of the major mechanisms of transport. Some DNA repair proteins seem to interact only with certain isoforms of Importin- α (Imp α), indicating an additional regulation of the repair process. However, little information is known about the recognition of nuclear localization sequences (NLS) of these proteins. This work concerns specifically the structural studies of complexes with Imp α and NLSs peptides from proteins related to DNA repair using crystallographic techniques. The expression and purification of Imp α from *Mus musculus* N-terminally truncated were performed as well as the co-crystallization of the Imp α with NLS peptides from the DNA repair proteins, corresponding to the monopartite sequences from Ku80, PMS2 and MLH1 and the bipartite sequence from FEN1. X-ray diffraction data from obtained crystals were collected and processed in the range of 2.1 to 2.38 Å resolution. Using these results, the structures containing NLSs of Ku80 and FEN1 were elucidated. The Ku80 NLS peptide, related to the NHEJ repair, bound to the Imp α in a similar manner of the NLS of SV40 T antigen in the major binding site (S_1). Moreover the peptide NLS FEN1, related to BER repair, bind to the (S_1) site as well the secondary site (S_2), proving to be a bipartite sequence. In addition, the linker region of FEN1 peptide with only 10 residues, allowed a better connection with the Imp α by a more extended conformation and possibly more favorable binding to the Imp α than the peptides that have 11-12 residues. Specific positions in the binding sites were confirmed as essential as well as residues from Imp α that are conserved in these regions indicating the importance of intermolecular interactions in these sites. This information indicates that Imp α can transport these proteins independently into the nucleus, without the necessity of complex formation with other proteins involved in DNA repair.

Keywords: Importin- α , nuclear import, NLS, X-ray crystallography, Ku80, FEN1, PMS2, MLH1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo simplificado de translocação através do envelope nuclear. A: Representação do Complexo Poro Nuclear (NPC). Denominações: EN, envelope nuclear; FC, filamentos citoplasmáticos; FN, filamentos nucleares. Superfície FG é formada por nucleoporinas Fenilalanina-Glicina. O filtro seletivo constitui-se de cadeias polipeptídicas hidrofóbicas desenoveladas das nucleoporinas, que revestem o canal central do NPC. B: Íons e pequenas proteínas neutras podem passar através do filtro seletivo por difusão passiva. C: As grandes moléculas ou complexos atravessam o NPC somente através de receptores de transporte (Sorokin *et al.*, 2007). 17

Figura 2 - a) Diagrama simplificado do Complexo Poro Nuclear (NPC). b) Distribuição das nucleoporinas FG no núcleo central do NPC (Stewart, 2007). 19

Figura 3 - Estrutura tridimensional do NPC de *Saccharomyces cerevisiae* - Modelo de subestruturas protéicas que se unem para formar o NPC - Em cinza o poro da membrana. Em destaque os grupos de nucleoporinas organizadas em anéis externos (amarelo), anéis internos (roxo), anéis de membrana (marrom), nucleoporinas de ligação (TM- azul e rosa) e nucleoporinas FG (verde)(Albert *et al.*, 2007). 21

Figura 4 - Visão geral da importação nuclear de proteínas. a) No citoplasma, um complexo de importação entre NLS e o heterodímero Importina- α/β é formado (Stewart, 2007). 24

Figura 5 - Exemplos de proteínas com repetições HEAT e ARM. As α -hélices H1, H2, H3 de proteínas ARM são mostradas em verde, vermelho e amarelo respectivamente; hélices A e B de proteínas HEAT estão em vermelho e amarelo respectivamente; ligantes estão em azul. As estruturas apresentadas são as de: β -catenina de camundongos; Imp α de levedura ligada a uma NLS bipartida da nucleoporina; Transportina ligada com a Ran; Imp β de humanos ligada ao domínio IBB da Imp α ; A subunidade PR65/A da proteína fosfatase 2A humana. As estruturas estão orientadas com seus N-terminais no fundo e as C-terminais no topo (Andrade *et al.*, 2001). 25

Figura 6 - Repetições de motivos Armadillo (ARM) em Imp α e HEAT em Imp β . No topo da figura, as hélices H1, H2 e H3 de Imp α são mostradas em verde, vermelho e amarelo respectivamente. As hélices A e B da Imp β são indicadas em vermelho e amarelo. As repetições dos motivos ARM e HEAT ocorrem em uma ampla variedade de proteínas eucarióticas. Ligantes são mostrados em azul. As estruturas apresentadas são: Imp α de levedura complexada com a NLS de nucleoplasmina, um sinal de localização nuclear bipartido (Código PDB 1EE5) e Imp β de humano ligado ao domínio IBB (*importin- β -binding*) de uma Imp α (Código PDB 1QGK) (Goldfarb *et al.*, 2004). 26

Figura 7 - Representação em diagrama de fitas da Imp α (PDB-1IAL) (Kobe, 1999). 27

Figura 8 - Posições de ligação na Imp α nos sítios secundário (Arm 6-8) e principal (Arm2-4). Letras D representam o ácido aspártico, N a asparagina, Y a tirosina, W o triptofano, E o ácido glutâmico e R a arginina. A cadeia principal de um NLS é indicada em preto e as laterais em azul, sinalizando as posições ocupadas por resíduos básicos, importantes em uma NLS (Fontes *et al.*, 2000). 28

Figura 9 - Representação em diagrama de fitas de estruturas cristalográficas de complexos com a Imp β (vermelho). a) Complexo com o domínio IBB (verde); b) e c) Complexo com a RanGTP (azul); d) complexo com domínios FXFG de nucleoporinas FG (Chook & Blobel, 2001). 32

Figura 10 - (A) Via clássica de importação nuclear; (B) Via clássica de importação nuclear com co-importação - formação de um complexo de proteínas no citoplasma com uma proteína de reparo e outra que contém uma sequência cNLS; e (C) os mecanismos alternativos de importação. Muitas proteínas de reparo essenciais podem ser importadas por mais de um mecanismo. Os mecanismos de importação são ilustrados por algumas proteínas envolvidas na BER (verde), NER (vermelho) e MMR (azul) (Knudsen <i>et al.</i> , 2009).	35
Figura 11 - Vias metabólicas do DNA e das atividades bioquímicas correspondentes a FEN1 (Zheng <i>et al.</i> , 2011).	38
Figura 12 - Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada.	41
Figura 13 - Método para cristalização: <i>hanging drop</i> (gota suspensa). Imagem obtida do catálogo da empresa Hampton Research.	45
Figura 14 - Verificação da indução da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE).	48
Figura 15 - Confirmação das etapas realizada de expressão e purificação em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE).	50
Figura 16 - Verificação da purificação por troca-iônica da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Onde os números de 1-7 correspondem a alíquotas retiradas durante eluição.	50
Figura 17 - Verificação da purificação por afinidade da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Onde os números de 1-5 correspondem a alíquotas retiradas durante eluição.	51
Figura 18 - Cristal da Imp α nativa, condição citrato de sódio 0,6 Mol.L ⁻¹ , tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mMol.L ⁻¹	52
Figura 19 - Cristais do complexo Ku80NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,65 Mol.L ⁻¹ , tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mMol.L ⁻¹	53
Figura 20 - Cristais do complexo FEN1NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,6 Mol.L ⁻¹ , tampão citrato de sódio pH 5,8 e DTT 10 mMol.L ⁻¹	53
Figura 21 - Cristais do complexo PMS2NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,6 Mol.L ⁻¹ , tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mMol.L ⁻¹	54
Figura 22 - Cristais do complexo MLH1NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,625 Mol.L ⁻¹ , tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mMol.L ⁻¹	54
Figura 23 - Mapa de densidade eletrônica $2 F_{obs} - F_{calc} $ da Imp α com o peptídeo NLS da Ku80. Em destaque são mostrados alguns resíduos do sítio de ligação principal. A: Densidade eletrônica no sítio principal de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio principal com peptídeo adicionado ao modelo.	57
Figura 24 - Mapa de densidade eletrônica $2 F_{obs} - F_{calc} $ da Imp α com o peptídeo NLS da FEN1. Em A e B são mostrados alguns resíduos do sítio de ligação principal e em C e D resíduos do sítio de ligação secundário. A: Densidade eletrônica no sítio principal de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio principal com peptídeo adicionado ao modelo. C: Densidade	

eletrônica no sítio secundário de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio secundário com peptídeo adicionado ao modelo. 57

Figura 25 – Esquema mostrando a interação entre Imp α e peptídeos NLS. A: Diagrama das interações entre o peptídeo Ku80 e Imp α . Contatos polares são mostrados com linhas tracejadas e contatos hidrofóbicos são indicados por arcos com raios. Os resíduos NLS do peptídeo ku80 são identificados com a letra B (azul). Átomos de Carbono, nitrogênio e oxigênio são mostrados em preto, azul e vermelho, respectivamente. Essa figura foi preparada com o programa LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995). B: Diagrama das interações entre o peptídeo FEN1 e Imp α . Os resíduos do peptídeo NLS são identificados com a letra A (azul). 59

Figura 26 – Representação dos complexos de Imp α em diagrama de fitas e seus respectivos peptídeos NLS. Em destaque motivos ARM e a localização dos sítios de ligação de NLS da Imp α . Em rosa está destacado o complexo FEN1NLS:Imp α e em lilás o complexo Ku80NLS:Imp α 62

Figura 27 - Representação do complexo Imp α :Ku80NLS – Imp α truncada (72-496) encontra-se em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da Ku80 em *ball and sticks* (azul). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$ 63

Figura 28 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da Ku80 no sítio principal (S_1). Peptídeo em azul apresenta indicações de posições P1-P5 que correspondem a regiões do S_1 na Imp α 64

Figura 29 – Representação em *ball and stick* do Peptídeo NLS Ku80, em azul escuro, com resíduos dos sítios de ligação da Imp α , em amarelo, rosa claro e ciano, respectivamente. A: Resíduos da Imp α que fazem interação hidrofóbica, são mostrados em amarelo. B: Resíduos da Imp α que fazem ligação de hidrogênio são mostrados em rosa claro. C: Resíduos da Imp α que fazem tanto interação hidrofóbica, como ligação de hidrogênio são mostrados em ciano. 65

Figura 30 - Comparação dos peptídeos NLS no sítio de ligação principal (S_1) da Imp α , indicando Ku80 (azul) e SV40TAg (amarelo) (código PDB 1Q1T). Os NLSs foram sobrepostos usando átomos de C α dos peptídeos. Posições de ligação no sítio principal (P1-P5) são indicados ao longo da cadeia. 66

Figura 31 - Representação do complexo Imp α :FEN1NLS – Imp α truncada (72-496) encontra-se em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da FEN1 em *ball and stick* (rosa). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$. .. 67

Figura 32 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da FEN1 ligado aos sítio principal (S_1) e secundário (S_2). Peptídeo em rosa apresenta indicações de posições P1-P5 e P1'-P4' que correspondem a regiões do S_1 e S_2 da Imp α 68

Figura 33 - Comparação dos peptídeos NLS. Os NLSs FEN1 (rosa escuro), N₁N₂ (rosa claro) (código PDB 1PJN), Nucleoplasmina (amarelo) (código PDB 1EJY), RB (verde) (código PDB 1PJM) e SV40TAg (azul claro) (código PDB 1Q1T) foram sobrepostos usando a sobreposição dos átomos de C α dos peptídeos da região de P1-P5. Posições de ligação no sítio principal (P2-P5) e secundários (P1'-P2') são indicados ao longo da cadeia. 70

Figura 34 - Representação em *ball and stick* do Peptídeo NLS FEN1, em rosa escuro, com resíduos dos sítios de ligação da Imp α , em amarelo, rosa claro e ciano, respectivamente. A:

Resíduos da Imp α que fazem interação hidrofóbica, são mostrados em amarelo. B: Resíduos da Imp α que fazem ligação de hidrogênio são mostrados em rosa claro . C: Resíduos da Imp α que fazem tanto interação hidrofóbica, como ligação de hidrogênio são mostrados em ciano..... 71

Figura 35 – Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS Ku80 com a Imp α no sítio principal de ligação (S₁). A cadeia principal é mostrada com uma linha preta, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Imp α . Cadeias laterais de resíduos da Imp α que interagem com o peptídeo são indicadas em: letras D representam o ácido aspártico, N a asparagina, W o triptofano, T a treonina, G a glicina e Q a glutamina..... 80

Figura 36 – Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS FEN1 com a Imp α no sítio secundário de ligação (S₂). A cadeia principal é mostrada com uma linha preta, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Imp α . Cadeias laterais de resíduos da Imp α que interagem com o peptídeo são indicadas, letras N representam a asparagina, W o triptofano e o E ácido glutâmico..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - NLS de proteínas relacionadas a processos de reparo de DNA.	39
Tabela 2 - Condições de cristalização dos cristais utilizados em experimentos de difração de raios-X.	53
Tabela 3 - Dados referentes aos parâmetros utilizados nos experimentos de difração de raios X com os complexos peptídeosNLSs:Imp α no LNLS em Campinas.....	55
Tabela 4 - Estatísticas da coleta de dados de difração de raios X.	55
Tabela 5 – Estatísticas de refinamento dos complexos Imp α com peptídeos NLS.	58
Tabela 6 – Interações hidrofóbicas entre o peptídeo NLS e a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁) e secundário (S ₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.....	60
Tabela 7 – Interações do tipo ligações de hidrogênio entre os peptídeos NLSs e a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁) e secundário (S ₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.	61
Tabela 8 – Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS Ku80.	63
Tabela 9 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS Ku80.	67
Tabela 10 – Comparação após superposição dos átomos C α do peptídeo FEN1 com outros peptídeos monopartidos e bipartidos elucidados anteriormente.....	69
Tabela 11 - Interações hidrofóbicas entre o peptídeo NLS e a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁) e secundário (S ₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.....	76
Tabela 12 – Interações do tipo ligações de hidrogênio entre os peptídeos NLSs e a Imp α nos sítios de ligação principal (S ₁) e secundário (S ₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.....	77
Tabela 13 – Peptídeos NLS e sítios de ligação da Imp α , sítio principal (S ₁) P1-P5 e sítio secundário (S ₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.	78

ABREVIATURAS

AR – Receptor de andrógeno.

ARM – Motivo do tipo armadillo.

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

CAS – Exportina *Cellular apoptosis susceptibility*.

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

CN – Versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

cNLS – Sequência de localização nuclear clássicas.

DSBs – Quebras da dupla-fita DNA.

DNase – Desoxirribonuclease.

DTT – Ditionitrito.

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

FC – Filamentos citoplasmáticos.

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

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

GTP – Guanosina trifosfato.

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

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

IDL – Inserção/deleção de loops no DNA.

Imp α – Importina- α .

Imp β – Importina- β .

IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo.

Ku70 – Proteína que participa do reparo de DNA.

Ku80 – Proteína que participa do reparo de DNA.

LB – Luria Bertani (meio de cultura).

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

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

N₁N₂ – Proteína ligadora de histona.

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

NES – Sequência de exportação nuclear.

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

NLS – Sequência de localização nuclear.

NPC – Complexo poro nuclear.

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

Nup – Proteína Nucleoporina.

Nup50 – Proteína nucleoporina.

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

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

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

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil.

RanGTP – Guanosina trifosfato Ran

RB – Proteína retinoblastoma.

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

RNAse – Ribonuclease.

S₁ – Sítio de ligação principal.

S₂ – Sítio de ligação secundário.

SV40 – Antígeno T do vírus símio 40.

SV40P – Versão fosforilada do peptídeo do NLS de SV40.

TCEP – Tris-[2-carboxietil]-fosfina.

TM – Transmembrana

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PARA O NÚCLEO CELULAR.....	16
1.2. COMPLEXO PORO NUCLEAR (NPC)	18
1.2.1. NUCLEOPORINAS	19
1.3. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DEPENDENTE DE IMPORTINAS OU VIA CLÁSSICA DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR	22
1.3.1. CARIOFERINAS.....	24
1.3.2. IMPORTINA- α	27
1.3.2.1. SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS).....	29
1.3.3. IMPORTINA- β	31
1.4. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO REPARO DE DNA	33
1.4.1. SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS DE REPARO DE DNA	36
1.4.1.1. Ku70 e Ku80	36
1.4.1.2. Endonuclease-1 Flap (FEN1)	37
1.4.1.3. MLH1 e PMS2	38
2. OBJETIVO	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. EXPRESSÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529)	42
3.2. PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	43
3.3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS NLS	45
3.4. CRISTALIZAÇÃO	45
3.5. COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO.....	46
3.6. ELUCIDAÇÃO E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. EXPRESSÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529)	48
4.2. PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	49
4.3. CRISTALIZAÇÃO DA IMPORTINA- α (70-529) E OS PEPTÍDEOS NLSs: KU80, FEN1, PMS2 E MLH1	52
4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	54
4.5. ELUCIDAÇÃO, MODELAGEM E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS.....	56
4.6. ESTRUTURA DA Imp α NOS COMPLEXOS.....	61
4.7. ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS IMPORTINA- α E OS PEPTÍDEOS NLSs.....	62
4.7.1. Ku80NLS:Imp α	62
5. DISCUSSÃO	72
5.1. Ku80NLS:Imp α	72
5.2. FEN1NLS:Imp α	73
5.2.1. A ligação da região do <i>linker</i> do peptídeo bipartido NLS FEN1 à Imp α	74
5.3. Sítios de ligação da Imp α	78
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PARA O NÚCLEO CELULAR

Em células eucariontes, o maquinário da replicação do DNA e a transcrição do RNA no núcleo, são separados espacialmente da síntese de proteínas e dos sistemas metabólicos que ocorrem no citoplasma por uma dupla membrana denominada envelope nuclear (Chook & Blobel, 1999; Conti & Izaurralde, 2001; Cook *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007). Essa separação possibilita uma regulação precisa dos processos celulares, tais como a expressão gênica, sinalização celular e ciclo celular, através da regulação seletiva do transporte bidirecional entre o núcleo e o citoplasma (Lange *et al.*, 2007). Dessa maneira é necessário um mecanismo molecular seletivo de transporte que reconheça especificamente a proteína a ser transportada de um compartimento para o outro (Lange *et al.*, 2007; Stewart, 2007).

Presente no envelope nuclear, o complexo poro nuclear ou NPC (*nuclear pore complex*) é responsável pela intercomunicação entre o citoplasma e o núcleo. Por ele é realizado o transporte bidirecional de macromoléculas e a regulação do transporte núcleo citoplasma de vários tipos de RNAs, proteínas de membranas (receptores) e proteínas solúveis (Franke & Scheer, 1974; Sorokin *et al.*, 2007; Stewart, 2007).

Proteínas de 20 a 60 kDa podem atravessar para o núcleo sob a ação das proteínas presentes no NPC, as nucleoporinas (Gorlich, 1998), enquanto íons e pequenas proteínas neutras que não se ligam as nucleoporinas podem atravessar o NPC devido ao processo de difusão passiva (Gorlich & Kutay, 1999; Keminer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2009) (Figura 1B). Nesse caso, eles passam via um canal central de 8 a 10 nm de diâmetro com cerca de 45 nm de comprimento (Keminer *et al.*, 1999; Sorokin *et al.*, 2007). Quando as moléculas a serem transportadas interagem com as nucleoporinas, o diâmetro do poro aumenta para 40 nm, facilitando assim o transporte (Ribbeck & Gorlich, 2001). Outras proteínas são filtradas seletivamente por uma rede de nucleoporinas desenoveladas e hidrofóbicas, situadas no canal central do NPC (Figura 1B).

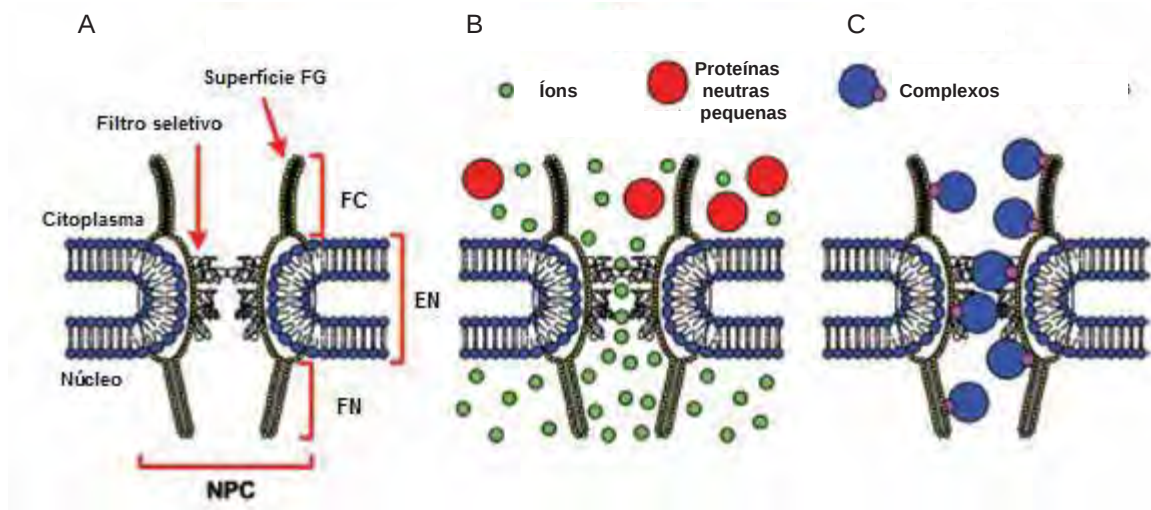


Figura 1 - Modelo simplificado de translocação através do envelope nuclear. A: Representação do Complexo Poro Nuclear (NPC). Denominações: EN, envelope nuclear; FC, filamentos citoplasmáticos; FN, filamentos nucleares. Superfície FG é formada por nucleoporinas Fenilalanina-Glicina. O filtro seletivo constitui-se de cadeias polipeptídicas hidrofóbicas desenoveladas das nucleoporinas, que revestem o canal central do NPC. B: Íons e pequenas proteínas neutras podem passar através do filtro seletivo por difusão passiva. C: As grandes moléculas ou complexos atravessam o NPC somente através de receptores de transporte (Sorokin *et al.*, 2007).

Apesar do diâmetro do poro ser relativamente grande, algumas pequenas proteínas, menores que 20-30 kDa, como por exemplo as histonas, passam via NPC somente com auxílio de mediadores (Breeuwer & Goldfarb, 1990) (Figura 1C). O transporte de macromoléculas entre núcleo e citoplasma é mediado por receptores solúveis que interagem com componentes do NPC para transporte de moléculas específicas. Esse transporte ocorre por diferentes vias dependentes de receptores e acessórios utilizados, denominados carioferinas (Stewart, 2006; Cook *et al.*, 2007; Sorokin *et al.*, 2007). Essas macromoléculas encarregadas do transporte são solúveis e reconhecem as proteínas a serem carregadas (Cook *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007), pelas Sequências de Localização Nuclear (NLS), no caso de importação nuclear e em Sinais de Exportação Nuclear (NES), para exportação. Dessa maneira, pode ocorrer a formação de diferentes complexos transportadores (Sorokin *et al.*, 2007), cujos mais conhecidos podem ser descritos nas vias: i) importação nuclear dependente de importinas ou via clássica; ii) importação nuclear dependente da Importina- β e iii) importação nuclear via Importina- β mediada pela Snuportina 1.

A maioria dos transportes é realizado dependente de energia em alguma etapa. Nesses casos, a hidrólise de GTP por proteínas da Família Ras (*RAs-related Nuclear proteins*), GTPases Ran, fornece a energia para o ciclo de importação nuclear (Weis, 2003; Stewart, 2006; Lange *et al.*, 2007).

1.2. COMPLEXO PORO NUCLEAR (NPC)

O Complexo Poro Nuclear ou NPC (*Nuclear Pore Complex*) é uma grande estrutura que abrange as membranas nucleares interna e externa para facilitar o intercâmbio bidirecional de macromoléculas entre o citoplasma e o núcleo (Stewart, 2007), é formado por aproximadamente 30 proteínas diferentes, denominadas nucleoporinas.

Em geral, o NPC é simétrico quando visto na membrana com relação ao seu diâmetro e é assimétrico quando analisado pela superfície da membrana. De maneira simplificada, o complexo é composto por três subestruturas, i) os filamentos citoplasmáticos, ii) um núcleo central - “corpo”, que possui aproximadamente 120 nm de diâmetro e 70 nm de largura (Akey & Radermacher, 1993; Beck *et al.*, 2004; Stewart, 2007) e iii) a cesta nuclear (Sorokin *et al.*, 2007) (Figura 2). O corpo do NPC constitui um canal central que pode atingir aproximadamente 40 nm de diâmetro (Feldherr *et al.*, 2001; Stewart, 2007) através do qual são transportadas macromoléculas. Esse canal é composto por uma alta concentração de cadeias de proteínas, as quais apresentam pouca estrutura regular (Stewart, 2007).

A reconstrução do NPC em microscopia eletrônica de alta resolução mostrou que a arquitetura dos NPC de diferentes organismos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* e mamíferos são muito conservadas estruturalmente (Akey & Radermacher, 1993; Sorokin *et al.*, 2007). No entanto, NPCs de vertebrados são maiores em tamanho e podem ter estruturas adicionais. Em relação a massa molecular, os NPCs de mamíferos possuem aproximadamente 125 MDa (Ohno *et al.*, 1998), levedura, *Saccharomyces cerevisiae* 44 MDa (Rout & Aitchison, 2000; Sorokin *et al.*, 2007) e *Xenopus laevis* 60 MDa (Reichelt *et al.*, 1990; Sorokin *et al.*, 2007).

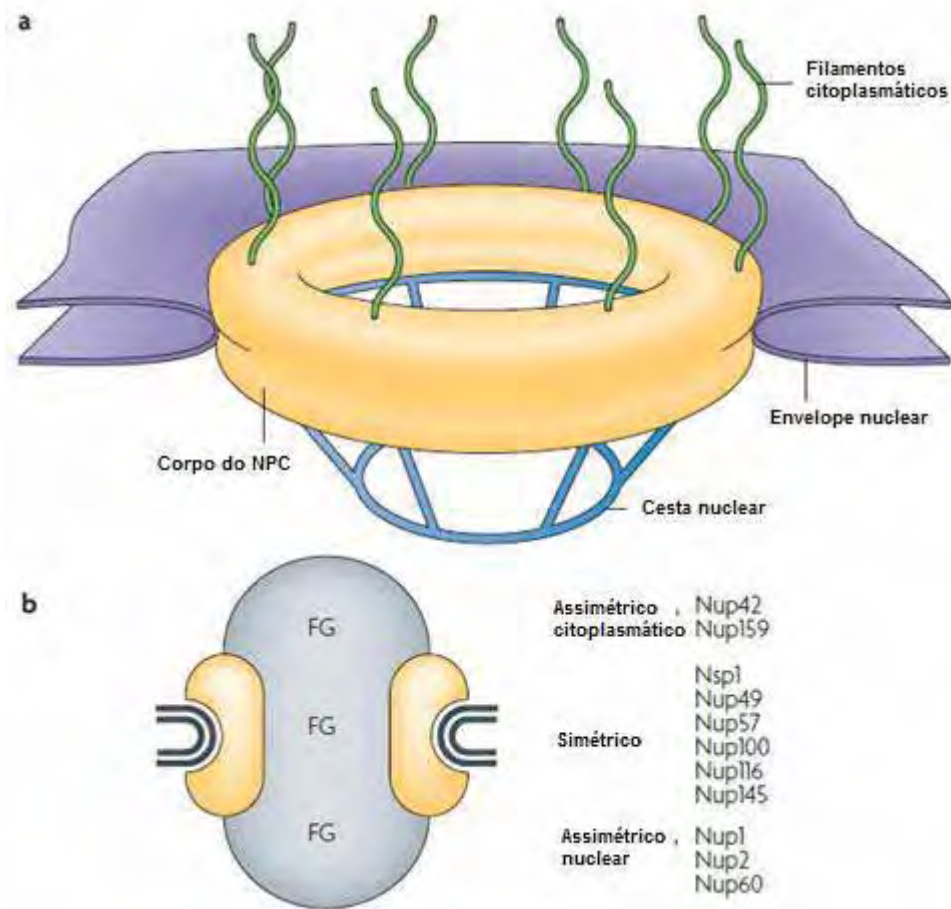


Figura 2 - a) Diagrama simplificado do Complexo Poro Nuclear (NPC). b) Distribuição das nucleoporinas FG no núcleo central do NPC (Stewart, 2007).

1.2.1. NUCLEOPORINAS

Os NPCs são estruturas plásticas que parecem deformar-se para possibilitar a passagem de partículas grandes, construídos a partir de múltiplas cópias (Rout *et al.*, 2000), em regra, 8, 16 ou 32 cópias de nucleoporinas (Rout & Aitchison, 2000; Sorokin *et al.*, 2007; Stewart, 2007). A maioria das nucleoporinas está localizada simetricamente e podem ser encontradas em ambos os lados, nuclear e citoplasmático dos NPCs e seu número total pode variar de 500-1000 por NPC (Rout & Aitchison, 2000; Sorokin *et al.*, 2007). Existe um pequeno subconjunto de formações assimétricas filamentosas localizadas assimetricamente, encontradas somente em um dos lados do NPC por estarem anexadas ao corpo do NPC (Rout *et al.*, 2000; Stewart, 2007) (Figura 2a). Essas formações denominadas filamentos citoplasmáticos foram sugeridas como as primeiras implementadas para o reconhecimento de complexos de transporte (Rout & Aitchison, 2000; Sorokin *et al.*, 2007).

O fracionamento bioquímico do NPCs mostrou que as nucleoporinas se associam para formar subcomplexos com uma composição definida (Tran & Wente, 2006; Stewart, 2007) e podem apresentar enovelamentos comuns, tais como super-hélices, propulsores WD (*WD propellers*) e solenóides α -hélice (Devos *et al.*, 2004; Stewart, 2007). As nucleoporinas podem ser divididas em famílias: i) Nucleoporinas transmembrana (TM), fixam os NPCs na membrana nuclear; ii) Nucleoporinas FG, (Devos *et al.*, 2004) apresentam distintas sequências de Fenilalanina-Glicina (FG) localizadas difusamente no poro (Figura 2b). As repetições de nucleoporinas FG possuem curtos núcleos hidrofóbicos contendo resíduos Fenilalanina e Glicina com sequências como FXFG (em que X é um resíduo pequeno como glicina, alanina ou serina) ou GLFG. Estes núcleos são separados por resíduos hidrofílicos de sequência e comprimento variável; iii) Nucleoporinas FN com repetições Fenilalanina-Asparagina (FN) como as proteínas Nup35/Nup53; iv) Nucleoporinas WD, que contêm motivos de repetições de Triptofano-Ácido aspártico, *WD propeller* - “propulsor” de sete lâminas (Devos *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2007; Stewart, 2007) (Figura 3).

Acredita-se que nucleoporinas FG compõem metade da massa do NPC (200-700 cópias por NPC). A maior parte delas é distribuída simetricamente à membrana nuclear (Rout & Aitchison, 2000; Sorokin *et al.*, 2007) e são as que possuem os sítios de ligação das carioferinas. Quando passam ao NPC, todas carioferinas ligam-se às nucleoporinas FG. Essas interações fazem a base do atual modelo de transporte núcleo citoplasma (Suntharalingam & Wente, 2003; Sorokin *et al.*, 2007). Supõe-se que a localização assimétrica da nucleoporina FG desempenha um papel importante na direção do transporte e liberação de substrato. O transporte para o núcleo começa a partir da ligação do complexo de transporte com a nucleoporina FG (Peters, 2005; Sorokin *et al.*, 2007).

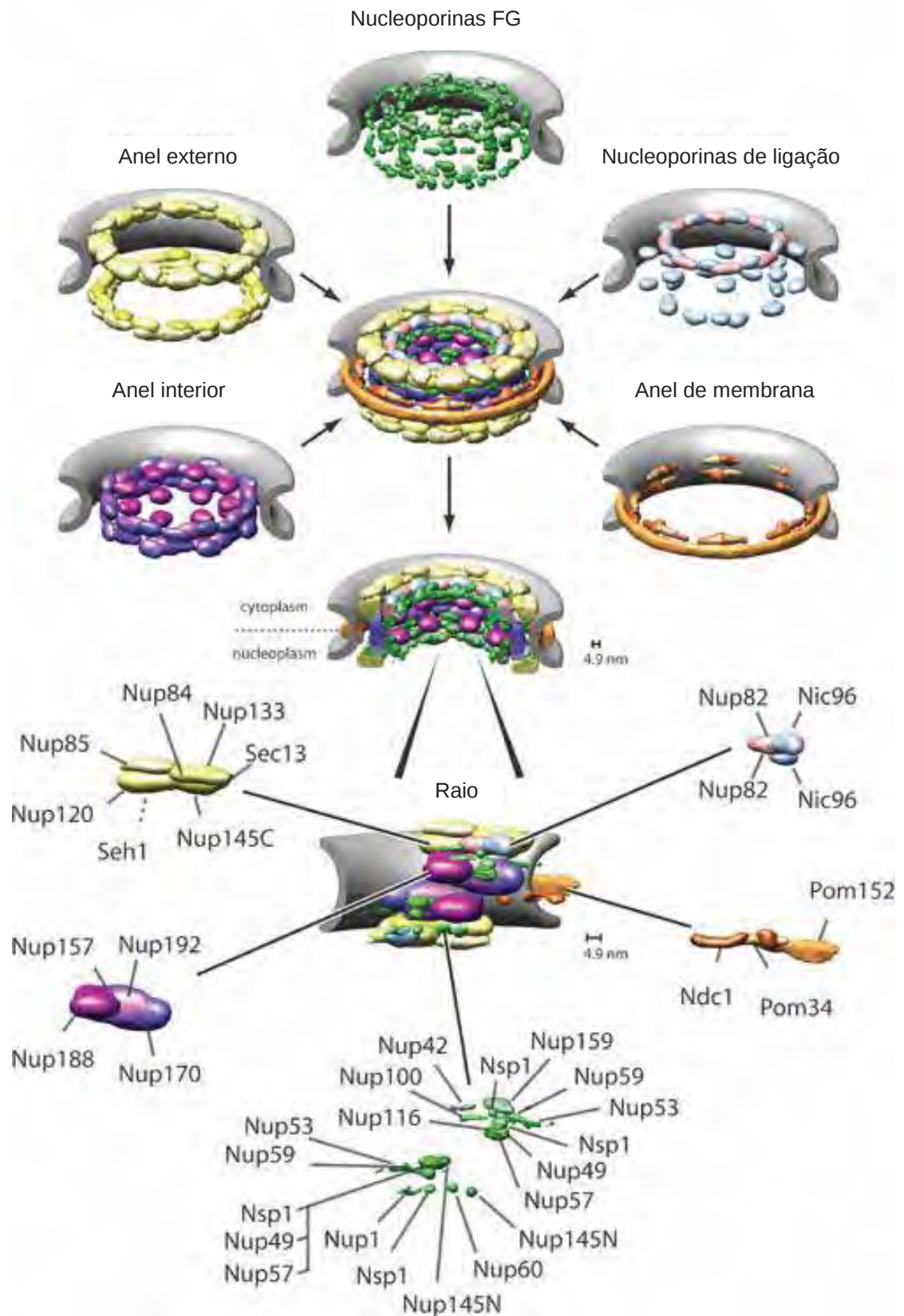


Figura 3 - Estrutura tridimensional do NPC de *Saccharomyces cerevisiae* - Modelo de subestruturas proteicas que se unem para formar o NPC - Em cinza o poro da membrana. Em destaque os grupos de nucleoporinas organizadas em anéis externos (amarelo), anéis internos (roxo), anéis de membrana (marrom), nucleoporinas de ligação (TM- azul e rosa) e nucleoporinas FG (verde)(Albert *et al.*, 2007).

1.3. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DEPENDENTE DE IMPORTINAS OU VIA CLÁSSICA DE IMPORTAÇÃO NUCLEAR

A via clássica de importação nuclear de proteínas é a melhor caracterizada dentre os ciclos de transporte, e todos os seus componentes foram identificados, tais como a GTPase Ran (Melchior *et al.*, 1993; Moore & Blobel, 1993), a Importina- α (Imp α) (Gorlich *et al.*, 1994; Imamoto *et al.*, 1995; Weis *et al.*, 1995), a Importina- β (Imp β) (Adam & Adam, 1994; Chi *et al.*, 1995; Gorlich *et al.*, 1995a; Gorlich & Laskey, 1995; Gorlich *et al.*, 1995b; Imamoto *et al.*, 1995; Radu *et al.*, 1995) e o NTF2 (Moore, 1995; Paschal & Gerace, 1995), que está envolvido na importação e exportação da Ran (Ribbeck *et al.*, 1998; Kohler *et al.*, 1999). Essa via de importação nuclear usa Imp β como um transportador, a Imp α como adaptador e transporta uma grande variedade de proteínas. Tem sido amplamente estudada em bioquímica, biologia celular, genética e em detalhes biológicos e estruturais.

O ciclo de importação nuclear de uma proteína tem como base uma série de interações coordenadas, que precisam de constante regulação e gera taxas de transporte de macromoléculas de aproximadamente 100 a 1.000 proteínas por minuto, por NPC. Esse ciclo pode ser convenientemente dividido em quatro etapas: i) Montagem do complexo de importação carga proteica/transportador no citoplasma; ii) Translocação através de NPCs; iii) Desligamento do complexo de importação no núcleo; iv) Reciclagem das proteínas transportadoras. Sinais específicos contribuem para a fidelidade desses eventos, dentre os quais as sequências de localização nuclear (NLS) (Stewart, 2007). Proteínas que possuem NLS são importadas para o núcleo via transportador Imp β , o qual se liga a estas proteínas através da Imp α (Gorlich & Kutay, 1999; Chook & Blobel, 2001; Macara, 2001; Weis, 2003) no seu sítios de reconhecimento específicos para as NLSs (Conti *et al.*, 1998; Conti & Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Stewart, 2006; Stewart, 2007).

Inicialmente, no citoplasma, a Imp α liga-se à Imp β deslocando o domínio auto-inibitório ou IBB (*Importin beta binding*) (Kobe, 1999) da Imp α . Após a formação do heterodímero (Importina- α/β), é possível a ligação da proteína a ser importada, via reconhecimento do NLS (Gorlich & Laskey, 1995; Imamoto *et al.*, 1995) (Figura 4). As cadeias laterais básicas dos NLSs clássicos fazem uma série de interações específicas com resíduos conservados presentes na porção côncava da Imp α (Conti *et al.*, 1998; Conti & Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Stewart, 2006; Stewart,

2007). Em seguida, a Imp β ancora o complexo aos filamentos citoplasmáticos do NPC e ocorre o transporte através do poro, em virtude dessas interações (Moore & Blobel, 1993; Gorlich & Mattaj, 1996).

No núcleo, o complexo proteína-substrato se desacopla com a ligação da proteína Ran ligada a GTP (Ran-GTP) à subunidade β da Importina, alterando sua conformação e liberando o IBB da Imp α . Esse domínio então passa a competir com a NLS da proteína importada, promovendo uma diminuição de afinidade da carga, facilitando a liberação da mesma em virtude do mecanismo auto-inibitório (Kobe, 1999). Uma otimização do processo de desacoplamento da proteína transportada e reciclagem da Imp α ocorre com auxílio da nucleoporina (Nup2 em levedura, Nup50 ou Nup60 em vertebrados) (Lange *et al.*, 2007), que liga-se a uma das regiões de ligação do NLS e uma porção C-terminal da Imp α , em virtude de maior afinidade com a mesma. A nucleoporina liga-se à superfície estendida do domínio de repetição ARM da Imp α , incluindo o sítio de ligação secundário de NLS, liberando a proteína transportada e o sítio de ligação (Matsuura & Stewart, 2005).

Após a proteína importada ter sido liberada pelo deslocamento do NLS pela nucleoporina, a mesma é deslocada pela ligação com a exportina (Cse1:RanGTP em leveduras ou CAS:RanGTP em vertebrados) na região C-terminal da Imp α . Dessa forma, ocorre a ligação do domínio IBB com os sítios NLS da Imp α , fato crucial para a formação do complexo de exportação exportina:Ran:GTP:Imp α . É essa a ligação sequencial das nucleoporinas, seguida por exportinas que fornece uma regulação molecular poderosa para assegurar que Imp α será reciclada para o citoplasma, após a liberação da proteína transportada (Cingolani *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2007). Enquanto a reciclagem da Imp α é dependente de exportina, a Imp β é reciclada para o citoplasma, por meio da formação do complexo Imp β :RanGTP. Em ambos os casos a Ran-GAP (Proteína de ativação Ran-GTPase) citoplasmática dissocia esses dois complexos, liberando as importinas para um novo ciclo (Stewart, 2006) (Figura 4).

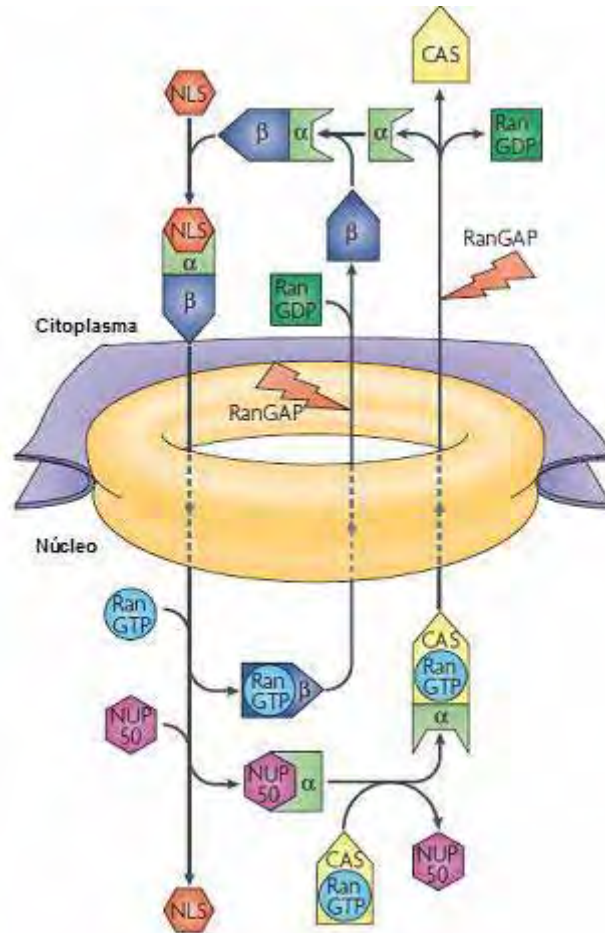


Figura 4 - Visão geral da importação nuclear de proteínas. a) No citoplasma, um complexo de importação entre NLS e o heterodímero Importina- α/β é formado (Stewart, 2007).

1.3.1. CARIOFERINAS

As carioferinas são proteínas responsáveis pelo reconhecimento e a importação de proteínas para o núcleo das células eucariontes. Essa família de proteínas tem como características a interação com as nucleoporinas, bem como a interação com a GTPase Ran em seu estado ligado à GTP (Macara, 2001). As carioferinas envolvidas na importação nuclear são denominadas importinas, enquanto as envolvidas com a exportação são as exportinas. Repetições de motivos Armadillo (ARM) e HEAT são características das carioferinas, conferindo em geral estruturas alongadas (Itzhaki & Lowe, 2000) (Figura 5).

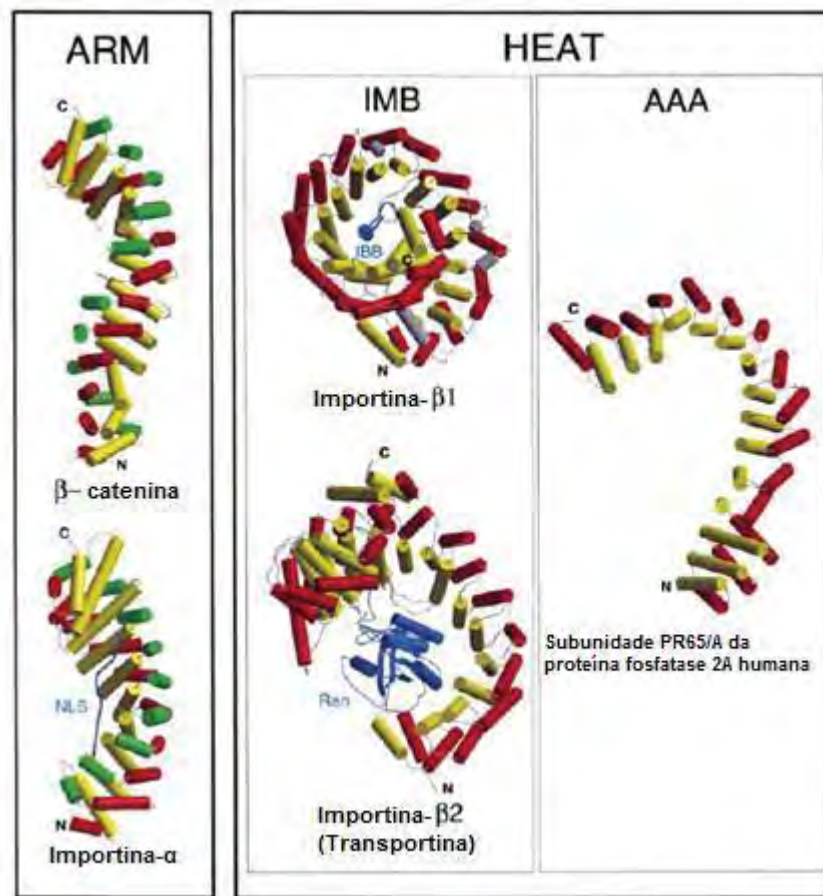


Figura 5 - Exemplos de proteínas com repetições HEAT e ARM. As α -hélices H1, H2, H3 de proteínas ARM são mostradas em verde, vermelho e amarelo respectivamente; hélices A e B de proteínas HEAT estão em vermelho e amarelo respectivamente; ligantes estão em azul. As estruturas apresentadas são as de: β -catenina de camundongos; Imp α de levedura ligada a uma NLS bipartida da nucleoporina; Transportina ligada com a Ran; Imp β de humanos ligada ao domínio IBB da Imp α ; A subunidade PR65/A da proteína fosfatase 2A humana. As estruturas estão orientadas com seus N-terminais no fundo e as C-terminais no topo (Andrade *et al.*, 2001).

O motivo armadillo (ARM) foi identificado pela primeira vez como produto do gene de *Drosophila melanogaster* (Riggleman *et al.*, 1989; Itzhaki & Lowe, 2000). Ele é composto por três hélices, denominadas H1, H2 e H3. As hélices H2 e H3 encontram-se dispostas de maneira antiparalela e ambas são quase perpendiculares à hélice H1, em virtude de uma torção entre H1 e H2, mediada por um conservado resíduo de glicina (Chook & Blobel, 1999; Cingolani *et al.*, 1999; Stewart, 2006). O motivo HEAT, por sua vez, foi inicialmente encontrado em uma família de proteínas, incluindo as quatro das quais deriva seu nome: Huntingtin, o fator de alongamento 3, o PR65/subunidade A da proteína fosfatase 2A (PP2A) e os lipídios quinase TOR (Andrade & Bork, 1995; Itzhaki & Lowe, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Stewart, 2006;

Cook *et al.*, 2007). Esse motivo apresenta apenas duas hélices, A e B, constituindo um grampo (*hairpin*) (Andrade *et al.*, 2001) (Figura 6).

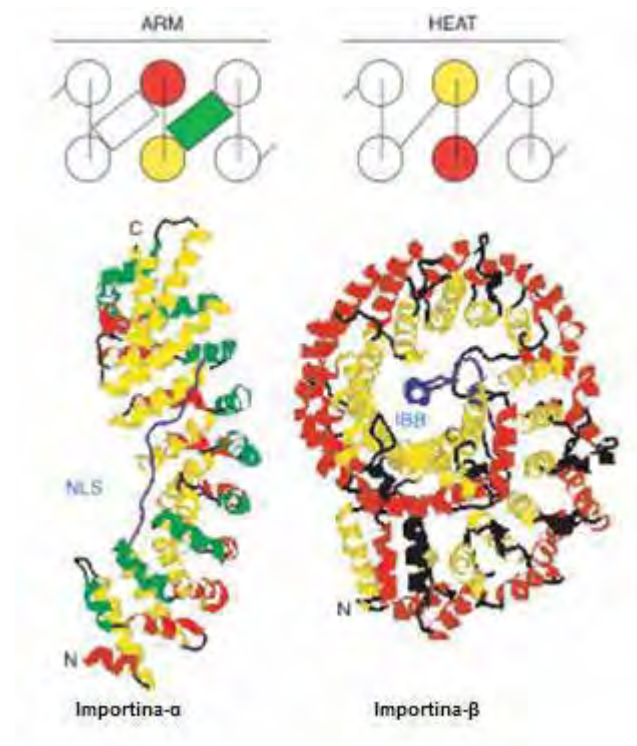


Figura 6 - Repetições de motivos Armadillo (ARM) em Imp α e HEAT em Imp β . No topo da figura, as hélices H1, H2 e H3 de Imp α são mostradas em verde, vermelho e amarelo respectivamente. As hélices A e B da Imp β são indicadas em vermelho e amarelo. As repetições dos motivos ARM e HEAT ocorrem em uma ampla variedade de proteínas eucarióticas. Ligantes são mostrados em azul. As estruturas apresentadas são: Imp α de levedura complexada com a NLS de nucleoplasmina, um sinal de localização nuclear bipartido (Código PDB 1EE5) e Imp β de humano ligado ao domínio IBB (*importin- β -binding*) de uma Imp α (Código PDB 1QGK) (Goldfarb *et al.*, 2004).

Os membros da família das carioferinas com repetições de motivos HEAT, como a do fator de importação Imp β e do fator de exportação Cse1, possuem 19-20 HEATs compondo sua estrutura (Cook *et al.*, 2007). Essas repetições funcionam como molas enroladas com uma curvatura torcida, criada pelo conjunto de α -hélices que formam a estrutura da super-hélice, mudando drasticamente de conformação dependendo se estão em sua forma livre ou complexada. Acredita-se que esta flexibilidade permite que elas se complexem a uma série de ligantes diferentes (Conti *et al.*, 2006), mostrando a versatilidade destas moléculas em reconhecer as diferentes proteínas (Itzhaki & Lowe, 2000; Stewart, 2006). Suas diferentes cópias da mesma molécula dentro de uma unidade assimétrica ou as formas de cristais diferentes (Cingolani *et al.*, 1999) comprovam que estas moléculas podem ser relativamente flexíveis (Stewart, 2006).

1.3.2. IMPORTINA- α

A Importina- α (Imp α) participa da via clássica de importação nuclear e é responsável pelo reconhecimento inicial do substrato a ser importado pela ligação do seu NLS. Tem aproximadamente 60 kDa e apresenta dois domínios funcionais (Figura 7). Um pequeno domínio N-terminal denominado domínio de ligação à Imp β (IBB - *Importin Beta Binding*) ou domínio autoinibitório (Moore & Blobel, 1993; Gorlich & Mattaj, 1996) e o domínio de ligação de NLS (Gorlich *et al.*, 1994). A primeira estrutura elucidada de Imp α foi a de levedura (Conti *et al.*, 1998) em que a proteína truncada (88-530) foi elucidada na forma de homodímero, o qual foi proposto inicialmente como mecanismo pelo qual a Imp α participasse da importação nuclear. Posteriormente, com a elucidação da Imp α de camundongo, o mecanismo atual foi comprovado (Kobe, 1999). Nesse mecanismo, foi mostrado que o domínio IBB contém um conjunto de resíduos básicos (KRR) que é semelhante a uma sequência NLS (Kobe, 1999; Matsuura & Stewart, 2004; Lange *et al.*, 2007). Portanto, além de conectar Imp α na Imp β , o domínio do IBB tem um papel autoinibitório (Kobe, 1999) de modo que, quando ele não está complexado com a Imp β , ele compete com os sítios de ligação da NLSs da Imp α contribuindo na regulação do processo de importação e também na liberação da carga.

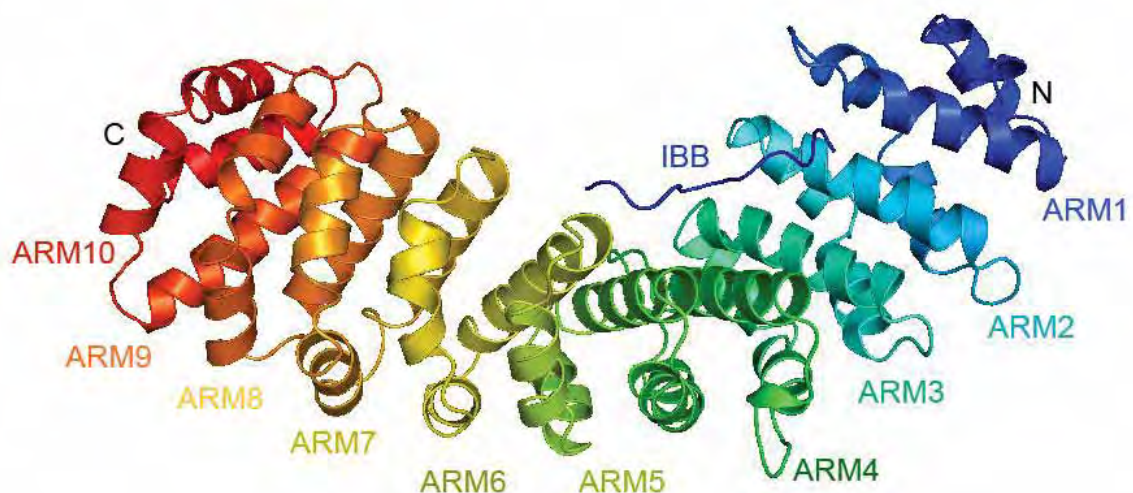


Figura 7 - Representação em diagrama de fitas da Imp α (PDB-1IAL) (Kobe, 1999).

O outro domínio, que compreende a maior parte da proteína, é composto por dez motivos *armadillo* (ARM) (Gorlich *et al.*, 1994); e contém os sítios de ligação de NLS (Kobe, 1999) (Figura7). Os motivos ARM apresentam cerca de 40 resíduos e

são constituídos por três alfa-hélices, denominadas H1, H2 e H3 (Kobe, 1999; Andrade *et al.*, 2001). As repetições apresentam cerca de trinta graus de rotação entre si, resultando em uma molécula alongada e torcida. As hélices H3 formam a superfície interna côncava na molécula onde são encontrados conservados resíduos de triptofano e asparagina, cercados por resíduos ácidos. Esse arranjo confere um sítio de ligação com características hidrofóbicas e eletrostáticas (Conti & Kuriyan, 2000), em que a ocupação de determinadas posições, denominadas de P1 a P6 no sítio principal (S₁) e P1' a P5' no sítio secundário (S₂), são importantes para reconhecimento de NLS (Fontes *et al.*, 2000) (Figura 8).

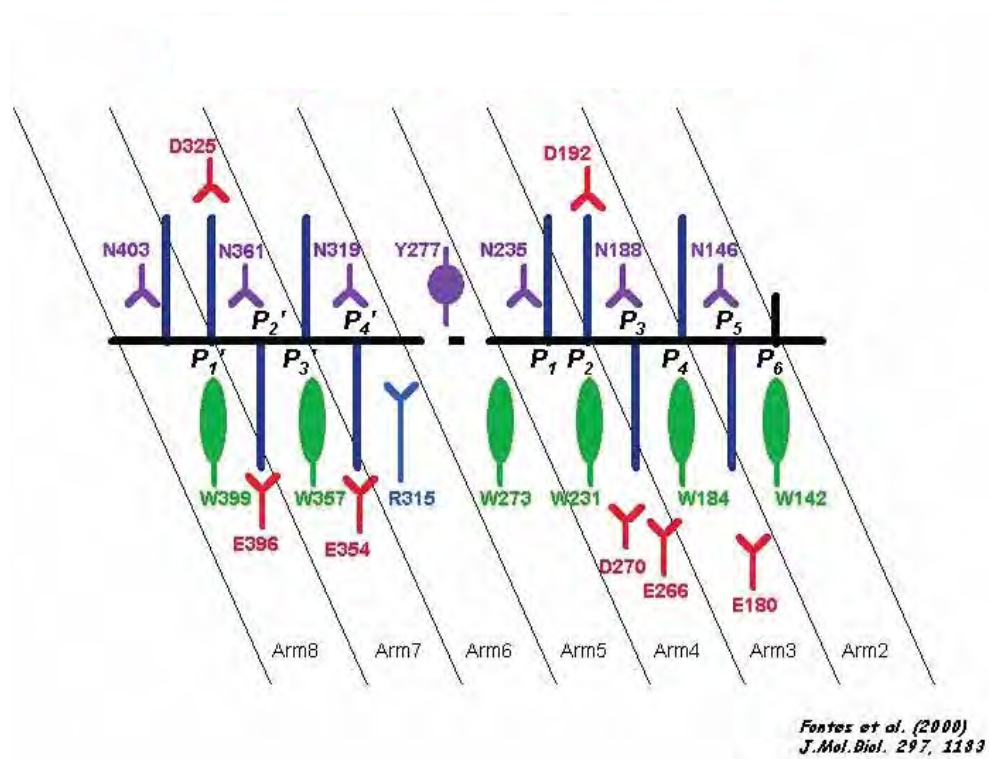


Figura 8 - Posições de ligação na Impα nos sítios secundário (Arm 6-8) e principal (Arm2-4). Letras D representam o ácido aspártico, N a asparagina, Y a tirosina, W o triptofano, E o ácido glutâmico e R a arginina. A cadeia principal de um NLS é indicada em preto e as laterais em azul, sinalizando as posições ocupadas por resíduos básicos, importantes em uma NLS (Fontes *et al.*, 2000).

A Impα apresenta um elevado grau de conservação na sua estrutura (Conti & Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000) e mecanismo de reconhecimento. Enquanto em leveduras foi encontrada apenas uma isoforma de Impα (SRP1 ou Kap60), em humanos 7 isoformas já foram descritas. Com base na similaridade de suas sequências, essas proteínas foram agrupadas em três grandes famílias: Famílias

Kap- α 1, Kap- α 2, e Kap- α 3 (Kohler *et al.*, 1999). Os membros dessas famílias diferentes têm cerca de 50% de identidade sequencial (Kohler *et al.*, 1999; Talcott & Moore, 2000) e dentro de uma família, a identidade é, no mínimo, 80% (Kohler *et al.*, 1999). Cada uma destas isoformas tem mostrado ser capazes de mediar a importação de um ou mais proteínas contendo NLS clássicas (Talcott & Moore, 2000)

Essas isoformas podem apresentar preferências por diferentes NLS, bem como diferentes padrões de expressão. Os níveis relativos de expressão de uma determinada isoforma da Imp α podem variar entre diferentes tecidos, indicando uma demanda especial de diferentes tipos proteínas específicas para importação em cada tecido (Kohler *et al.*, 1999), o que indica a importância da regulação do mecanismo de importação por essa proteína. Apesar de algumas proteínas se associarem especificamente apenas a uma isoforma da Imp α , outras são capazes de se ligar a diferentes isoformas (Jans *et al.*, 2000; Knudsen *et al.*, 2009).

1.3.2.1. SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS)

O primeiro passo para a importação nuclear ocorrer é quando a Imp α discrimina a proteína a ser transportada em relação às outras proteínas celulares. Proteínas destinadas ao núcleo contêm sequências de aminoácidos chamados de sinais ou sequências de localização nuclear (NLSs) (Lange *et al.*, 2007) que por si só são suficientes para designar uma proteína a ser importada para o núcleo (Dingwall *et al.*, 1982). Os sinais melhor caracterizados são denominados clássicos (cNLS), apresentando um ou mais grupos de aminoácidos básicos (Lange *et al.*, 2007), essencialmente lisinas e argininas (Christophe *et al.*, 2000) em que duas classes podem ser destacadas. As cNLS monopartidas requerem uma lisina na posição P2, seguida de resíduos básicos nas posições P3 e P5 para produzir uma sequência de consenso, até o presente momento, K/RKXR/K e exemplificada pela NLS do antígeno T do vírus símio 40 (SV40), ¹²⁶PKKKRRV¹³², (Lanford & Butel, 1984; Lanford *et al.*, 1986; Fanara *et al.*, 2000; Fontes *et al.*, 2003a; Fontes *et al.*, 2003b) e as cNLSs bipartidas, constituídas por dois conjuntos de aminoácidos básicos separados por 10-12 aminoácidos denominados região *linker* (Knudsen *et al.*, 2009), apresentando como consenso KRX₁₀₋₁₂KRXK e exemplificada pela NLS

da nucleoplasmina, ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰ (Dingwall & Laskey, 1991; Fanara *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2007).

As cNLSs ligam-se em uma conformação estendida, com a sua cadeia principal polipeptídica fazendo ligações de hidrogênio com uma série de asparaginas conservadas nas hélices H3 da Imp α . As cadeias laterais dos peptídeos presentes nesta sequência são inseridas numa série de bolsos formados por uma matriz de resíduos de triptofanos conservados que também se projetam na porção côncava formadas pelas hélices H3. Os triptofanos realizam interações hidrofóbicas com a parte alifáticas das cadeias laterais de lisina presentes na sequência cNLS. As cargas positivas das lisinas presentes na NLS interagem de maneira eletrostática com os resíduos ácidos presentes em torno do sítio de ligação (Conti *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2007) (Figura 8). Há duas regiões de ligação para as lisinas distribuídas na superfície de reconhecimento da Imp α (formando assim um sítio de ligação principal e um sítio de ligação secundário), explicando a distribuição dos resíduos positivos na cNLS. A distância entre esses dois sítios de ligação explica a exigência de uma distância de 10 a 12 resíduos em sinais bipartidos, o número mínimo necessário para alcançar a distância entre os dois locais em uma conformação estendida (Fontes *et al.*, 2003a). Contudo a presença de cargas positivas não pode ser considerada como completamente satisfatória para o reconhecimento de um NLS e definição de uma sequência consenso precisa. A presença de resíduos hidrofóbicos em posições específicas conforme verificado na NLS de *c-Myc* (Conti & Kuriyan, 2000), bem como resíduos que conferem maior mobilidade as NLS, parecem contribuir para o reconhecimento e afinidade das NLS (Chen *et al.*, 2005).

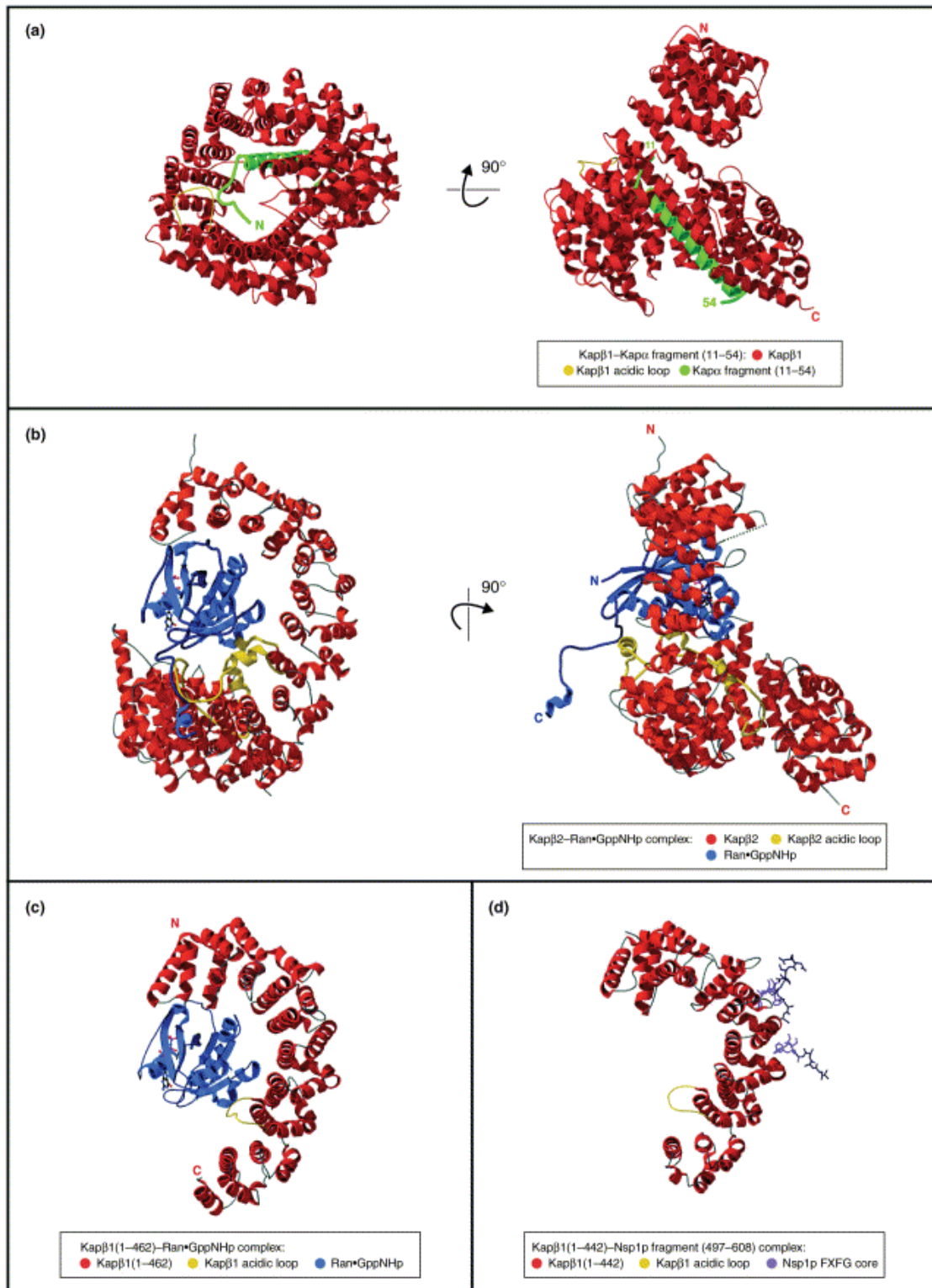
Além desses parâmetros, foi constatada que a ligação da Imp α para diferentes NLSs pode ser modulada pela fosforilação da proteína, (Jans *et al.*, 1991; Jans & Hubner, 1996) e pela interação com outras proteínas citoplasmáticas (Nadler *et al.*, 1997). O mecanismo de fosforilação então, pode acentuar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

1.3.3. IMPORTINA- β

A Importina- β (Imp β) é uma proteína de transporte bem estudada, também conhecida como Carioferina β 1 ou Kap95 em leveduras (Harel & Forbes, 2004; Cook *et al.*, 2007). Ela é constituída por 19 repetições de motivos HEAT, os quais são compostos por cerca de 40 resíduos, divididos entre duas hélices (A e B), unidas por um *short turn*. Essas repetições resultam em uma super-hélice (Chook & Blobel, 2001) que confere uma arquitetura global de super-hélices nessa classe de proteínas. A superfície interna côncava da super-hélice é formada pelas hélices B, enquanto as hélices A formam a superfície convexa (Andrade *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2007). A estrutura atômica da Imp β em seu estado nativo não é conhecida, mas por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (Fukuhara *et al.*, 2004) foi observado que sua super-hélice é bastante aberta, com dois arcos que assumem uma conformação em forma de “S”. Por convenção, estruturas de super-hélice destas proteínas são subdivididas em dois arcos em forma de “C” (Stewart, 2006), um arco N-terminal (HEATs 1-8) e um arco de C-terminal (HEAT 9-19) (Cook *et al.*, 2007).

Sua estrutura possui um alto grau de flexibilidade que permite que ela mude de conformação dependendo se estão na sua forma livre ou complexada (Conti *et al.*, 2006). Como exemplos, (Figura 9a) quando ligada ao domínio IBB da Imp α , a Imp β apresenta uma conformação enrolada como um caramujo, em que as extremidades N e C-terminal da proteína encontram-se próximas uma da outra (Cingolani *et al.*, 1999). Nessa estrutura foi possível observar a interação do domínio IBB com resíduos dos motivos HEAT localizados na porção côncava, no arco C-terminal da Imp β (Cingolani *et al.*, 1999; Stewart, 2006; Cook *et al.*, 2007). Uma pequena parte do domínio IBB fica numa conformação estendida e se liga na repetição HEAT 8, que contém vários resíduos ácidos conservados, conhecido como o loop ácido (Cingolani *et al.*, 1999; Stewart, 2006; Cook *et al.*, 2007). Por sua vez, no complexo Imp β :RanGTP (Figura 9b e c) é visível o distanciamento entre as extremidades N- e C-terminal da Imp β . A interação com a proteína Ran ocorre na superfície côncava da Imp β , porém no arco N-terminal (HEATS 4-7) (Chook & Blobel, 1999). Já a estrutura cristalográfica do complexo com as repetições FXFG, presentes nas nucleoporinas, (Figura 9c) mostrou a ligação entre essas sequências e a superfície convexa da Imp β (HEATS 5-6). Essa interação pode promover a alteração de conformação da Imp β que possibilite a liberação do complexo Imp β -RanGTP

(Bayliss *et al.*, 2000).



Current Opinion in Structural Biology

Figura 9 - Representação em diagrama de fitas de estruturas cristalográficas de complexos com a Imp β (vermelho). a) Complexo com o domínio IBB (verde); b) e c) Complexo com a RanGTP (azul); d) complexo com domínios FXFG de nucleoporinas FG (Chook & Blobel, 2001).

1.4. IMPORTAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO REPARO DE DNA

A estabilidade e integridade do material genético são fundamentais para manutenção e continuação da vida. O genoma humano é composto por três bilhões de pares de bases, os quais codificam entre 30.000 – 40.000 genes, e é constantemente atacado por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas e uma infinidade de agentes mutagênicos ambientais que afetam sua integridade. Assim, é evidente que a estabilidade do genoma deve estar sob vigilância contínua. Isso é conseguido através de mecanismos de reparo de DNA, que evoluíram para remover ou tolerar lesões e erros no DNA. Caso não sejam corrigidas, essas alterações podem levar a mutações, deletérias ou não, e até mesmo à morte celular. Em humanos 130 genes foram identificados que estão associados com o reparo do DNA (Christmann *et al.*, 2003). Os mecanismos de reparo de DNA desenvolvidos pelos organismos capazes de corrigir modificações efetuadas no DNA e, com isso, manter uma maior estabilidade do material genético são: i) reparo por excisão de bases (BER), ii) excisão de nucleotídeos (NER), iii) mal-pareamento de bases (MMR) (Knudsen *et al.*, 2009) e iv) reparo de DNA por junção de terminais não homólogos (NHEJ) (Christmann *et al.*, 2003). Para o que os mecanismos de reparo funcionem de maneira adequada, fica clara a importância da interação entre proteínas responsáveis pela função de reparo, bem como é essencial a regulação da importação nuclear para localização correta das proteínas responsáveis pelos mecanismos mencionados.

O reparo por excisão de pares de base (BER) corrige as modificações de base no DNA decorrentes de fatores endógenos e exógenos, tais como oxidação por espécies reativas de oxigênio, desaminação espontânea e modificação por agentes alquilantes (Fan & Wilson, 2005; Knudsen *et al.*, 2009). Essa via de reparo é composta por duas grandes sub vias que se distinguem pelo número de nucleotídeos substituídos e as enzimas envolvidas: i) sub-via curta (*short-path*, SN-BER); ii) sub-via longa (*long-patch*, LP-BER) (Asagoshi *et al.*, 2011). Já o sistema NER detecta uma grande diversidade de lesões no DNA e é a principal defesa contra danos ao DNA induzidos por radiação UV ou produtos químicos eletrofílicos (Costa *et al.*, 2003; Knudsen *et al.*, 2009). Tem sido descrito por duas vias distintas, reparo de transcrição acoplado (TCR) e de reparo do genoma global (GGR)

(Christmann *et al.*, 2003; Knudsen *et al.*, 2009). Erros da DNA polimerase, como de pareamento base-base no DNA e inserção/deleção de loops (IDL) são corrigidos pela via MMR é um sistema de reparo pós-replicação de DNA (Modrich, 2006; Li, 2008). Por fim, o reparo de DNA por junção de terminais não homólogos (NHEJ) atua nas quebras da dupla-fita DNA (DSBs – DNA double-strand breaks), pois são altamente potentes indutores de efeitos genotóxicos (trocas e quebras cromossômicas) e morte celular (Dikomey *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 2000; Lips & Kaina, 2001). Em eucariotos superiores uma simples DSB não corrigida inativa um gene essencial, que pode ser suficiente para induzir a morte celular por apoptose (Rich *et al.*, 2000).

Dentre os mecanismos responsáveis pela regulação da importação nuclear, a via clássica, constituída pelo heterodímero Importina- α/β , é um dos principais mecanismos de deslocamento. Algumas proteínas de reparo parecem interagir somente com algumas isoformas da Imp α , indicando uma regulação adicional do processo de reparo (Knudsen *et al.*, 2009), porém pouco se sabe a respeito do reconhecimento das sequências de localização nuclear (NLS) dessas macromoléculas. Proteínas envolvidas em reparo e que não apresentam cNLS podem formar complexos no citoplasma e depois serem transportados através do NPC juntos, um mecanismo conhecido como co-importação nuclear. Esse mecanismo de importação, possivelmente reflete um sistema onde proteínas cariofílicas podem aumentar a sua localização nuclear após a formação do complexo, ao invés de serem individualmente concorrentes para a interação com receptores de importação nuclear (Liu *et al.*, 2000; Knudsen *et al.*, 2009).

A formação de complexos entre as proteínas no citoplasma parece ter um grande efeito sobre sua localização nuclear, no entanto, não está claro se essa é mecanismo de reserva/emergência ou se é essencial para a regulação de importação *in vivo*. No entanto, ele garante que a estequiometria dos complexos de reparo nuclear seja sustentável. Conforme descrito, algumas proteínas de reparo parecem confiar na sequência cNLS de um parceiro obrigatório para a importação nuclear *in vivo*, mas parece também que através da co-importação, proteínas de reparo sem NLS podem ser translocadas para o núcleo (Knudsen *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2009). Proteínas que não são importadas através da via clássica de importação nuclear ou não parecem ser importadas através de formação de complexos, devem ser importadas por meio de mecanismos de translocação

alternativos (Figura 1C) (Knudsen *et al.*, 2009). O termo via de importação alternativo também pode ser aplicado para as proteínas que normalmente seguem uma ou ambas rotas já descritas, mas que ainda parecem acumular-se no núcleo sobre a inibição da sua rota preferencial de importação.

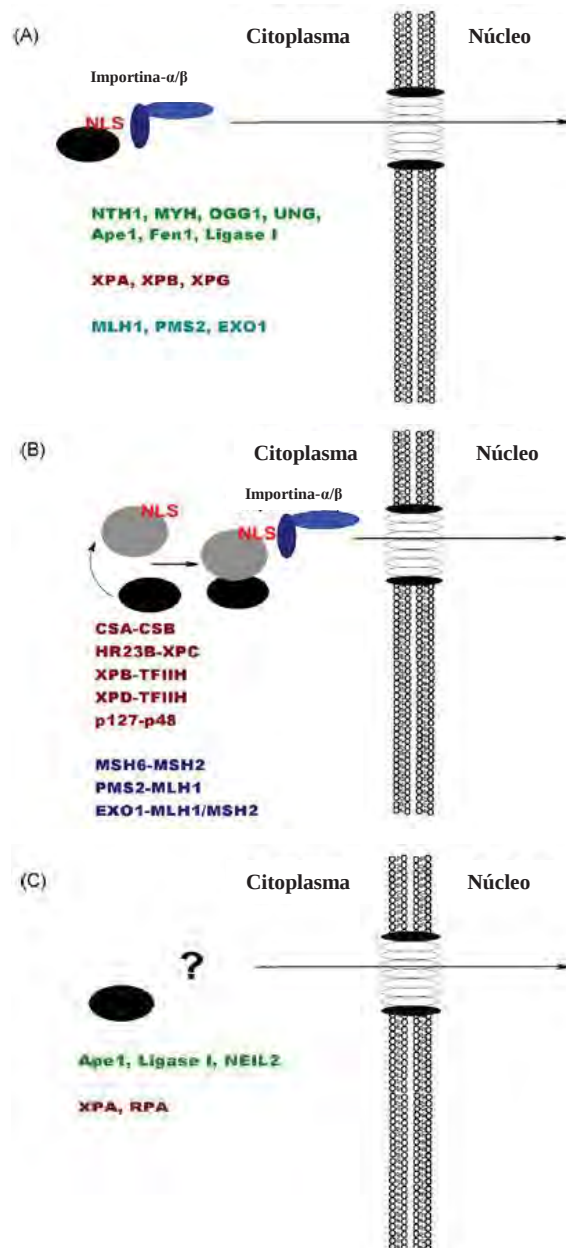


Figura 10 - (A) Via clássica de importação nuclear; (B) Via clássica de importação nuclear com co-importação - formação de um complexo de proteínas no citoplasma com uma proteína de reparo e outra que contém uma sequência cNLS; e (C) os mecanismos alternativos de importação. Muitas proteínas de reparo essenciais podem ser importadas por mais de um mecanismo. Os mecanismos de importação são ilustrados por algumas proteínas envolvidas na BER (verde), NER (vermelho) e MMR (azul) (Knudsen *et al.*, 2009).

1.4.1. SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE PROTEÍNAS DE REPARO DE DNA

1.4.1.1. Ku70 e Ku80

O heterodímero Ku é um importante componente do sistema de reparo de DNA em eucariotos, envolvido em vários processos nucleares, com um papel fundamental no reparo de DNA devido a sua capacidade de ligar-se na quebra da dupla fita de DNA, facilitando assim, o reparo de DNA por junção de terminais não homólogos (Ochi *et al.*; Downs & Jackson, 2004). Outras funções estão relacionadas ao cromossomo e manutenção dos telômeros (Bailey *et al.*, 1999), a regulação da transcrição de genes específicos (Giffin *et al.*, 1996) e proteção de neurônios em desenvolvimento contra a apoptose (Gu *et al.*, 2000). As proteínas Ku70 e Ku80 compõem esse heterodímero e são responsáveis por manter a dupla fita de DNA unida, permitindo a atuação de outras enzimas no processo de reparo. A estrutura cristalográfica do heterodímero Ku foi elucidada sozinha e ligada à DNA (Walker *et al.*, 2001). A Ku70 e a Ku80 possuem uma topologia comum e o complexo Ku forma uma estrutura assimétrica de anel que envolve o DNA. O canal que é formado pelo anel do complexo Ku interage com a cadeia principal do DNA pela interação com o açúcar-fosfato de sua sequência (Walker *et al.*, 2001). Ambas as subunidades do complexo Ku na estrutura cristalográfica possuem os domínios C-terminais truncados ou não modelados devido à fraca densidade eletrônica. Posteriormente os domínios C-terminal de Ku70 e Ku80 foram elucidadas de forma independente por técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

Muitos processos funcionais da Ku ocorrem no núcleo celular e por isso, é importante estudar como o transporte citoplasma-núcleo ocorre. Alguns estudos sugerem a formação do complexo Ku como condição fundamental para entrada do heterodímero no núcleo para atividades de reparo, porém a translocação de cada subunidade para o núcleo via Imp α separadamente, indica também a presença de atividades independentes ao reparo de DNA (Bertinato *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2001). Sequências de localização nuclear (NLSs) foram identificadas tanto na Ku70, como na Ku80, que lhes permitem ser translocadas para o núcleo independentemente uma da outra usando suas próprias NLSs, mediadas pelo heterodímero importina- α/β através da via clássica de importação nuclear (Koike *et*

al., 1999b; Koike *et al.*, 1999a; Bertinato *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2001), porém pouco se sabe a respeito do processo de importação nuclear desses componentes. Ambas as proteínas Ku70 e Ku80 apresentam sequências de localização nuclear, em que a NLS presente na Ku80 (aminoácidos 561-569) foi proposta como uma sequência clássica NLS monopartida, similar ao NLS do antígeno T do vírus símio 40 (SV40) e a NLS presente na Ku70 (aminoácidos 539-556) foi identificada como possível NLS bipartida, semelhante às NLSs presentes na nucleoplasmina e N₁N₂, embora toda sua extensão seja essencial para o processo de importação nuclear pela Imp α (Koike *et al.*, 2001). Posteriormente, o complexo Imp α e o peptídeo NLS da Ku 70 foi cristalizado e a estrutura elucidada, comprovando que a o peptídeo da Ku70 não corresponde a um NLS bipartido, apresentando uma conformação monopartida, similar ao peptídeo NLS do antígeno T do vírus símio 40 fosforilado (SV40P) (Takeda, 2009).

1.4.1.2. Endonuclease-1 Flap (FEN1)

A fidelidade da replicação do DNA, recombinação e reparo é essencial para manter a estabilidade do genoma, e todos esses processos dependem de exonucleases 5'-3', que ocorrem em todos os organismos. Para o reparo do DNA, essas enzimas são necessárias para a excisão do fragmento danificado e correção de incompatibilidade recombinacional. A endonuclease-1 Flap (FEN-1) é uma nuclease multifuncional, componente central e crítico, tanto para a replicação como para a via de reparo do DNA. Reconhece e processa a fita simples 5' do DNA, deslocada pelos mecanismos de replicação e reparo associadas com a polimerase (Gloor *et al.*, 2011). Essa proteína participa de seis vias metabólicas do DNA, i) maturação do fragmento de Okazaki; ii) resgate da forquilha de replicação paralisada; iii) manutenção dos telômeros; iv) via de reparo por excisão de base (BER); v) remoção da proteína chamada de grampos deslizantes; vi) fragmentação do DNA apoptótico (Zheng *et al.*, 2011) (Figura11).

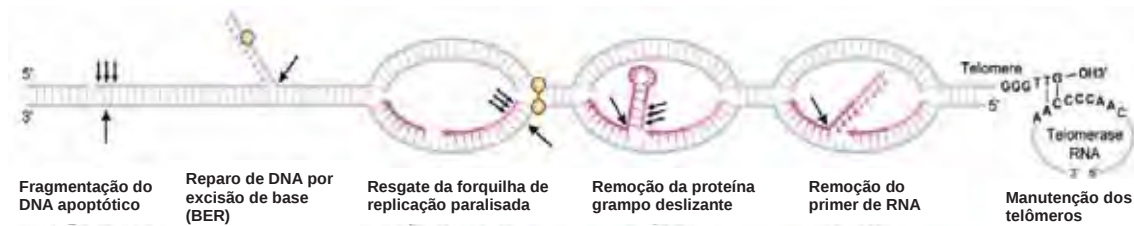


Figura 11 - Vias metabólicas do DNA e das atividades bioquímicas correspondentes a FEN1 (Zheng *et al.*, 2011).

A atividade da FEN1 é essencial na clivagem da fita simples de DNA resultante da síntese de DNA, durante o deslocamento e remoção do primer de RNA nos fragmentos de Okazaki e na atuação na sub-via longa de reparo (LP-BER) (Hosfield *et al.*, 1998), porém o seu papel em células vivas de vertebrados não foi totalmente explorado. Estudos com clonagem celular em vertebrados superiores comprovaram que o silenciamento do gene FEN1 em células de linhagem DT40, apresentaram hipersensibilidade ao H_2O_2 . Esse oxidante produz lesões genotóxicas que são corrigidos pela BER, o que sugere que as células têm uma deficiência na BER afetando sua sobrevivência. Nestas células também a atividade long-patch-BER de FEN1 foi deficiente, enquanto o reparo pela sub via de nucleotídeo único-BER foi normal (Asagoshi *et al.*, 2011).

Sua estrutura complexada a DNA foi elucidada recentemente, indicando motivos conservados na estrutura que ligam-se e abrem a dupla fita de DNA, possibilitando o reparo (Tsutakawa *et al.*, 2011), entretanto o C-terminal onde é encontrada uma NLS, foi truncado. A presença dessa NLS possibilita sua localização nuclear durante a fase S do ciclo celular e como resposta ao dano de DNA. Mutações sítio dirigidas de sua NLS indicaram alterações no processo de importação nuclear, e devido a sua extensão foi sugerido que sua NLS fosse bipartida (Frank *et al.*, 2001) (Tabela 1).

1.4.1.3. MLH1 e PMS2

Durante o processo de replicação do DNA, alguns erros podem escapar da verificação feita pela DNA polimerase. Erros de pareamento, bem como inserções e deleções nas novas fitas de DNA podem ser corrigidos, mesmo que a DNA polimerase não os tenha detectado. Em humanos o complexo MutL α , um heterodímero formado pela interação das proteínas MLH1 e PMS2, atua coordenando o processo de reparo de mal-pareamento de bases (MMR) gerado por

erros de replicação, sendo essencial para a manutenção da fidelidade de replicação do DNA (Brieger *et al.*, 2005; Leong *et al.*, 2009). Sua função é identificar a inadequação, bem como inserção/deleção de *loops* na fitas de DNA recém sintetizada. Embora os participantes diferentes do reparo de DNA por MMR em humanos tenham sido identificados, a regulação dos passos essenciais do reparo por MMR não é totalmente compreendido. A importação nuclear dessas proteínas pode ser um mecanismo de regulação para esse tipo de reparo de DNA (Wu *et al.*, 2003; Brieger *et al.*, 2005).

Assim como outras proteínas envolvidas em reparo, as estruturas da PMS2 e MLH1 foram parcialmente elucidadas (Guarne *et al.*, 2001; Dombrowski *et al.*, 2011). Foi demonstrado que ambas as proteínas apresentam NLS monopartidas essenciais para seu deslocamento para o núcleo (Tabela 1), presentes no C-terminal não elucidado dessas proteínas. A proteína MLH1 contém dois conjuntos de aminoácidos carregados positivamente, que são sequências candidatas para NLS (aa 469-472 e 496-499), enquanto PMS2 contém um (aa 574-580) (Brieger *et al.*, 2005). Mutações em seus NLS indicam alterações tanto na translocação das subunidades quanto na dimerização no núcleo. Apesar de dimerização não ser necessária para a formação da NLS, estudos comprovam que o heterodímero MutL α é importado de forma mais eficiente do que os monômeros MLH1 e PMS2 (Leong *et al.*, 2009). Há indícios de que o transporte na forma de complexo otimiza o processo de importação (Brieger *et al.*, 2005). Outros estudos ainda apresentam a idéia de que a dimerização do MLH1 e PMS2 regula a importação do complexo MutL α , o que pode assim representar um novo mecanismo pelo qual as células ativem suas funções no reparo de erros durante a replicação do DNA (Wu *et al.*, 2003).

Tabela 1 - NLS de proteínas relacionadas a processos de reparo de DNA.

Proteína	NLS
Ku70	⁵³⁷ EGKVTKRKHDNEGSGSKRPKVE ⁵⁵⁸
Ku80	³⁷⁵ EDGPTAKKLKTEQ ⁴⁸⁵
FEN1	³⁵¹ SSAKRKEPEPKGSTKKKAKT ³⁷²
MLH1	⁴⁶⁶ SSNPRKRHRED ⁴⁷⁶
PMS2	⁴⁷¹ LATPNTKRFKKEE ⁵⁸³

2.OBJETIVO

Estudar por técnicas de cristalografia de proteínas complexos Imp α de *Mus Musculus*, truncada na sua região N-terminal, com peptídeos NLSs de proteínas relacionadas ao reparo de DNA, dentre os quais as sequências NLS MLH1, PMS2, Ku80 e FEN1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma da Figura 12 mostra de maneira simplificada as etapas para a resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X (Drenth, 1994).

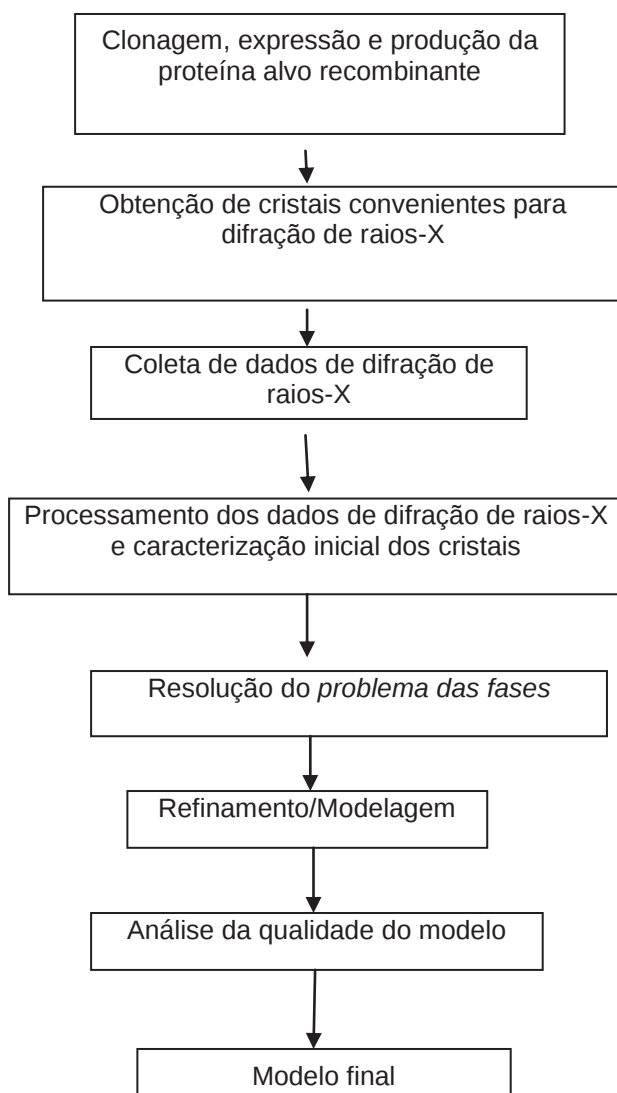


Figura 12 - Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada.

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

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

Para expressão em larga escala, bactérias foram inoculadas em 40 mL meio LB (Luria Bertani) líquido, contendo os agentes de seleção, canamicina ($1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e em seguida incubadas com agitação constante por 15 horas a temperatura de 37°C . Posteriormente, cerca de 20 mL desse pré-inóculo foi transferido para 2,0 L de LB contendo $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e $1,0 \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol e as bactérias cresceram sob agitação constante à temperatura de 37°C por aproximadamente 3 horas e/ou até atingir Abs 600 de 0,6.

Alcançado o valor de absorbância, uma alíquota de 1,5 mL desse meio de cultura foi retirado para controle da indução e ao restante foi adicionado 20,0 mL de IPTG 100 mMol.L^{-1} (Isopropyl-B-D-Galactoside), levando a indução da expressão da proteína de interesse, com agitação constante a 28°C . Após 4 horas de indução, as bactérias foram separadas do meio por centrifugação a $4788\times g$ por 10 minutos à temperatura de 4°C e em seguida, ressuspensas em 100 mL de tampão (20 mMol.L^{-1} Hepes pH7,0 e 500 mMol.L^{-1} NaCl) e centrifugado novamente. A indução foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com uma concentração de 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para a lise das bactérias, essas foram ressuspensas em 100 mL de tampão (20 mMol.L^{-1} Hepes pH7,0, 500 mMol.L^{-1} NaCl, 1 mMol.L^{-1} MgCl_2 e 5 mMol.L^{-1} Imidazol) contendo inibidores de proteases ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Aprotinina, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Leupeptina, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Pepstatina, 1 mM PMSF e $0,1 \text{ mM}$ TCEP), lisozima (1 mg.mL^{-1}) além de DNase e RNase. Com auxílio do vórtex, a amostra foi homogeneizada a cada 10 minutos e mantida no gelo por uma hora. Após o rompimento celular pela atuação da lisozima, o extrato total das bactérias foi submetido à centrifugação a $4788\times g$ por 30 minutos a temperatura de 4°C . A parte solúvel foi coletada,

esperando-se que parte da proteína recombinante induzida estivesse solúvel, possibilitando a continuidade dos experimentos. A solubilidade da proteína foi observada por eletroforese em gel de poliacrilamida com uma concentração de 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

3.2. PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Para a purificação da proteína recombinante por cromatografia, duas metodologias foram testadas e comparadas. Para a primeira metodologia, o extrato solúvel de *E.coli* contendo a proteína recombinante (Imp α) foi purificado em duas etapas. Na primeira etapa o extrato foi aplicado em coluna de afinidade HisTrapTMHP (GE Healthcare), contendo 5,0 mL de resina de Níquel-agarose, a qual foi acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) e submetida a fluxo contínuo de 1,0 mL.min⁻¹ de solução tampão A (20 mMol.L⁻¹ Hepes pH7,0, 1,0 Mol.L⁻¹ NaCl e 15 mMol.L⁻¹ imidazol). Posteriormente a amostra foi aplicada com fluxo 0,5 mL.min⁻¹ e pressão controlada, não ultrapassando 0,3 MPa. A coluna foi lavada com tampão A para remover o material que tivesse ligado inespecificamente à coluna. Após a passagem de tampão A, o mesmo foi substituído pelo tampão B (20 mMol.L⁻¹ Hepes pH7,0, 1,0 Mol.L⁻¹ NaCl e 150 mMol.L⁻¹ imidazol) contendo uma maior concentração de imidazol para eluir a proteína recombinante, a qual contém a cauda de histidina que ficou ligada na resina de Níquel. O imidazol compete com as histidinas pela interação com o níquel, promovendo assim, o desprendimento da proteína com a resina, permitindo a coleta da amostra purificada. Purificação por afinidade foi observada por eletroforese (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com uma concentração de 12%.

A amostra purificada após ser eluída da coluna foi submetida à diálise utilizando a membrana *dialysis tubing* (Sigma) para proteínas de massa molecular superiores a 12.000 Da para a troca de tampão B para o tampão C (20 mMol.L⁻¹ Tris HCl pH8,0 e 100 mMol.L⁻¹ NaCl). Para a otimização da purificação, uma segunda etapa foi realizada em coluna de troca iônica Resource Q de 1,0 mL (GE Healthcare), a qual foi acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) e submetida a fluxo contínuo de 1,0 mL.min⁻¹ de solução tampão C (20 mMol.L⁻¹ Tris HCl pH8,0 e 100 mMol.L⁻¹ NaCl) para equilibrar a coluna. Posteriormente a

amostra foi aplicada a coluna catiônica com fluxo e pressão controlados ($0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $1,5 \text{ MPa}$). A coluna foi lavada com tampão C para remover as moléculas que não interagiram com as cargas da resina. Após a passagem de tampão C, o mesmo foi substituído em gradiente de $100 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ até $2,0 \text{ Mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl pelo tampão D ($20 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl pH8,0 e $2,0 \text{ Mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl). Dessa maneira, a proteína Imp α foi separada das impurezas com o mínimo de sal possível. A purificação por troca iônica foi comprovada por eletroforese (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%.

A amostra purificada foi submetida à diálise utilizando a membrana *dialysis tubing* (Sigma) para proteínas de PM 12.000 Da para cima, para a troca de tampão D para o tampão E ($20 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl pH8,0, $100 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl e $2,0 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (DL-Dithiothreitol)), para diminuir a concentração salina na amostra de Imp α , o que poderia interferir em futuras cristalizações. Posteriormente a amostra foi concentrada até $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, utilizando o centricon-30 (Millipore) e a centrífuga com rotação de 4000xg por 15 minutos, e essa amostra foi armazenada a temperatura de -20°C .

Para a segunda metodologia testada, o extrato solúvel de *E.coli* contendo a proteína recombinante (Imp α) foi purificado somente em uma etapa, utilizando a coluna de afinidade HisTrapTMHP (GE Healthcare), contendo $5,0 \text{ mL}$ de resina de Níquel-agarose, a qual foi acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) e submetida a fluxo contínuo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de solução tampão A. Posteriormente a amostra foi aplicada com fluxo $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e pressão controlada, não ultrapassando $0,3 \text{ MPa}$. A coluna foi lavada com tampão A para remover o material que tenha se ligado inespecificamente a coluna. Posteriormente foi realizada a eluição da amostra por meio de gradiente de $15 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ até $150 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ de imidazol pelo tampão B. Purificação por afinidade foi observada por eletroforese (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com uma concentração de 12%.

A amostra purificada foi submetida à diálise utilizando a membrana *dialysis tubing* (Sigma) para proteínas de PM 12.000Da para cima, para a troca de tampão B para o tampão E ($20 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl pH8,0, $100 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl e $2,0 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (DL-Dithiothreitol)). Posteriormente a proteína foi concentrada até $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, utilizando o centricon-30 (Millipore) e a centrífuga com rotação de 4000xg por 15 minutos, e essa amostra foi armazenada a temperatura de -20°C .

3.3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS NLS

A síntese dos peptídeos, correspondentes a NLS de proteínas que participam de vias de reparo de DNA, foi solicitada para garantir pureza dos mesmos. Os peptídeos Ku80, FEN1, PMS2, MLH1 foram sintetizados pela empresa Proteimax, com pureza de 99% (Tabela 1). Para a síntese dos peptídeos, foram adicionados resíduos às extremidades dos NLSs, para garantir melhor interação com a Imp α , uma vez que a extremidades costumam apresentar maior grau de mobilidade, observando-se menor ocupação.

3.4. CRISTALIZAÇÃO

De maneira a testar a Imp α purificada em nosso laboratório, foram realizados experimentos de cristalização com a Imp α nativa empregando-se a técnica de difusão de vapor por gota suspensa (*hanging drop*) (Mcpherson, 1989) tendo como ponto de partida as condições de cristalização da Imp α nativa (Kobe, 1999). Constatada a viabilidade da amostra, experimentos de co-cristalização com peptídeos NLS foram realizados com base na variação de parâmetros de cristalização os quais resultaram em estruturas com presença de peptídeos NLS (Fontes *et al.*, 2000; Fontes *et al.*, 2003a; Fontes *et al.*, 2003b).

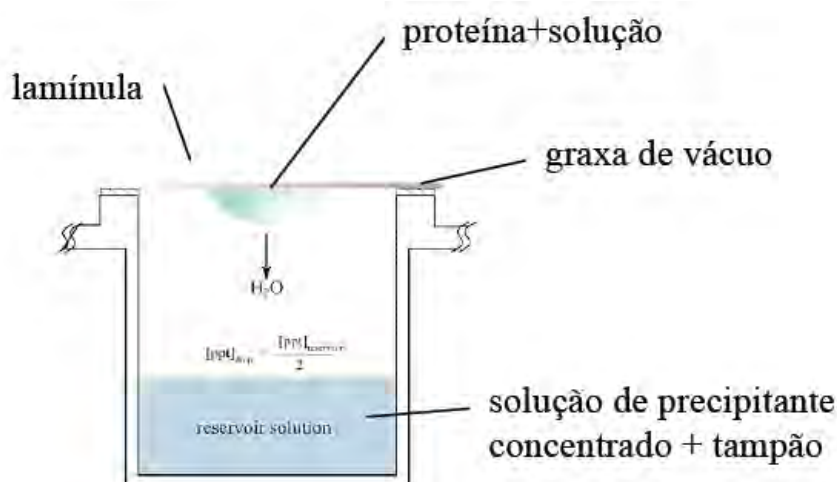


Figura 13 - Método para cristalização: *hanging drop* (gota suspensa). Imagem obtida do catálogo da empresa Hampton Research.

Para a obtenção de cristais dos peptídeos FEN1, Ku80, PMS2 e MLH1 a gota foi constituída por 1,0 μ l da solução da proteína recombinante, 0,5 μ l da solução

do peptídeo, na qual a proporção calculada foi de 8 moléculas de ligante, no caso, os peptídeos para 1 de proteína recombinante, Imp α , e mais 0,5 μ l da solução do reservatório contendo 0,5 mL da solução de citrato de sódio como agente precipitante com variações de 0,5 Mol.L⁻¹ a 0,75 Mol.L⁻¹; 0,1 mMol.L⁻¹ de citrato de sódio pH6,0 como tampão e 10 mMol.L⁻¹ de DTT (DL-Dithiothreitol) como aditivo.

3.5. COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO

Conjuntos de dados de difração de raios X dos complexos Imp α com os peptídeos FEN1, Ku80, MLH1 e PMS2 foram coletados no laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas), com comprimentos de onda de 1,46 Å para a FEN1, coletado na MX2 e λ =1,43 Å para os demais peptídeos, coletados na MX1 (L. Sanfelici & F. De Mattos; Polikarpov *et al.*, 1997; Polikarpov *et al.*, 1998; Guimaraes *et al.*, 2009), montados em loops de nylon e mantidos em fluxo de nitrogênio gasoso a 100K (Oxford Cryosystems®).

Em todos os experimentos houve a necessidade de crioprotetor, nesse caso, glicerol com concentração de 25% (v/v) às condições da solução-mãe, para evitar perda do cristal por causa do congelamento na presença de água.

Imagens foram coletadas utilizando os detectores CCD (MarResearch) para MX1 e MarMosaic 225 CCD para MX2. Os programas DENZO e SCALEPACK do pacote HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) foram utilizados para o processamento dos dados coletados.

3.6. ELUCIDAÇÃO E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

A obtenção da estrutura tridimensional de uma proteína pode ser realizada utilizando-se as intensidades coletadas por difração de raios X as quais podem ser obtidas por diversas metodologias. Em estruturas com alta homologia sequencial pode-se utilizar o método da substituição molecular (Mcree, 1993). Ainda, no caso da obtenção de cristais de complexos isomorfos com o nativo, a estrutura pode ser resolvida simplesmente por síntese de Fourier (Mcree, 1993). Cristais de complexos formados pela Imp α podem ser resolvidos dessa maneira (Fontes *et al.*, 2005).

Os modelos gerados foram submetidos a um refinamento de corpo rígido, utilizando-se as coordenadas de uma das estruturas de Impα elucidadas anteriormente (código no banco de dados *protein data bank* 1Q1S). A seguir, foram efetuados refinamentos de posição de átomos e fatores de temperatura com o uso do programa *Refmac 5* (Murshudov *et al.*, 1997). Ao gerar mapas de densidade eletrônica, os modelos proteicos foram visualizados e modelados com o programa *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004). Na modelagem, foi efetuado o ajuste manual dos resíduos em relação ao mapa densidade eletrônica (calculado a partir das informações de intensidades e fases das reflexões de difração de raios X). Essas informações (experimentais) e outras informações estruturais como, distâncias de ligações, ângulos, interações com os átomos da vizinhança são utilizados em um programa que minimiza todas estas energias, tal como o *Refmac 5* (Murshudov *et al.*, 1997), presente no pacote *CCP4i* (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994; Potterton *et al.*, 2003).

Os modelos foram refinados até a máxima concordância entre os dados experimentais e a estereoquímica da molécula. Esse processo ocorre de maneira alternada com a modelagem, com adição de moléculas de água e também ligantes, até que se chegue à estrutura final. A qualidade estereoquímica dos modelos obtidos foram verificadas utilizando-se o programa *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1996).

As etapas descritas neste item, foram realizadas somente com os complexos da Impα com os peptídeos NLSs Ku80 e FEN1.

4. RESULTADOS

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

A partir dos clones armazenados a -80°C , experimentos de indução em larga escala foram efetuados para obtenção de amostras em quantidade e qualidade suficientes para os procedimentos seguintes. Conforme esperado, constatou-se a indução da proteína recombinante (Figura 14). Além disso, após lise celular, verificou-se Imp α presente tanto na fração solúvel (sobrenadante) quanto insolúvel (pellet) (Figura 15), confirmando a presença de Imp α em quantidade suficiente para purificação e cristalização. Apenas a fração solúvel do extrato total foi utilizada na purificação para garantir que a Imp α presente na amostra, apresentasse integridade estrutural, fator essencial para sucesso na obtenção de dados cristalográficos.

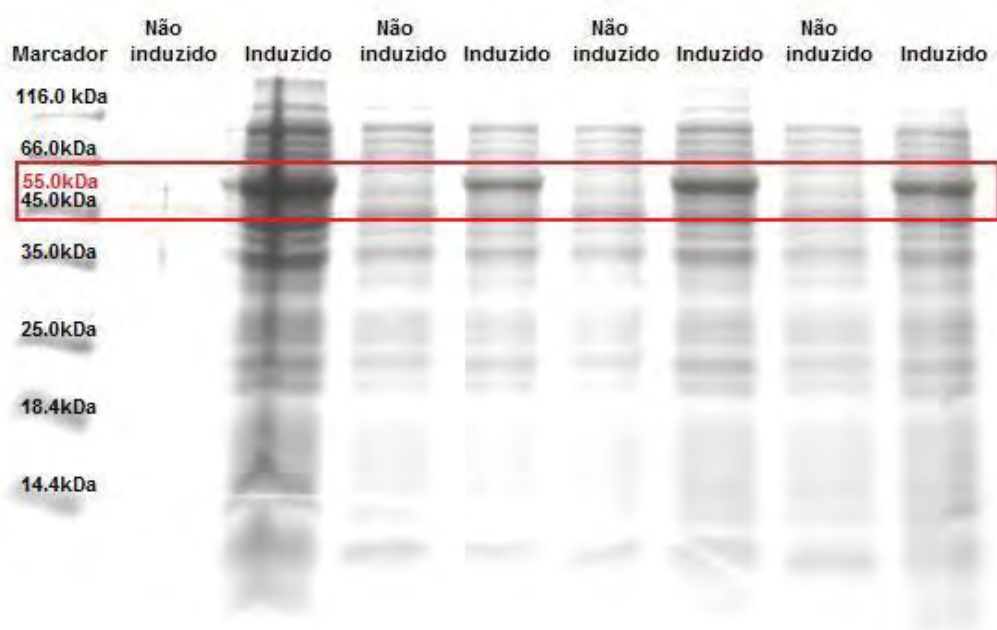


Figura 14 - Verificação da indução da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE).

4.2. PURIFICAÇÃO DA IMPORTINA- α TRUNCADA (70-529) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Para a purificação da proteína recombinante por cromatografia, duas metodologias foram testadas e comparadas. Para a primeira metodologia utilizada, a purificação em coluna de afinidade separou a Imp α da maioria das proteínas presentes na fração solúvel do extrato total de *E.coli*. Devido à quantidade de impurezas restantes (Figura 15), optou-se por realizar a purificação por troca-iônica como segunda etapa de purificação. Portanto, após a purificação por afinidade em coluna de níquel, a amostra de Imp α passou por uma diálise em tampão C (20 mMol.L⁻¹ Tris HCl pH8,0 e 100 mMol.L⁻¹ NaCl), condição em que a proteína fica mais estável, seguida da purificação por troca-iônica, na qual a concentração de NaCl foi mantida constante a medida que a leitura da luz UV a 280 nm indicava desprendimento de material da coluna com o intuito de obter a Imp α pura e remover proteínas que pudessem interferir nos experimentos de co-cristalização. Frações de ambas as purificações foram analisadas em SDS-PAGE a 12% para verificar a pureza das mesmas conforme figuras 15 e 16. A figura 15 mostra que a etapa de purificação 1 não foi suficiente para deixar a amostra de Imp α pura, mas que após a segunda etapa, purificação 2, a amostra de importina ficou com um grau elevado de pureza. Alíquotas retiradas durante a purificação por troca-iônica (Figura 16) mostraram que algumas frações ainda não possuíam a pureza desejada, sendo as mesmas descartadas. Após a purificação 2, a amostra passou por uma nova etapa de diálise em tampão Tris HCl pH8,0, 100 mMol.L⁻¹ NaCl, 100 mMol.L⁻¹ DTT (DL-Dithiothreitol), para viabilizar a condição das amostras para futuras cristalizações.

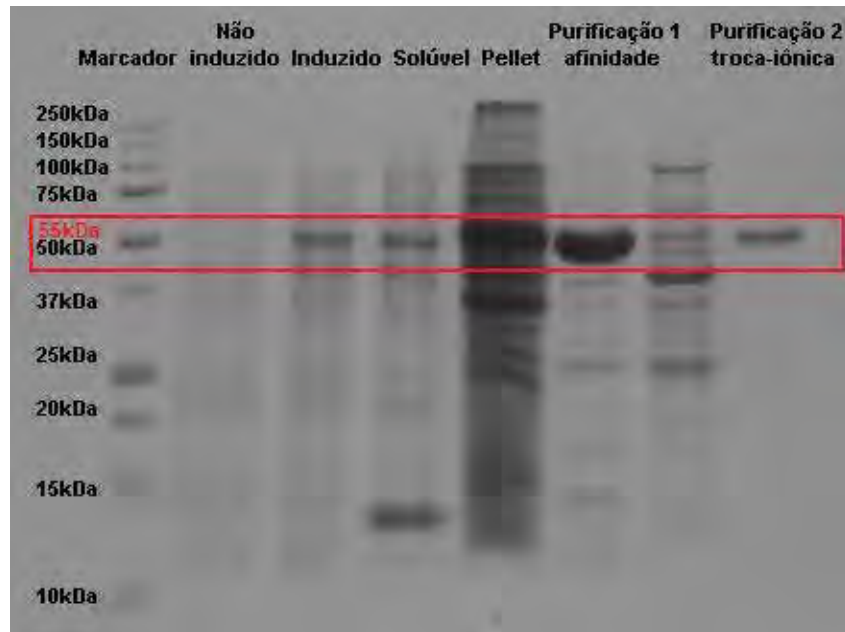


Figura 15 - Confirmação das etapas realizada de expressão e purificação em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE).

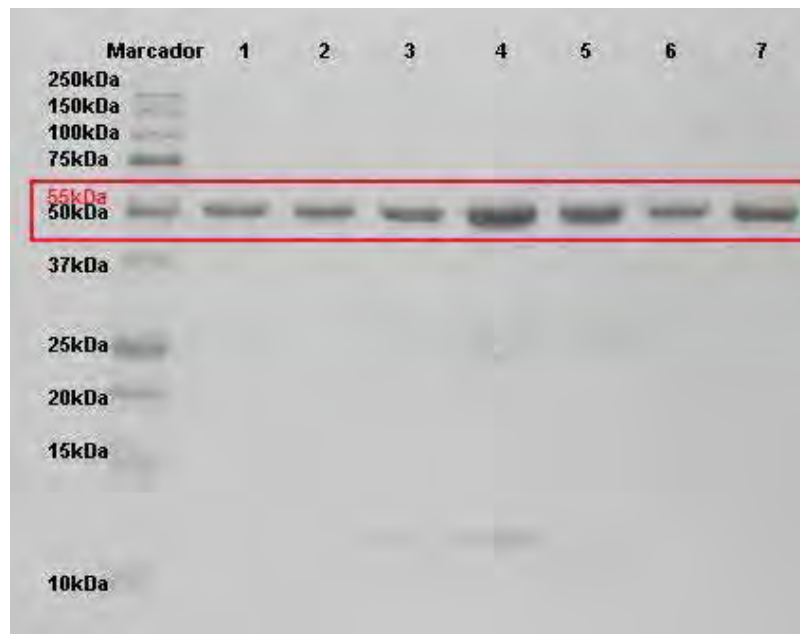


Figura 16 - Verificação da purificação por troca-iônica da Imp α em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Onde os números de 1-7 correspondem a alíquotas retiradas durante eluição.

Para a segunda metodologia empregada, a purificação em coluna de afinidade separou a Imp α de todas as outras proteínas presentes na fração solúvel do extrato total de *E.coli* através da realização de um gradiente de imidazol de 15 a 150 mMol.L⁻¹. Nessa purificação, a concentração de imidazol foi mantida constante à medida que a leitura da luz UV a 280 nm indicava desprendimento de material da

coluna com o intuito de eluir a Impα pura e remover proteínas que pudessem interferir nos experimentos de co-cristalização.

Após a purificação por afinidade, em coluna de níquel, a amostra de Impα passou por uma diálise em tampão Tris HCl pH8,0, 100 mMol.L⁻¹ NaCl, 100 mMol.L⁻¹ DTT (DL-Dithiothreitol), para viabilizar a condição da amostras para futuras cristalizações. Frações da purificação foram analisadas em SDS-PAGE a 12% para verificar a pureza das mesmas. A figura 17 mostra que esta etapa de purificação foi suficiente para deixar a amostra de Impα pura, de acordo com as alíquotas retiradas durante a eluição.

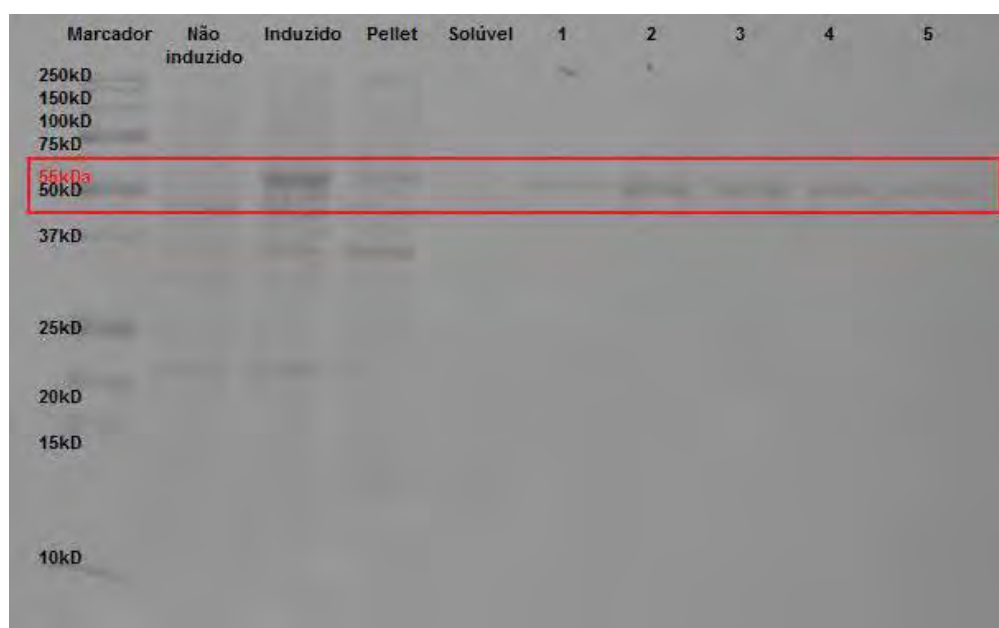


Figura 17 - Verificação da purificação por afinidade da Impα em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Onde os números de 1-5 correspondem a alíquotas retiradas durante eluição.

As duas metodologias nos permitem amostras viáveis para a cristalização, porém a segunda metodologia, de acordo a verificação da purificação em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) (Figuras 16 e 17), mostrou um grau de pureza superior que a primeira, fator importante para a técnica de cristalização de proteínas. Outra vantagem desta segunda metodologia foi o rendimento da proteína recombinante com maior grau de pureza durante os processos, garantindo assim, em maior quantidade de amostra pura para as etapas seguintes, visto que para essa metodologia ocorre menor perda da proteína em virtude do menor número de etapas realizadas.

4.3. CRISTALIZAÇÃO DA IMPORTINA- α (70-529) E OS PEPTÍDEOS NLSs: KU80, FEN1, PMS2 E MLH1

A amostra concentrada a 20 mg.ml^{-1} , obtida pela segunda metodologia, foi utilizada nos experimentos de cristalografia. A obtenção de cristais nativos visa à confirmação da viabilidade da amostra obtida (Figura 18). Para os experimentos de co-cristalização da Imp α e os peptídeos NLSs, foi feita uma busca pelas melhores condições de cristalização com base nas condições descritas por (Kobe, 1999). Peptídeos NLS foram adicionados as gotas na proporção de 8 moléculas de ligante para 1 molécula da Imp α .

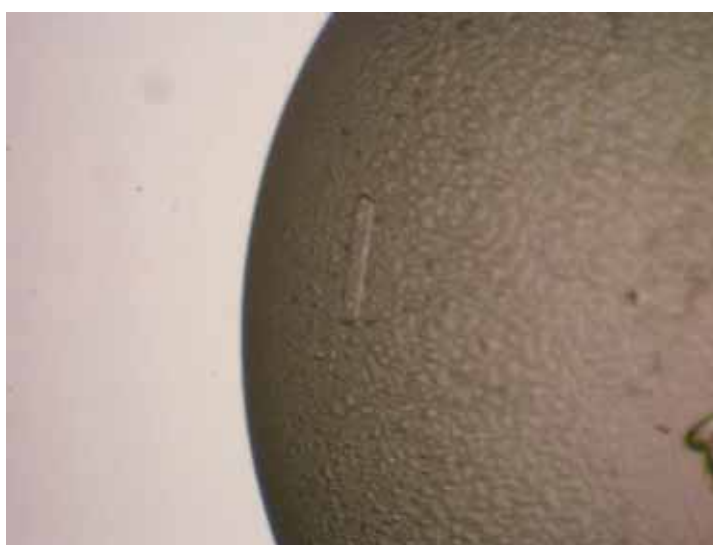


Figura 18 - Cristal da Imp α nativa, condição citrato de sódio $0,6 \text{ Mol.L}^{-1}$, tampão citrato de sódio pH6,0 e DTT 10 mMol.L^{-1} .

Os complexos Imp α e os peptídeos Ku80, FEN1, PMS2 e MLH1 resultaram em cristais convenientes para experimento de difração de raios X. Os cristais de todos os complexos foram obtidos em condições similares às da Imp α nativa, com variações de: $0,55\text{-}0,7 \text{ Mol.L}^{-1}$ de citrato de sódio, tampão citrato de sódio $0,1 \text{ mMol.L}^{-1}$ pH 5,8-6,2 e 10 mMol.L^{-1} de DTT (DL-Dithiothreitol) (Tabela 2). O tempo médio para crescimento dos cristais foi de 20-30 dias. Nas figuras 16, 17, 18 e 19 são mostrados cristais dos complexos Imp α /peptídeos NLSs: Ku80, FEN1, PMS2 e MLH1 respectivamente.

Tabela 2 - Condições de cristalização dos cristais utilizados em experimentos de difração de raios-X.

Impα/Peptídeo	Concentração - agente precipitante (Citrato de sódio)	Tampão (Citrato de sódio)	DTT
Ku80	0,650 Mol.L ⁻¹	pH 6,0	10 mMol.L ⁻¹
FEN1	0,600 Mol.L ⁻¹	pH 5,8	10 mMol.L ⁻¹
PMS2	0,600 Mol.L ⁻¹	pH 6,0	10 mMol.L ⁻¹
MLH1	0,625 Mol.L ⁻¹	pH 6,0	10 mMol.L ⁻¹

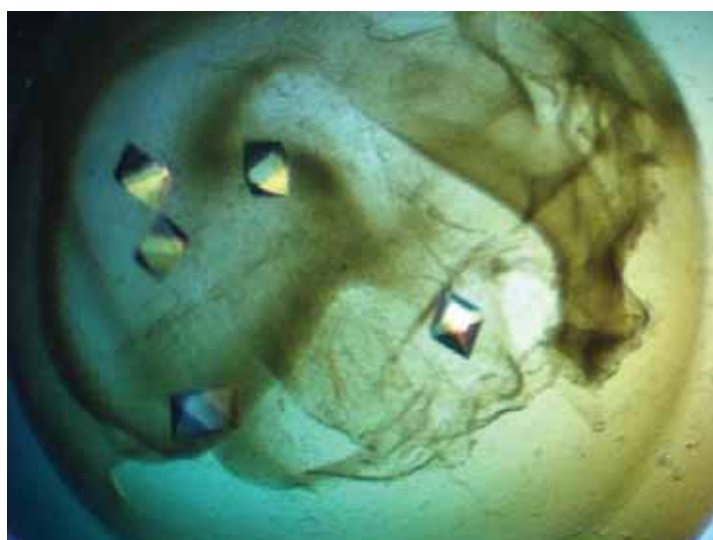


Figura 19 - Cristais do complexo Ku80NLS:Impα, condição citrato de sódio 0,65 Mol.L⁻¹, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mMol.L⁻¹.

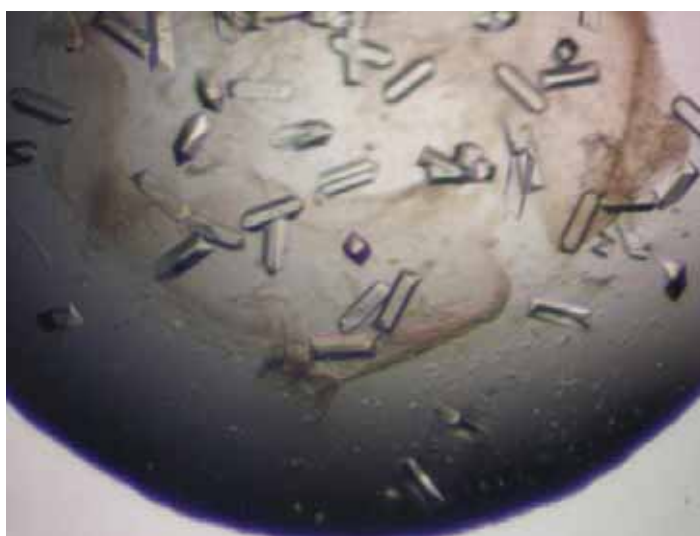


Figura 20 - Cristais do complexo FEN1NLS:Impα, condição citrato de sódio 0,6 Mol.L⁻¹, tampão citrato de sódio pH 5,8 e DTT 10 mMol.L⁻¹.

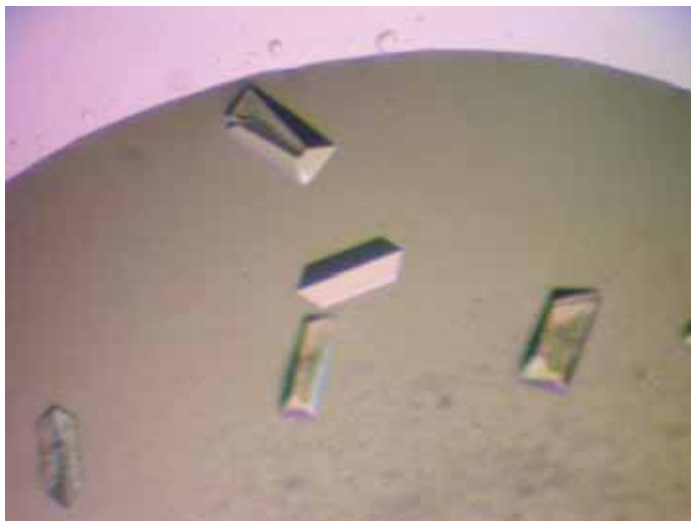


Figura 21 - Cristais do complexo PMS2NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,6 Mol.L⁻¹, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mMol.L⁻¹.

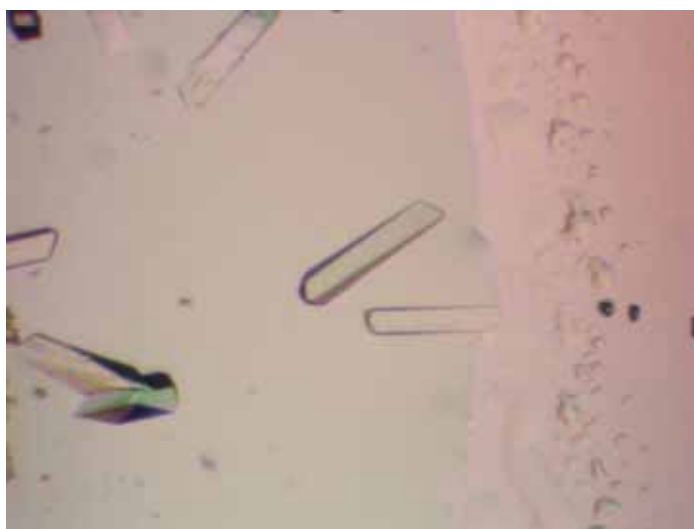


Figura 22 - Cristais do complexo MLH1NLS:Imp α , condição citrato de sódio 0,625 Mol.L⁻¹, tampão citrato de sódio pH 6,0 e DTT 10 mMol.L⁻¹.

4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os cristais dos complexos peptídeosNLSs:Imp α foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron de Campinas (LNLS), submetidos a fluxo de nitrogênio líquido na presença de crioprotetor (25% de glicerol) e de acordo com os parâmetros presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados referentes aos parâmetros utilizados nos experimentos de difração de raios X com os complexos peptídeosNLSs:Imp α no LNLS em Campinas.

Peptídeo NLS:Imp α	Ku80	FEN1	PMS2	MLH1
Comprimento de onda (λ)	1.43Å	1.45Å	1.43Å	1.43Å
Energia (KeV)	8.67	8.50	8.67	8.67
Linha	MX1	MX2	MX1	MX1
Temperatura (K)	100	100	100	100
Ângulo de rotação do cristal ($\Delta\phi$)	1°	1.5°	1°	1.5°
Número de imagens coletadas	148	102	141	118
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			

O processamento foi efetuado com programas do HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). Os cristais obtidos eram isomorfos (grupo espacial P2₁2₁2₁) em relação aos outros complexos peptídeosNLSs:Imp α (Fontes *et al.*, 2003a). Dados obtidos dos complexos com os peptídeos Ku80, FEN1, PMS2 e MLH1 resultaram em conjuntos de dados processados à 2.30, 2.38, 2.1 e 2.17Å de resolução respectivamente (Tabela 4).

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

	Ku80NLS:Imp α	FEN1NLS:Imp α	PMS2NLS:Imp α	MLH1NLS:Imp α
Cela unitária	a=77,35 b=88,29 c=98,30 $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=78,87 b=89,56 c=100,34 $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=77,14 b=89,54 c=97,03 $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=77,21 b=89,07 c=99,139 $\alpha=\beta=\gamma=90$
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Resolução (Å)	40,0-2,3 (2,34-2,29) ^a	40,0-2,38 (2,44-2,38) ^a	40,0-2,1 (2,18-2,1) ^a	40,0-2,17 (2,25-2,17) ^a
Reflexões únicas	29010	28970	39970	36854
Dados completos (%)	98,7 (91,8) ^a	98,0 (95,6) ^a	99,7 (98,9) ^a	99,5 (97,9) ^a
R_{merge}^b (%)	8,1 (52,3) ^a	10,5 (68,5) ^a	6,1 (46,8) ^a	7,4 (61,8) ^a
I/σ (I)	20,77 (2,45) ^a	15,04 (2,0) ^a	18,56 (2,19) ^a	24,11 (2,38) ^a
Redundância	5,3 (4,5) ^a	3,0 (2,5) ^a	2,9 (2,6) ^a	6,4 (5,4) ^a

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

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

4.5. ELUCIDAÇÃO, MODELAGEM E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

A estrutura dos complexos Ku80NLS:Imp α e FEN1NLS:Imp α foram elucidadas por síntese de Fourier (Mcree, 1993), utilizando o programa *Refmac 5* (Murshudov *et al.*, 1997), presente no pacote de programas do CCP4i (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994; Potterton *et al.*, 2003). Em ambos os casos os cristais eram isomorfos (grupo espacial P2₁P2₁P2₁) em relação ao cristal da Imp α nativa (Kobe, 1999) e aos outros complexos peptídeosNLSs:Imp α (Fontes *et al.*, 2003a). Por esse motivo o arquivo de coordenadas 1Q1S da Imp α truncada em sua porção N-terminal, co-cristalizada com o peptídeo NLS monopartido SV40CN (antígeno T do vírus símio 40, versão alongada)(Fontes *et al.*, 2003b) foi utilizado como modelo.

Os modelos dos complexos foram submetidos a refinamento de corpo rígido e restritos, mapas de densidade eletrônica foram gerados, cujos ciclos também foram executados através do *Refmac 5* (Murshudov *et al.*, 1997; Potterton *et al.*, 2003). O programa “Coot” foi utilizado para a modelagem manual dos complexos (Emsley & Cowtan, 2004). Após o refinamento de corpo rígido, pode-se verificar claramente a presença de densidades eletrônicas correspondentes aos peptídeos. Para o complexo com a Ku80, houve o reconhecimento de densidade eletrônica correspondente ao peptídeo NLS somente no sítio principal (S₁) de ligação da Imp α , enquanto para a FEN1 houve o reconhecimento de uma densidade eletrônica que se estendia do sítio principal (S₁) até o sítio de ligação secundário (S₂). Dessa maneira os peptídeos foram adicionados aos modelos, modelados e refinados levando-se em consideração as densidades eletrônicas. Ambas as conformações dos peptídeos Ku80 e FEN1 puderam ser modeladas sem ambigüidade (Figura 23 e 24).

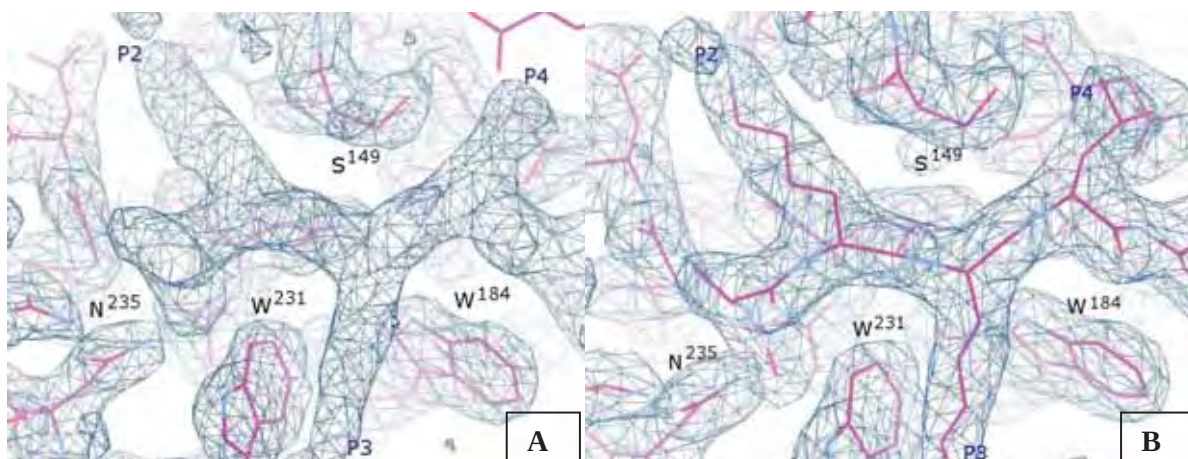


Figura 23 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da Imp α com o peptídeo NLS da Ku80. Em destaque são mostrados alguns resíduos do sítio de ligação principal. A: Densidade eletrônica no sítio principal de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio principal com peptídeo adicionado ao modelo.

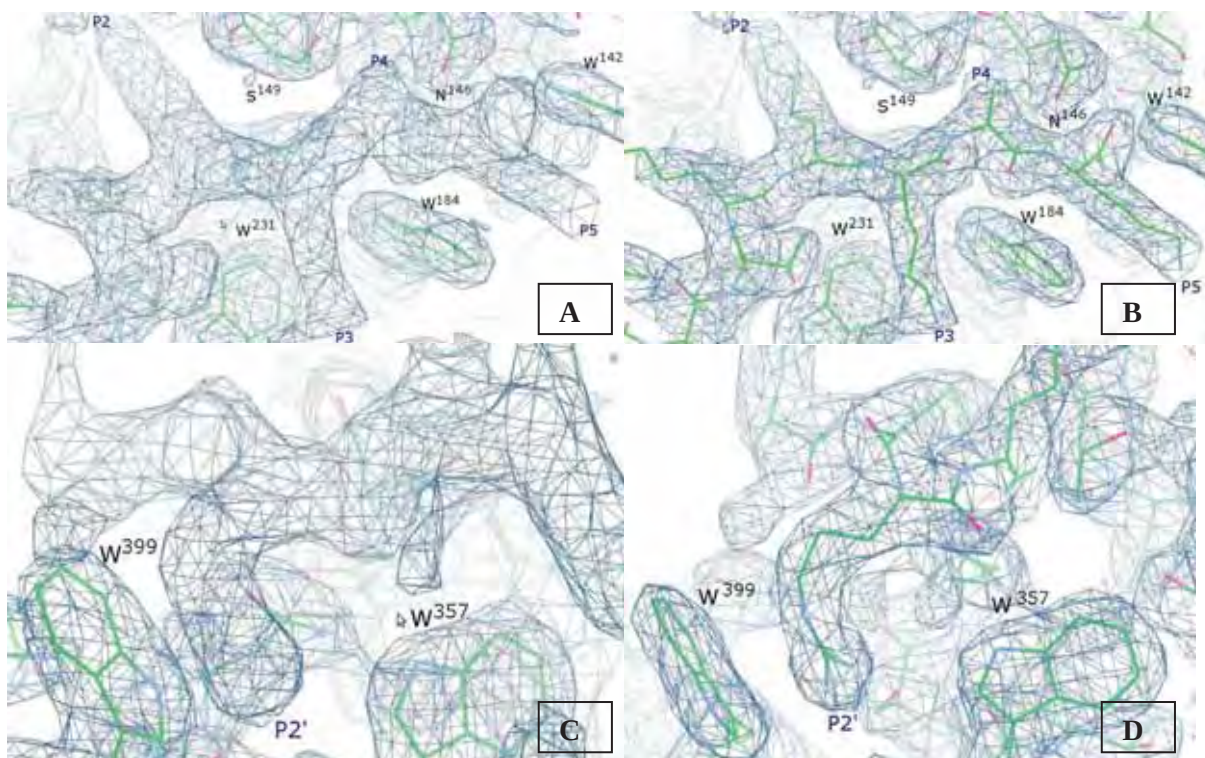


Figura 24 – Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da Imp α com o peptídeo NLS da FEN1. Em A e B são mostrados alguns resíduos do sítio de ligação principal e em C e D resíduos do sítio de ligação secundário. A: Densidade eletrônica no sítio principal de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio principal com peptídeo adicionado ao modelo. C: Densidade eletrônica no sítio secundário de ligação. B: Densidade eletrônica no sítio secundário com peptídeo adicionado ao modelo.

Os modelos dos complexos dos peptídeos:Imp α tiveram seus refinamentos iniciados com fatores R inicial de 32,4%, 32,8% e Rfree 32,0%, 31,7% para a Ku80 e FEN1, respectivamente. Após adição e modelagem dos peptídeos nas respectivas

densidades eletrônicas presentes nos sítios de ligação da Imp α , ciclos de refinamento de posição e fator de temperatura foram efetuados. Ao término do processo, a qualidade estereoquímica dos modelos foi confirmada através do programas *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1996) e *SFCHECK* (Vaguine *et al.*, 1999) presentes no pacote de programas do CCP4 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994; Potterton *et al.*, 2003). As estatísticas de refinamento encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Estatísticas de refinamento dos complexos Imp α com peptídeos NLS.

	Ku80NLS:Imp α	FEN1NLS:Imp α
Resolução (Å)	40,0-2,3 (2,34-2,29) ^a	40,0-2,38 (2,44-2,38) ^a
Número de reflexões.		
F>0	29010	28970
Dados completos (%)	98,7 (91,8) ^a	98,0 (95,6) ^a
R_{cryst}^b (%)	17,77	16,78
R_{free}^c (%)	21,79	21,50
Número de átomos (não hidrogênios):		
Proteína	3207	3237
Peptídeo	87	146
H₂O	216	157
Fator de temperatura médio (Å²)^e	41,08	48,65
Gráfico de Ramachandran^d		
Resíduos nas regiões mais favoráveis		
(não permitidas) (%)	98 (0,2)	98,2 (0,2)

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

^b $R_{cryst} = \sum |hkl| (|F_{obs} - F_{calc}|) / \sum |F_{obs}|$, onde $|F_{obs}|$ e $|F_{calc}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados.

^c Rfree é equivalente ao Rcryst, mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas.

^d Calculado com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Também foram verificadas interações do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio dos complexos Ku80NLS:Imp α e FEN1NLS:Imp α entre as proteínas e os peptídeos ligantes que são mostradas esquematicamente na figura 25. Merecem destaque as interações hidrofóbicas, comuns aos dois modelos, os resíduos W¹⁴², S¹⁴⁹, W¹⁸⁴, D¹⁹², W²³¹, W²⁷³ e Y²⁷⁷ da Imp α interagindo com as sequências dos peptídeos NLSs (Tabela 6).

Em relação a interações do tipo ligações de hidrogênio, são comuns aos dois modelos, os resíduos W¹⁴², N¹⁴⁶, W¹⁸⁴, N¹⁸⁸, W²³¹, N²³⁵ e R²³⁸ da Imp α que se ligam

com a cadeia principal das sequências dos peptídeos NLSs e os resíduos G¹⁵⁰, T¹⁵⁵ e D¹⁹² da Imp α que se ligam com cadeias laterais dos resíduos presentes nas sequências dos peptídeos NLSs (Tabela 7). Essas interações comuns, nesse caso, ocorrem somente para o sítio principal de ligação da Imp α , visto que a sequência NLS para a proteína Ku80 é monopartida.

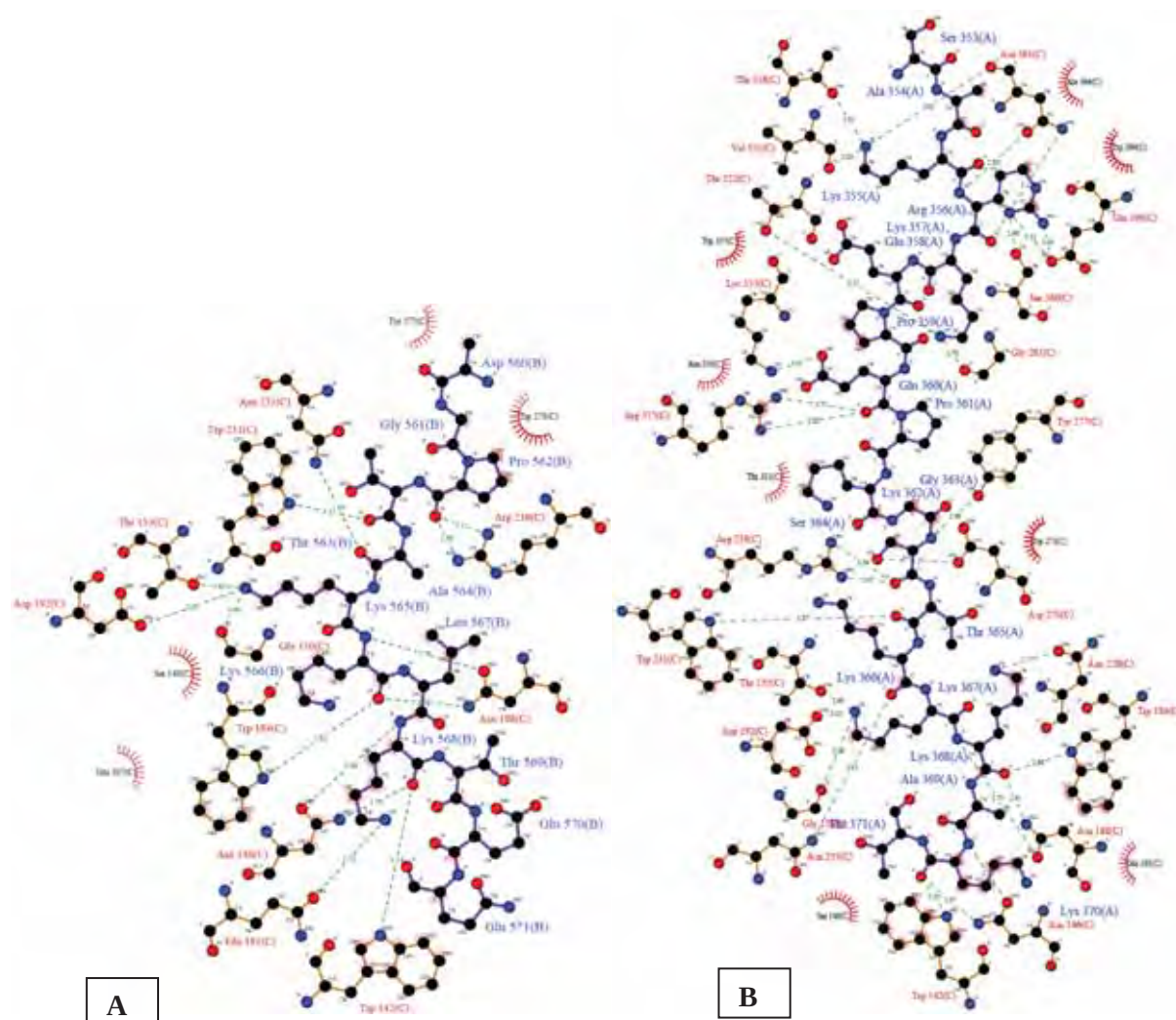


Figura 25 – Esquema mostrando a interação entre Imp α e peptídeos NLS . A: Diagrama das interações entre o peptídeo Ku80 e Imp α . Contatos polares são mostrados com linhas tracejadas e contatos hidrofóbicos são indicados por arcos com raios. Os resíduos NLS do peptídeo ku80 são identificados com a letra B (azul). Átomos de Carbono, nitrogênio e oxigênio são mostradas em preto, azul e vermelho, respectivamente. Essa figura foi preparada com o programa LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995). B: Diagrama das interações entre o peptídeo FEN1 e Imp α . Os resíduos do peptídeo NLS são identificados com a letra A (azul).

Tabela 6 – Interações hidrofóbicas entre o peptídeo NLS e a Impα nos sítios de ligação principal (S₁) e secundário (S₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo		Ku80NLS:Impα	FEN1NLS:Impα
		A ³⁵⁴ :A ³⁶⁴	
Sítio Secundário (S ₂)	P1'		
	P2'		R ³⁵⁶ :W ³⁹⁹
	P3'		K ³⁵⁷ :T ³²²
	P4'		
		D ⁵⁶⁰ :Y ^{277*}	P ³⁵⁹ :R ³¹⁵ P ³⁵⁹ :W ³⁵⁷
		G ⁵⁶¹ :W ²⁷³	K ³⁶² :W ²⁷³ K ³⁶² :T ³¹¹ K ³⁶² :N ³⁵⁰ K ³⁶² :R ³¹⁵
		P ⁵⁶² :W ²⁷³	G ³⁶³ :W ²⁷³
		T ⁵⁶³ :N ²³⁵	S ³⁶⁴ :Y ^{277*}
		A ⁵⁶⁴ :W ²³¹	K ³⁶⁶ :W ²³¹ K ³⁶⁶ :R ²³⁸
Sítio Principal (S ₁)	P1		
	P2	K ⁵⁶⁵ :D ¹⁹² K ⁵⁶⁵ :S ¹⁴⁹	K ³⁶⁷ :D ¹⁹² K ³⁶⁷ :S ¹⁴⁹
	P3	K ⁵⁶⁶ :W ²³¹ K ⁵⁶⁶ :W ¹⁸⁴	K ³⁶⁸ :W ²³¹ K ³⁶⁸ :W ¹⁸⁴
	P4	L ⁵⁶⁷ :N ¹⁴⁶ L ⁵⁶⁷ :E ¹⁰⁷	A ³⁶⁹ :W ¹⁸⁴
	P5	K ⁵⁶⁸ :W ¹⁴² K ⁵⁶⁸ :N ¹⁴⁶ K ⁵⁶⁸ :W ¹⁸⁴	K ³⁷⁰ :W ¹⁴² K ³⁷⁰ :Q ¹⁸¹ K ³⁷⁰ :W ¹⁸⁴
		Q ⁵⁷¹ :W ¹⁴²	

Tabela 7 – Interações do tipo ligações de hidrogênio entre os peptídeos NLSs e a Impα nos sítios de ligação principal (S₁) e secundário (S₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo		Ku80NLS:Impα		FEN1NLS:Impα	
Cadeia do ligante		PRINCIPAL	LATERAL	PRINCIPAL	LATERAL
Sítio Secundário (S ₂)	P1'				K ³⁵⁵ :N ³⁶¹ K ³⁵⁵ :V ³²¹ K ³⁵⁵ :T ³²⁸
	P2'			R ³⁵⁶ :N ³⁶¹	R ³⁵⁶ :N ³⁶¹ R ³⁵⁶ :E ³⁹⁶ R ³⁵⁶ :S ³⁶⁰
	P3'				K ³⁵⁷ :G ²⁸¹ K ³⁵⁷ :T ³²²
	P4'				
				E ³⁶⁰ :K ³⁵³ P ³⁶¹ :R ³¹⁵ S ³⁶⁴ :Y ²⁷⁷	
Sítio Principal (S ₁)		P ⁵⁶² :R ²³⁸		S ³⁶⁴ :R ²³⁸ S ³⁶⁴ :D ²⁷⁰	
		T ⁵⁶³ :W ²³¹ A ⁵⁶⁴ :N ²³⁵		T ³⁶⁵ :W ²³¹ K ³⁶⁶ :N ²³⁵	
	P1				K ³⁶⁷ :N ¹⁸⁸ K ³⁶⁷ :G ¹⁵⁰ K ³⁶⁷ :D ¹⁹² K ³⁶⁷ :T ¹⁵⁵
	P2		K ⁵⁶⁵ :G ¹⁵⁰ K ⁵⁶⁵ :D ¹⁹² K ⁵⁶⁵ :T ¹⁵⁵		
	P3	K ⁵⁶⁶ :W ¹⁸⁴ K ⁵⁶⁶ :N ¹⁸⁸		K ³⁶⁸ :W ¹⁸⁴ K ³⁶⁸ :N ¹⁸⁸	K ³⁶⁸ :N ²²⁸
	P4				
	P5	K ⁵⁶⁸ :N ¹⁴⁶ K ⁵⁶⁸ :W ¹⁴²		K ³⁷⁰ :N ¹⁴⁶ K ³⁷⁰ :W ¹⁴²	
		K ⁵⁶⁸ :GLN ¹⁸¹			

4.6. ESTRUTURA DA Impα NOS COMPLEXOS

A Impα truncada (72-529) de *M. musculus* consiste de uma estrutura alongada, composta por dez repetições tipo *armadillo* (ARM) (Gorlich *et al.*, 1994), a qual contém os sítios de ligação de NLS (Kobe, 1999). As hélices H3 formam a superfície interna côncava na molécula onde são encontrados resíduos conservados de triptofano e asparagina, cercados por resíduos ácidos, na qual, entre os ARM 2-4, em que a ocupação de determinadas posições, denominadas de P1 a P6, no sítio principal (S₁) e entre os ARM 6-8, as ocupações de P1' a P5', no sítio secundário (S₂), são importantes para reconhecimento de NLS (Fontes *et al.*, 2000).

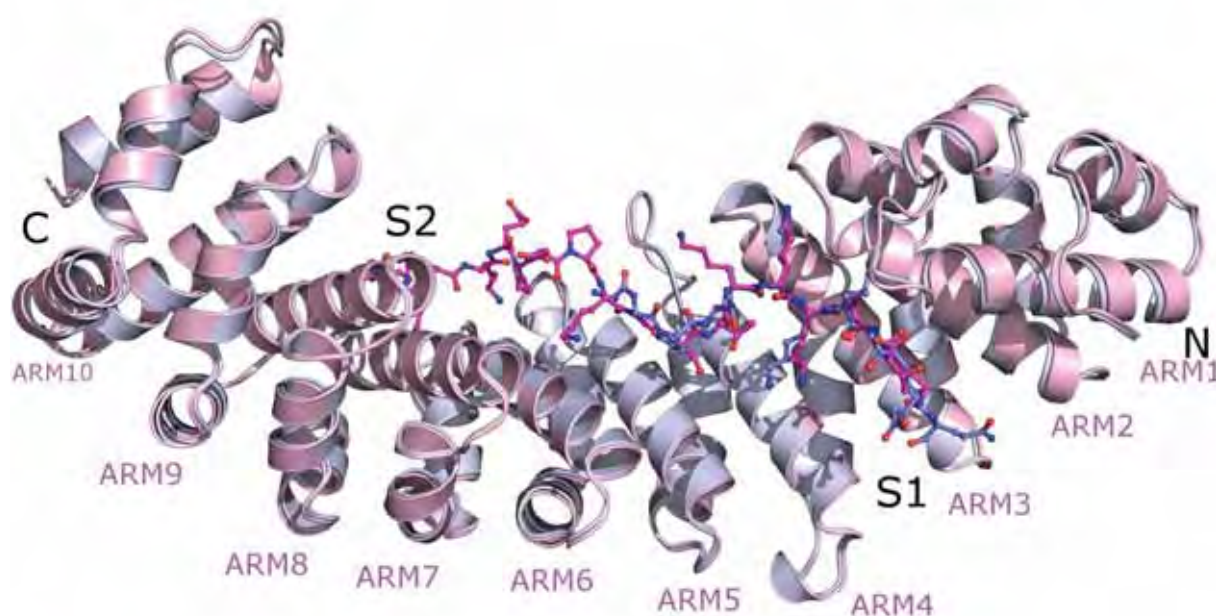


Figura 26 – Representação dos complexos de Impα em diagrama de fitas e seus respectivos peptídeos NLS. Em destaque motivos ARM e a localização dos sítios de ligação de NLS da Impα. Em rosa está destacado o complexo FEN1NLS:Impα e em lilás o complexo Ku80NLS:Impα.

Para os modelos obtidos da Impα truncada, complexadas com os peptídeos Ku80 e FEN1, foram encontradas densidades eletrônica para os resíduos 72 ao 496. Os modelos da Impα nos complexos são em essência, idênticos quando observado em relação ao modelo nativo. O desvio r.m.s. (*root mean square*) dos Ca dos resíduos 72-496 entre a Impα nativa (PDB ID 1IAL) e a Impα dos complexos com ligantes são 0,54 e 0,39Å para os modelos contendo os peptídeos Ku80 e FEN1, respectivamente. O desvio r.m.s. dos Ca dos resíduos 72-496 da Impα entre os complexos Ku80NLS:Impα e FEN1NLS:Impα é de 0,45Å.

4.7. ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS IMPORTINA-α E OS PEPTÍDEOS NLSs

4.7.1. Ku80NLS:Impα

O peptídeo correspondente ao NLS da proteína Ku80, ⁵⁵⁹EDGPTAKKLKTEQ⁵⁷¹, se liga somente ao sítio principal de ligação da Impα, com a cadeia principal posicionada em configuração antiparalela quando comparada com a direção das repetições ARM. Houve densidade eletrônica para os resíduos 560-

571 do peptídeo NLS da Ku80, os quais puderam ser identificados de forma inequívoca nos mapas de densidade eletrônica (Figura 27 e 28), enquanto para o resíduo 559 não houve o aparecimento de densidade eletrônica interpretável. A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo é de 793,2 Å².

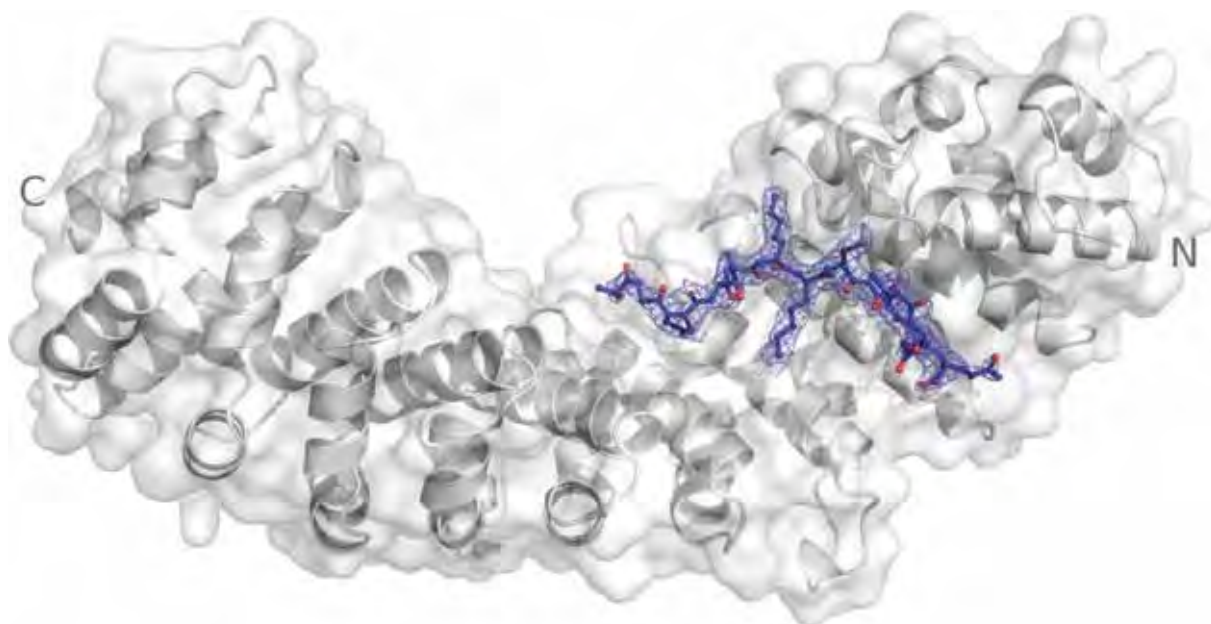


Figura 27 - Representação do complexo Impα:Ku80NLS – Impα truncada (72-496) encontra-se em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da Ku80 em *ball and sticks* (azul). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$.

Tabela 8 – Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS Ku80.

Sequência			Fator de temperatura (B-Factor) (Å ²)
Sítio Principal (S ₁)	P1	G ⁵⁶¹	70,01
		P ⁵⁶²	61,25
		T ⁵⁶³	52,99
		A ⁵⁶⁴	39,04
		K ⁵⁶⁵	27,31
	P2	K ⁵⁶⁶	32,64
	P3	L ⁵⁶⁷	32,99
	P4	K ⁵⁶⁸	32,51
	P5	T ⁵⁶⁹	42,66
		E ⁵⁷⁰	60,52
		Q ⁵⁷¹	62,09

A distribuição dos fatores de temperatura (*B-factor*) ao longo da cadeia peptídica reflete as diferenças das interações dos resíduos do peptídeo com a proteína. A média do fator de temperatura do peptídeo NLS Ku80 no sítio de ligação principal da Imp α (46,46 Å²) é maior que a média do fator de temperatura da Imp α (40,89 Å²), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 564-568, posicionados no sítio principal de ligação da Imp α (posições P₁-P₅), é 32,28 Å². Os resíduos K565 e K568 (posições P2 e P5) possuem os menores fatores de temperatura (27,31 e 32,5 Å², respectivamente). O conjunto de interações entre o peptídeo e a Imp α permite melhor ancoramento do peptídeo com a proteína. A presença de interações hidrofóbicas em todas as posições do sítio principal de ligação S₁ e ligações de hidrogênio em P2 e P5 acarretam em um menor fator de temperatura para essa região e para esses dois resíduos, refletindo a forte interação dos mesmos com a proteína (Tabela 6 e 7) (Figura 28).

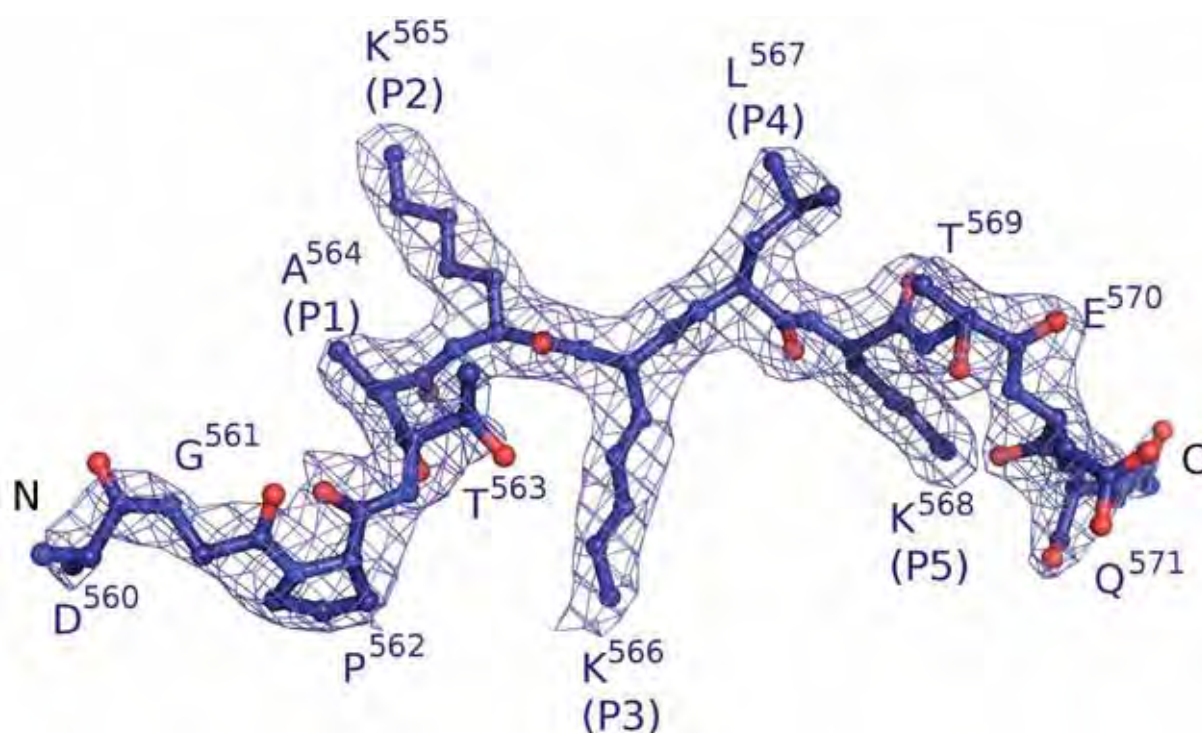


Figura 28 - Mapa de densidade eletrônica $2[F_{\text{obs}}] - [F_{\text{calc}}]$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da Ku80 no sítio principal (S₁). Peptídeo em azul apresenta indicações de posições P1-P5 que correspondem a regiões do S₁ na Imp α .

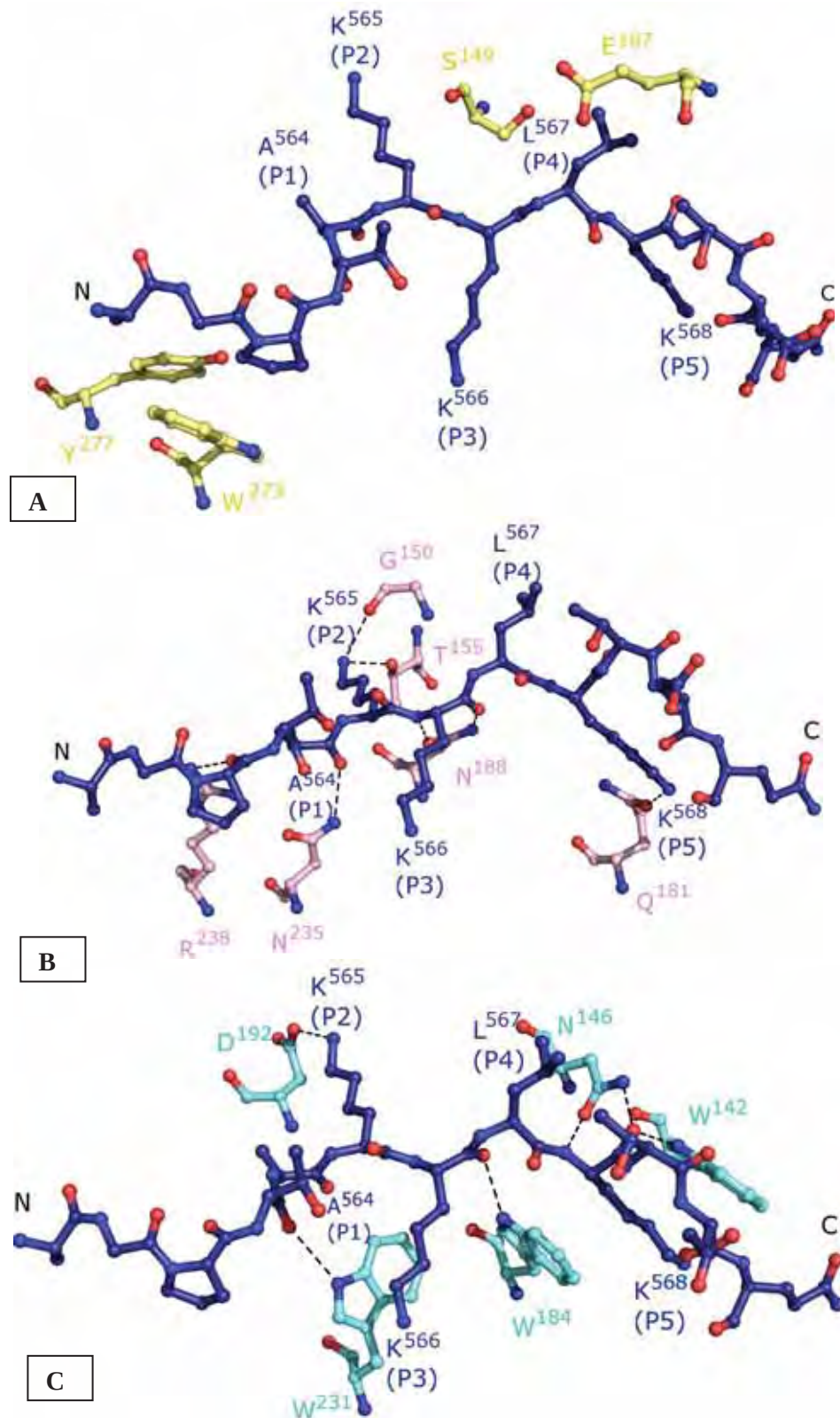


Figura 29 – Representação em *ball and stick* do Peptídeo NLS Ku80, em azul escuro, com resíduos dos sítios de ligação da Imp α , em amarelo, rosa claro e ciano, respectivamente. A: Resíduos da Imp α que fazem interação hidrofóbica, são mostrados em amarelo. B: Resíduos da Imp α que fazem ligação de hidrogênio são mostrados em rosa claro. C: Resíduos da Imp α que fazem tanto interação hidrofóbica, como ligação de hidrogênio são mostrados em ciano.

O peptídeo que se ligou ao sítio principal (S_1) do complexo Imp:Ku80, tem estrutura similar ao do peptídeo NLS da SV40TAg (Fontes *et al.*, 2000). Após a superposição dos átomos de C α equivalentes em ambos peptídeos o desvio r.m.s. dos resíduos no sítio principal (P1-P5) foi de 0.43 Å.

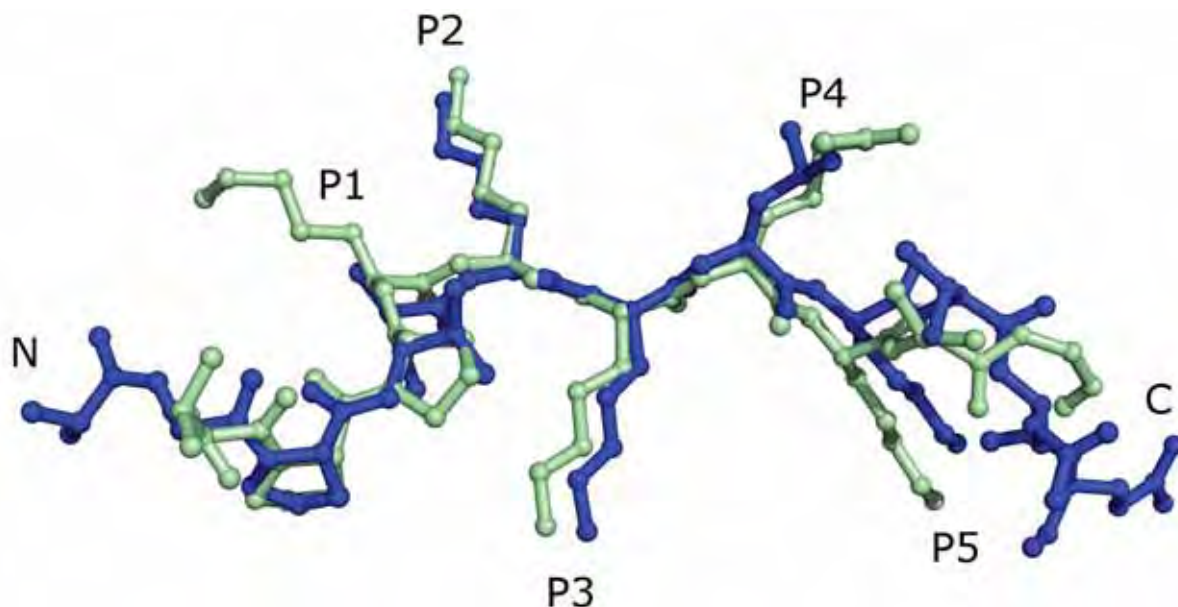


Figura 30 - Comparação dos peptídeos NLS no sítio de ligação principal (S_1) da Imp α , indicando Ku80 (azul) e SV40TAg (amarelo) (código PDB 1Q1T). Os NLSs foram sobrepostos usando átomos de C α dos peptídeos. Posições de ligação no sítio principal (P1-P5) são indicados ao longo da cadeia.

4.7.2. FEN1NLS:Imp α

O peptídeo correspondente ao NLS da proteína FEN1, ³⁵¹SSAKRKEPEPKGSTKKKAKT³⁷², liga-se simultaneamente a ambos os sítios de ligação, principal (S_1) e secundário (S_2), com a cadeia principal posicionada em configuração antiparalela quando comparada com a direção das repetições ARM. Foram modelados de maneira inequívoca os resíduos de 353 a 371 da FEN1, sendo ³⁵⁵KRKE³⁵⁹ o sítio de ligação de P1' a P4' (S_2) e ⁵⁶⁵KKKAK⁵⁷⁰ o sítio de ligação de P1 a P5 (S_1). Para o resíduo 352 não houve o aparecimento de densidade eletrônica interpretável (Figura 31 e 32). A área de superfície de contato entre a proteína e o peptídeo é de 1334,7 Å².

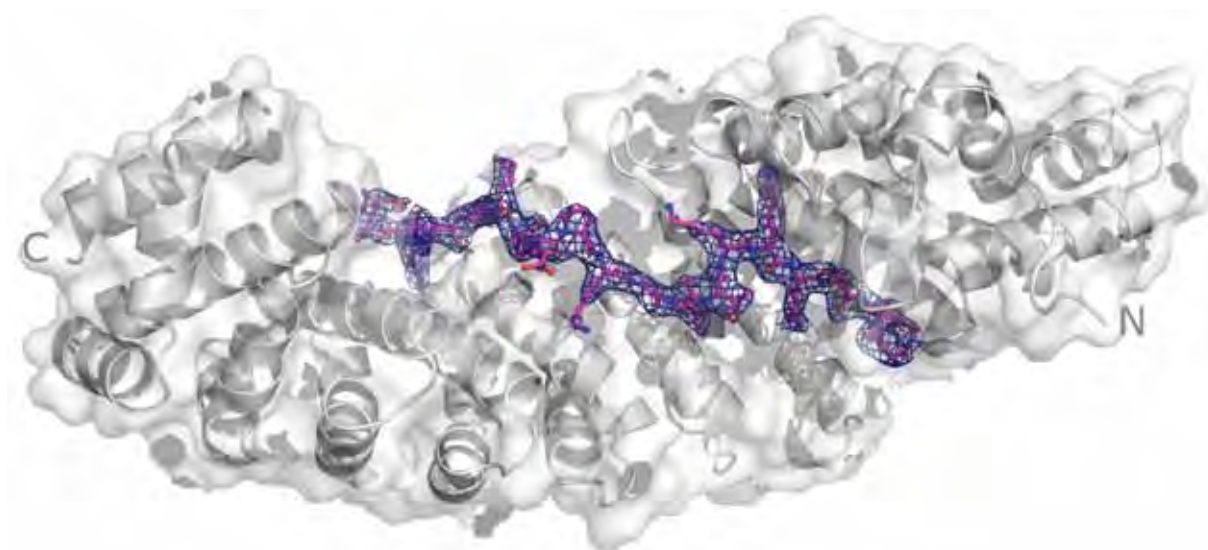


Figura 31 - Representação do complexo Impα:FEN1NLS –Impα truncada (72-496) encontrada-se em diagrama de fitas (branco) e o peptídeo NLS da FEN1 em *ball and stick* (rosa). Em azul o mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma = 1,2$.

Tabela 9 - Tabela indicando o fator de temperatura dos resíduos presentes na sequência do peptídeo NLS Ku80.

		Sequência	Fator de temperatura (B-Factor) ($\text{\AA}^2$)
		S ³⁵³	67,27
		A ³⁵⁴	58,57
Sítio Secundário (S ₂)	P1'	K ³⁵⁵	49,83
	P2'	R ³⁵⁶	46,42
	P3'	K ³⁵⁷	48,44
	P4'	E ³⁵⁸	61,38
Linker		P ³⁵⁹	50,27
		E ³⁶⁰	62,26
		P ³⁶¹	54,39
		K ³⁶²	53,28
		G ³⁶³	45,71
		S ³⁶⁴	44,42
Sítio Principal (S ₁)		T ³⁶⁵	46,14
	P1	K ³⁶⁶	48,09
	P2	K ³⁶⁷	39,17
	P3	K ³⁶⁸	44,68
	P4	A ³⁶⁹	40,99
	P5	K ³⁷⁰	44,55
		T ³⁷¹	56,95

A distribuição de fatores de temperatura (*B-factor*) ao longo da cadeia peptídica reflete as diferenças das interações dos resíduos dos peptídeos com a Imp α . A média do fator de temperatura do peptídeo NLS FEN1 no sítio de ligação principal da Imp α (50,55 Å²) é maior que a média do fator de temperatura da Imp α (49,49 Å²), entretanto, a média do fator de temperatura dos resíduos 366-370, posicionados no sítio principal (S₁) de ligação da Imp α (posições P1-P5), é 43,74 Å². Os resíduos K367 e A369 (posições P2 e P4) possuem os menores fatores de temperatura (39,17 e 40,99 Å², respectivamente). Em relação ao sítio secundário (S₂) (posições P1'-P4'), a média do fator de temperatura dos resíduos 355-358, é 51,25 Å², valor maior que a média do fator de temperatura total do peptídeo NLS FEN1 e consequentemente maior que a média do fator de temperatura da Imp α , porém o resíduo K356, na região P2', possui um fator de temperatura menor que da estrutura da Imp α , sendo 46,42 Å², indicando uma forte interação desse resíduo nesse sítio de ligação.

A região de *linker*, P3'-P1, entre os sítios principal e secundário do peptídeo NLS FEN1, possui 52,19 Å² como média do fator de temperatura, porém os resíduos K357, G363, S364, T365 e K366 também possuem fatores de temperatura menores que o fator de temperatura da Imp α , sendo 48,44; 45,71; 44,42; 46,14 e 48,09 Å², respectivamente (Tabela 9), refletindo também a forte interação destes resíduos com a proteína.

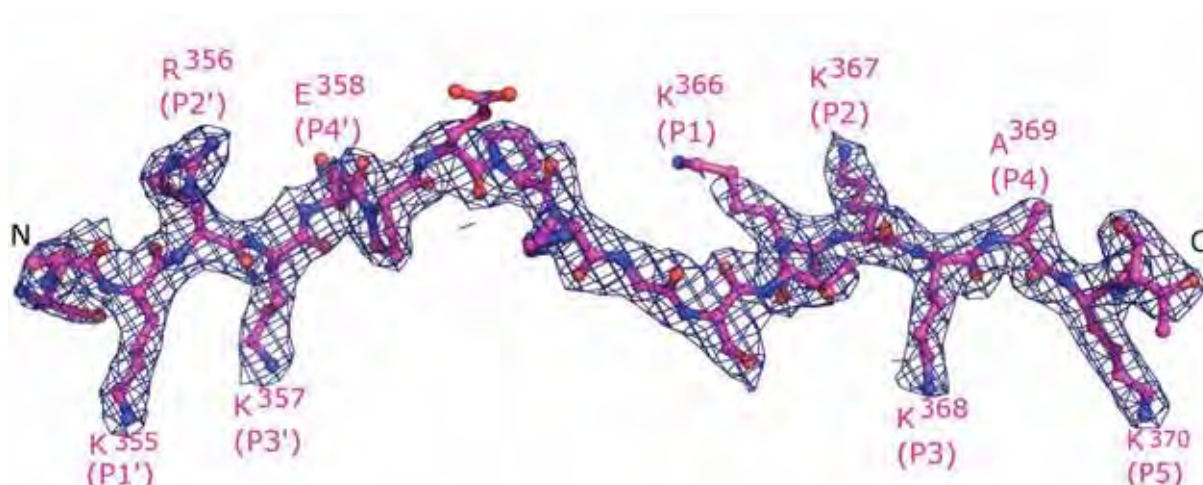


Figura 32 - Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$, gerado com desvio padrão de $\sigma=1,2$, correspondendo ao peptídeo NLS da FEN1 ligado aos sítio principal (S₁) e secundário (S₂). Peptídeo em rosa apresenta indicações de posições P1-P5 e P1'-P4' que correspondem a regiões do S₁ e S₂ da Imp α .

Dentre as interações entre este peptídeo NLS e a Imp α que permitem melhor ancoramento do peptídeo com a proteína, no sítio S_1 a presença de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio ocorrem em todas as posições do sítio S_1 , o que é comprovado pelo menor fator de temperatura para esta região. No sítio S_2 ocorrem interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio em P1', P2' e P3', região com menor fator de temperatura para essa região (49,83; 46,42 e 48,44 Å², respectivamente). Na posição P4' (Fator de temperatura= 61,38 Å), não foi constatada nenhuma interação com a Imp α (Tabela 9).

A sequência *linker* do peptídeo NLS FEN1 faz interações favoráveis entre os arms 4-7 da Imp α . Os contatos mais importantes dessa região com a proteína Imp α são os resíduos G363, S364, T365 do peptídeo (Tabelas 6, 7 e 9). Outro contato importante é feito com o seguinte resíduo da Imp α : R238, que se liga com a cadeia principal do peptídeo FEN1 e com a cadeia principal de ambos os peptídeos N₁N₂ e RB (Fontes *et al.*, 2003a).

Tabela 10 – Comparação após superposição dos átomos C α do peptídeo FEN1 com outros peptídeos monopartidos e bipartidos elucidados anteriormente.

Peptídeos			Desvio r.m.s. (Å)			
			Região de comparação com FEN1			
			Peptídeo	S_2	<i>Linker</i>	S_1
	N ₁ N ₂		3,80	0,53	2,57	0,18
	Nucleoplasmina	Bipartido	2,23	0,53	2,57	0,36
	RB		2,90	0,88	2,55	0,32
	SV40	Monopartido	-	-	-	0,13

N₁N₂, código PDB 1PJN; Nucleoplasmina, código PDB 1EJY; RB, código PDB 1PJM; SV40T, código PDB 1Q1T.

A tabela 10 indica valores de desvio r.m.s. obtidos da superposição dos átomos de C α equivalentes referentes a três diferentes regiões dos peptídeos NLS da FEN1, superpostos com outras três estruturas de peptídeos elucidadas previamente. Esses resultados mostram que o sítio principal para os complexos bipartidos FEN1, N₁N₂, nucleoplasmina e RB e o complexo monopartido SV40TA α possuem estruturas bem similares (Figura 33). Os sítios secundários dos complexos bipartidos N₁N₂, nucleoplasmina e RB comparados com a FEN1 também mostram pequenos valores de desvio r.m.s., mostrando-se quase idênticas nas posições P1', P2' e P3 de S_2 . O desvio r.m.s. dos átomos dos C α desses resíduos é 0,10; 0,5 e 0,09 Å, respectivamente. Após a posição P3' do sítio secundário, em direção ao seu C-terminal, os peptídeos adotam uma conformação bem diferente entre si, a similaridade retorna nos resíduos de região P1.

Por outro lado, a região do linker dos peptídeos bipartidos mostraram ser bastante diferentes (Figura 33), com valores de desvio r.m.s. maiores que 2,5Å.

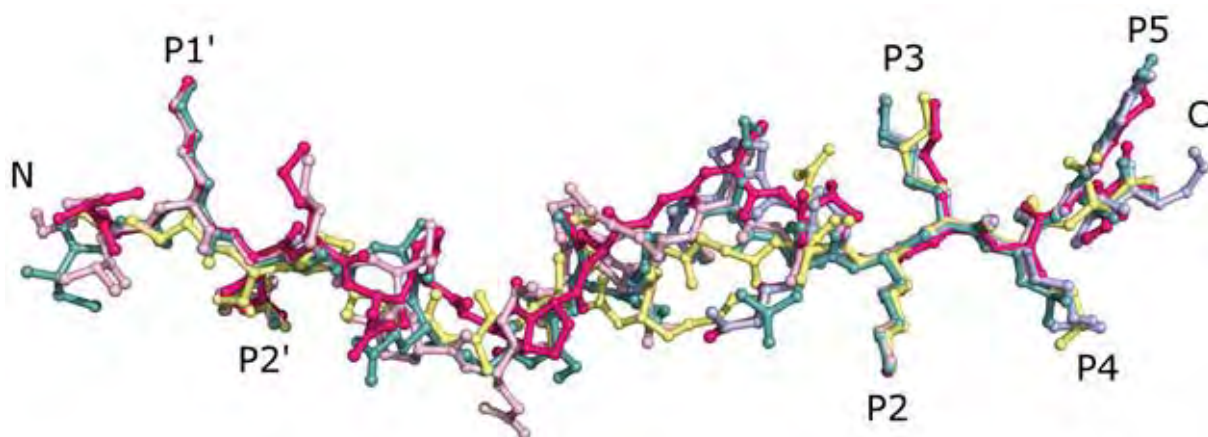


Figura 33 - Comparação dos peptídeos NLS. Os NLSs FEN1 (rosa escuro), N₁N₂ (rosa claro) (código PDB 1PJN), Nucleoplasmina (amarelo) (código PDB 1EJY), RB (verde) (código PDB 1PJM) e SV40TA_g (azul claro) (código PDB 1Q1T) foram sobrepostos usando a sobreposição dos átomos de C α dos peptídeos da região de P1-P5. Posições de ligação no sítio principal (P2-P5) e secundários (P1'-P2') são indicados ao longo da cadeia.

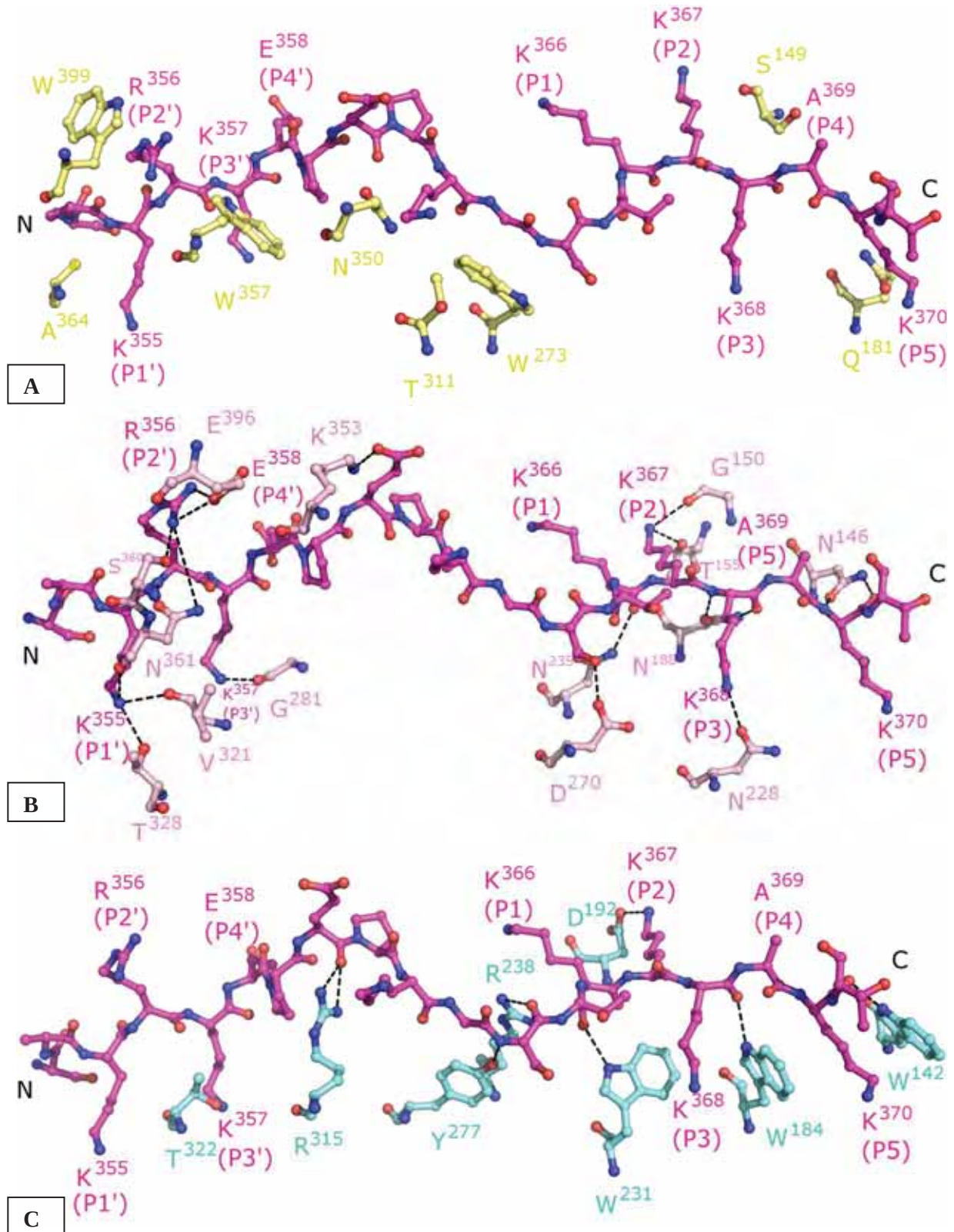


Figura 34 - Representação em *ball and stick* do Peptídeo NLS FEN1, em rosa escuro, com resíduos dos sítios de ligação da Impα, em amarelo, rosa claro e ciano, respectivamente. A: Resíduos da Impα que fazem interação hidrofóbica, são mostrados em amarelo. B: Resíduos da Impα que fazem ligação de hidrogênio são mostrados em rosa claro. C: Resíduos da Impα que fazem tanto interação hidrofóbica, como ligação de hidrogênio são mostrados em ciano.

5. DISCUSSÃO

5.1. Ku80NLS:Imp α

O peptídeo NLS da Ku80 é uma sequência monopartida clássica em que os nove resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos 561-569, foram identificados como a região mínima exigida para o transporte ideal dessa proteína para o núcleo (Koike *et al.*, 1999a). Também foi demonstrado que a NLS Ku80 foi reconhecida e transportada para o núcleo celular pelo complexo formado pelo heterodímero Importina- α/β , mas não pode ser transportada para o núcleo apenas através de uma das formas da Importina (Imp α ou Imp β) (Koike *et al.*, 1999a).

Em nossa estrutura cristalina, o complexo Ku80NLS:Imp α , o peptídeo NLS da Ku80 liga-se à Imp α com os resíduos de Lisina nas posições P2, P3 e P5 (KKXK), de acordo com o consenso NLS monopartido: KR/KXR/K. (Gorlich *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 2003a). Além disso, a sequência NLS da Ku80 possui exatamente a mesma sequência NLS monopartida estudada da SV40 (KKXK) nas posições P2, P3 e P5, respectivamente. A superposição dos átomos de C α entre o peptídeo Ku80 e o peptídeo SV40 fornece um desvio r.m.s. de 0,43 Å. Dessa maneira, constata-se que a Ku80 liga-se à Imp α usando uma NLS monopartida e pode ser transportada sozinha (independentemente de Ku70) para o núcleo celular, através da via clássica, mediada pelo heterodímero Importina- α/β .

Cabe ressaltar que apesar da estrutura cristalina do complexo heterodimérico da Ku70/Ku80 ter sido resolvida, as regiões C-terminal das duas moléculas que contêm as NLSs não puderam ser modeladas (Walker *et al.*, 2001). As regiões C-terminais de ambas as moléculas, foram resolvidas posteriormente por técnicas de RMN, mas novamente as regiões contendo as NLSs não foram elucidadas devido a sua alta flexibilidade. Estes resultados estão em completo acordo com as expectativas que NLSs são encontradas em regiões flexíveis das proteínas, facilitando a ligação a NLS Imp α (Stewart, 2007).

Alguns estudos sugerem que as proteínas Ku70 e Ku80 são transportadas para o núcleo como um complexo heterodimérico (Koike, 2002). Este complexo possui uma topologia assimétrica (Koike & Koike, 2005) com a região C-terminal da Ku80 mais longa do que a mesma região para a Ku70, portanto, o complexo poderia se ligar a Imp α usando apenas a NLS da Ku80. No entanto, as proteínas também

podem ser transportadas para o núcleo de forma independente, proporcionando um meio poderoso de regulação para as suas respectivas funções como um heterodímero ou por conta própria (Bertinato *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2001). Essas proteínas podem apresentar funções exclusivas que são independentes umas das outras (Seki *et al.*, 1997). O transporte nuclear poderia, portanto, representam um importante mecanismo de regulação da função fisiológica de proteínas Ku (Seki *et al.*, 1997).

5.2. FEN1NLS:Imp α

O peptídeo NLS da FEN1 é uma sequência bipartida clássica em que os quatorze resíduos de sua sequência, correspondentes aos resíduos 355-368 da sequência da FEN1, foram identificados como a região mínima exigida para o transporte ideal dessa proteína para o núcleo (Qiu *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a NLS FEN1 foi reconhecida e transportada para o núcleo celular pelo complexo formado pelo heterodímero Importina- α/β , mas não pode ser transportada para o núcleo apenas através de uma forma da Importina (Imp α ou Imp β).

Em nossa estrutura cristalina, o complexo FEN1NLS:Imp α , o peptídeo liga-se à Imp α no sítio principal (S_1) com os resíduos de lisina (K) nas posições P₂, P₃ e P₅ (KKXK), e ao sítio secundário (S_2) com um resíduo de lisina (K) na posição P1' e com um resíduo de arginina (R) na posição P2', além de uma região *linker* de 10 resíduos entre esses sítios. Esses resultados estão de acordo com o consenso NLS bipartido KRX₁₀₋₁₂KRXK (Fontes *et al.*, 2003a).

A sequência NLS da proteína FEN1, em comparação com outras sequências bipartidas, como a N₁N₂ (Fontes *et al.*, 2003a), Nucleoplasmina (Fontes *et al.*, 2000) e RB (Fontes *et al.*, 2003a) resolvidas anteriormente possuem similaridade em relação ao sítio S_1 , apresentando a mesma sequência neste sítio (KKXK) nas posições P₂, P₃ e P₅, respectivamente. A superposição dos átomos de C α entre esses peptídeos com o peptídeo FEN1 nos fornece um desvio r.m.s. 0,18; 0,36 e 0,32 Å, respectivamente. Para o sítio S_2 também ocorre essa similaridade (KRX) nas posições de P1' e P2', sendo o desvio r.m.s. para essa região em comparação com esses peptídeos são, 0,10; 0,5 e 0,09 Å, respectivamente.

Devido ao tamanho da nuclease FEN-1 ser relativamente pequeno, 43 kDa, supôs-se que tal proteína pudesse se difundir passivamente através dos poros nucleares. Entretanto, comparando com ovalbumina, que tem tamanho similar e baixa taxa de difusão, mostra que provavelmente ocorre algo similar com a FEN1, isto é baixa taxa de difusão passiva (Featherstone *et al.*, 1988). A FEN-1 é uma nuclease multifuncional, componente central e crítico tanto para a replicação como para a via de reparo do DNA (Gloor *et al.*). Ambos os processos podem exigir um transporte rápido da nuclease do citoplasma para o núcleo em resposta a síntese de DNA celular e danos (Qiu *et al.*, 2001), e para isso é importante o controle do seu deslocamento, por intermédio de um transportador como o heterodímero importina- α/β .

A estrutura da FEN1 complexada a DNA foi elucidada recentemente, indicando motivos conservados na estrutura que se ligam e abrem a dupla fita de DNA, possibilitando o reparo (Tsutakawa *et al.*, 2011), entretanto o C-terminal onde é encontrada uma NLS, foi truncado em virtude da alta flexibilidade da região. Resultados obtidos da co-cristalização do NLS da FEN1 com Imp α confirmaram que a FEN1 é capaz de ligar-se à Imp α usando uma NLS bipartida pode ser transportada para o núcleo celular, através da via clássica, mediada pelo heterodímero Importina- α/β .

5.2.1. A ligação da região do *linker* do peptídeo bipartido NLS FEN1 à Imp α

A comparação da região de *linker* do complexo FEN1NLS:Imp α com os complexos NLSs bipartidos N₁N₂ (Fontes *et al.*, 2003a), Nucleoplasmina (Fontes *et al.*, 2000) e RB (Fontes *et al.*, 2003a) com a Imp α de *Mus musculus*, resolvidos anteriormente (Tabelas 12 e 13), mostram resíduos na Imp α que se repetem em ligações com os peptídeos para os diferentes complexos, dentre os quais: R238, W273, Y277, T311 e R315. Conforme observado por Fontes e colaboradores (Fontes *et al.*, 2000), nos complexos NLSs bipartidos, regiões de resíduos que se ligam a resíduos estritamente conservados na Imp α de *Mus musculus* como a R315 (arm 6), Y277 (arm 5) e R238 (arm 4) possuem uma importância fundamental para a ligação dos peptídeos e os resíduos R315 e Y277 apresentam uma importância similar a do arranjo Trp-Asn para os sítios principais e secundários. A estrutura com complexo FEN1NLS:Imp α reforça este fato. Além disso, com as comparações

efetuadas entre peptídeos, os resíduos W273 e T311 da Imp α também se mostraram importantes no ancoramento da região de *linker* desses peptídeos na Imp α .

Os contatos importantes do *linker* do peptídeo FEN1 com a Imp α são os resíduos K359, K362, G363 e S364, os quais realizaram interações hidrofóbicas com resíduos da Imp α e os resíduos E360, P361, S364 e T365 que realizaram ligações de hidrogênio com os resíduos da Imp α . Como verificado anteriormente por Fontes e colaboradores (Fontes *et al.*, 2003a), alguns contatos importantes para o *linker* são os situados próximo da região do sítio S₁, visto que essa é a região mais conservada estruturalmente entre os peptídeos N₁N₂, Nucleoplasmina e RB. Mapas de densidade eletrônica para essa região também apresentaram qualidade superior, quando comparado ao restante do *linker*, para essas estruturas. A estrutura do complexo FEN1NLS:Imp α possui melhor resolução dentre as estruturas contendo NLSs bipartidos e os resíduos foram modelados sem ambiguidade dentro de sua densidade eletrônica. As regiões de contatos próximos ao sítio principal também se repetem para a estrutura do peptídeo NLS FEN1 e além disso, resíduos antes da posição P1' e depois de P4' no peptídeo NLS FEN1 realizam interações hidrofóbicas que se mostraram importantes para a ligação do sítio secundário (Fontes, 2002) (Tabela 12).

Devido ao *linker* do peptídeo FEN1 ter somente 10 resíduos, o peptídeo liga-se a Imp α com uma conformação mais estendida que é aparentemente mais favorável para a ligação com a Imp α do que peptídeos que possuem de 11-12 resíduos, como por exemplo, o *linker* do peptídeo N₁N₂. A presença de resíduos adicionais pode aumentar a flexibilidade da região NLS, o que poderia deixar a cadeia do peptídeo distante da proteína para interações favoráveis.

Tabela 11 - Interações hidrofóbicas entre o peptídeo NLS e a Impα nos sítios de ligação principal (S₁) e secundário (S₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo NLS:Impα		N ₁ N ₂	Nucleoplasmina	RB	FEN1
		K ⁵³⁶ :A ³⁶⁴ K ⁵³⁶ :S ⁴⁰⁶		G ⁸⁶⁰ :A ³⁶⁴	A ³⁵⁴ :A ³⁶⁴
Sítio Secundário (S ₂)	P1'				
	P2'	R ⁵³⁸ :W ³⁹⁹	R ¹⁵⁶ :W ³⁹⁹	R ⁸⁶² :W ³⁹⁹	R ³⁵⁶ :W ³⁹⁹
	P3'	K ⁵³⁹ :T ³²²	P ¹⁵⁷ :T ³²²		K ³⁵⁷ :T ³²²
	P4'	T ⁵⁴⁰ :W ³⁵⁷		A ⁸⁶⁴ :W ³⁵⁷	
					P ³⁵⁹ :R ³¹⁵ P ³⁵⁹ :W ³⁵⁷
			T ¹⁶⁰ :R ³¹⁵		
		P ⁵⁴⁵ :W ²⁷³ P ⁵⁴⁵ :T ³¹¹ P ⁵⁴⁵ :Y ²⁷⁷	K ¹⁶¹ :W ²⁷³ K ¹⁶¹ :T ³¹¹		
	Linker				K ³⁶² :W ²⁷³ K ³⁶² :T ³¹¹ K ³⁶² :N ³⁵⁰ K ³⁶² :R ³¹⁵
		K ⁵⁴⁷ :W ²⁷³ K ⁵⁴⁷ :R ³¹⁵ K ⁵⁴⁷ :Y ²⁷⁷ K ⁵⁴⁷ :R ²³⁸	A ¹⁶³ :W ²⁷³		G ³⁶³ :W ²⁷³
				K ⁸⁷¹ :R ²³⁸ K ⁸⁷¹ :R ²³⁸	S ³⁶⁴ :Y ²⁷⁷
			Q ¹⁶⁵ :R ²³⁸		
					K ³⁶⁶ :W ²³¹ K ³⁶⁶ :R ²³⁸
Sítio Principal (S ₁)	P1				
	P2	K ⁵⁵¹ :D ¹⁹² K ⁵⁵¹ :S ¹⁴⁹ K ⁵⁵² :W ²³¹	K ¹⁶⁷ :D ¹⁹² K ¹⁶⁷ :S ¹⁴⁹ K ¹⁶⁸ :W ²³¹ K ¹⁶⁸ :N ¹⁴⁶	K ⁸⁷⁴ :D ¹⁹² K ⁸⁷⁴ :S ¹⁴⁹ K ⁸⁷⁵ :W ²³¹	K ³⁶⁷ :D ¹⁹² K ³⁶⁷ :S ¹⁴⁹ K ³⁶⁸ :W ²³¹ K ³⁶⁸ :W ¹⁸⁴
	P3				
	P4	S ⁵⁵³ :W ¹⁸⁴ S ⁵⁵³ :S ¹⁴⁹	K ¹⁶⁹ :S ¹⁴⁹ K ¹⁶⁹ :P ¹¹⁰	L ⁸⁷⁶ :W ¹⁸⁴ L ⁸⁷⁶ :S ¹⁴⁹ L ⁸⁷⁶ :N ¹⁴⁶	A ³⁶⁹ :W ¹⁸⁴
	P5	K ⁵⁵⁴ :W ¹⁸⁴ K ⁵⁵⁴ :W ¹⁴²	K ¹⁷⁰ :W ¹⁸⁴ K ¹⁷⁰ :N ¹⁴⁶ K ¹⁷⁰ :S ¹⁴⁹	R ⁸⁷⁷ :W ¹⁸⁴ R ⁸⁷⁷ :W ¹⁴²	K ³⁷⁰ :W ¹⁸⁴ K ³⁷⁰ :W ¹⁴²
					K ³⁷⁰ :Q ¹⁸¹

Tabela 12 – Interações do tipo ligações de hidrogênio entre os peptídeos NLSs e a Impa nos sítios de ligação principal (S₁) e secundário (S₂). Em vermelho foram destacadas interações comuns aos modelos.

Complexo NLS:Impa		N ₁ N ₂		Nucleoplasmina		RB		FEN1	
Cadeia do ligante		PRINCIPAL	LATERAL	PRINCIPAL	LATERAL	PRINCIPAL	LATERAL	PRINCIPAL	LATERAL
Sítio Secundário (S ₂)	P1'		K ⁵³⁶ :N ⁴⁰³	K ¹⁵⁵ :N ³⁶¹		K ⁸⁶¹ :V ³²¹ K ⁸⁶¹ :T ³²⁸		K ³⁵⁵ :N ³⁶¹ K ³⁵⁵ :V ³²¹ K ³⁵⁵ :T ³²⁸	
	P2'	R ⁵³⁸ :N ³⁶¹	R ⁵³⁸ :E ³⁹⁶ R ⁵³⁸ :S ³⁶⁰	R ¹⁵⁶ :E ³⁹⁶		R ⁸⁶² :N ³⁶¹	R ⁸⁶² :E ³⁹⁶	R ³⁵⁶ :N ³⁶¹	R ³⁵⁶ :E ³⁹⁶ R ³⁵⁶ :S ³⁶⁰
	P3'	R ⁵³⁸ :W ³⁵⁷	K ⁵³⁹ :G ²⁸¹ K ⁵³⁹ :T ³²²	R ¹⁵⁶ :W ³⁵⁷		R ⁸⁶² :W ³⁵⁷			K ³⁵⁷ :G ²⁸¹ K ³⁵⁷ :T ³²²
	P4'		T ⁴⁴⁰ :N ²⁸⁰						
				P ¹⁵⁹ :R ³¹⁵				E ³⁶⁰ :K ³⁵³ P ³⁶¹ :R ³¹⁵	
			K ⁵⁴⁷ :S ²⁷⁶						
Linker		D ⁵⁴⁸ :R ²³⁸				K ⁸⁷¹ :R ²³⁸	K ⁸⁷¹ :Y ²⁷⁷	S ³⁶⁴ :Y ²⁷⁷ S ³⁶⁴ :R ²³⁸ S ³⁶⁴ :D ²⁷⁰ T ³⁶⁵ :W ²³¹	
Sítio Principal (S ₁)	P1	K ⁵⁵⁰ :N ²³⁵		K ¹⁶⁶ :N ²³⁵		K ⁸⁷² :R ²³⁸ L ⁸⁷³ :N ²³⁵		K ³⁶⁶ :N ²³⁵	
	P2		K ⁵⁵¹ :G ¹⁵⁰ K ⁵⁵¹ :D ¹⁹² K ⁵⁵¹ :T ¹⁵⁵	K ¹⁶⁷ :G ¹⁵⁰ K ¹⁶⁷ :D ¹⁹² K ¹⁶⁷ :T ¹⁵⁵		K ⁸⁷⁴ :G ¹⁵⁰ K ⁸⁷⁴ :D ¹⁹² K ⁸⁷⁴ :T ¹⁵⁵		K ³⁶⁷ :N ¹⁸⁸ K ³⁶⁷ :G ¹⁵⁰ K ³⁶⁷ :D ¹⁹² K ³⁶⁷ :T ¹⁵⁵	
	P3	K ⁵⁵² :N ¹⁸⁴ K ⁵⁵² :W ¹⁸⁸		K ¹⁶⁸ :W ¹⁸⁴ K ¹⁶⁸ :N ¹⁸⁸		K ⁸⁷⁵ :W ¹⁸⁴ K ⁸⁷⁵ :N ¹⁸⁸		K ³⁶⁸ :W ¹⁸⁴ K ³⁶⁸ :N ¹⁸⁸	
	P4			K ¹⁶⁸ :N ²²⁸					K ³⁶⁸ :N ²²⁸
	P5	K ⁵⁵⁴ :W ¹⁴² K ⁵⁵⁴ :N ¹⁴⁶		K ¹⁷⁰ :W ¹⁴⁶		K ⁸⁷⁷ :N ¹⁴² K ⁸⁷⁷ :W ¹⁴⁶		K ³⁷⁰ :N ¹⁴² K ³⁷⁰ :W ¹⁴⁶	
			K ⁵⁵⁴ :Q ¹⁸¹			K ⁸⁷⁷ :S ¹⁰⁵	K ⁸⁷⁷ :Q ¹⁸¹		

5.3. Sítios de ligação da Imp α

Comparando as sequências dos complexos resolvidos nesse trabalho com resolvidos anteriormente, pode-se notar que os resíduos presentes em ambos os sítios básicos NLS, sítio S₁ de P1-P5 e o sítio S₂ de P1'-P4', são essencialmente idênticos em todas as estruturas, com exceção das sequências da AR e PLSCR1, as quais não possuem R/K na sua posição P3, conforme a tabela 13.

Tabela 13 – Peptídeos NLS e sítios de ligação da Imp α , sítio principal (S₁) P1-P5 e sítio secundário (S₂) P1'-P4'. Regiões sinalizadas completamente em amarelo são resíduos hidrofóbicos, com hachuras amarelas indicam resíduos básicos, azul indicam resíduos ácidos e rosas são os resíduos polares neutros; resíduos em vermelho indicam posições mais importantes e em cinza que não se ligaram ao sítio indicado. Siglas correspondem aos peptídeos NLS presentes em estruturas da Imp α elucidadas por cristalografia.

Proteínas	S ₂					S ₁									
	P1'	P2'	P3'	P4'	Linker	P1	P2	P3	P4	P5					
Ku80						E	D	G	P	T	A	K	K	L	K
FEN1	S	S	A	K	R	K	E		P	E	P	K	G	S	T
Ku70		K	V	T	K	R	K	H	D	N	E	G	S	G	S
SV40											A	A	P	P	K
AR			R	K	C	Y	E	A	G	M	T	L	G	A	R
PLSCR1														G	K
Nucleop1	A	V	K	R	P	A			A	T	K	K	A	G	Q
RB		K	R	S	A		E	G	S	N	P	P	K	P	L
N1N2	R	K	K	R	K	T	E	E	E	S	P	L	K	D	K
c-Myc		K	R	V	K	L							P	A	A
Consenso	R/	R/												K	R/
	K	K												K	K

SV40, Antígeno T do vírus símio 40 (Fontes *et al.*, 2000); AR, receptor de andrógeno (Cutress *et al.*, 2008); PLSCR1, Proteína *Phospholipid scramblase 1* (Chen *et al.*, 2005); Nucleop1, nucleoplasmina (Fontes *et al.*, 2000); RB, proteína retinoblastoma (Fontes *et al.*, 2003a); N1N2, *X. laevis* phosphoprotein N1N2, Proteína ligadora de histona (Fontes *et al.*, 2003a); c-Myc, proteína proto-oncogenese (Conti & Kuriyan, 2000). O consenso é de (Chelsky *et al.*, 1989).

As posições que são melhor definidas e consistentes entre as estruturas disponíveis são P2-P5 no sítio principal e P1'-P2' no sítio secundário da Imp α , que podem ser explicadas ao analisar o sítio de ligação para os aminoácidos individuais. Os pares de triptofanos conservados das repetições vizinhas criam sítios de ligação para as cadeias laterais nas posições P2', P3 e P5, selecionando desta maneira cadeias alifáticas longas. Cargas positivas são equilibradas a curta distância nas posições P2', P4' e P2, e com mais longo alcance nas posições P1', P3 e P5. Essas cargas também são neutralizadas pelo dipolo das hélices H3 nas posições P1', P3', P1, P2 e P4. Assim, aminoácidos positivamente carregados serão equilibrados não somente nas posições P2' e P2, mas também nas posições P1', P3 e P5 (Fontes *et*

al., 2000). Esse padrão reproduz inteiramente o consenso determinado pela análise da sequência de muitos NLS e por estudos de mutações (Chelsky *et al.*, 1989; Dingwall & Laskey, 1991; Fontes *et al.*, 2000).

Experimentos realizados por Kosugi e colaboradores (Kosugi *et al.*, 2008) na tentativa de desenvolver peptídeos bipartidos artificiais, com a função de inibir o processo de Importação nuclear, confirmou como característica essencial que uma NLS ideal deve apresentar, em relação ao sítio principal (S_1), as posições P2 e P5, onde P2 deve ser ocupada exclusivamente por uma lisina, que permite a formação de ligações de hidrogênios com resíduos e pontes salinas com os resíduos conservados G150, T55 e D192 da Imp α . Já para a posição P5, a interação hidrofóbica com os carbonos da cadeia lateral do ligante tem destaque, e dessa maneira, a ocupação dessa posição por lisina ou arginina não resulta em grandes diferenças, pois ambas apresentam cadeias laterais longas que realizam as interações hidrofóbicas com os W 142 e 184 e realizam ponte salinas com o resíduo Q181 da Imp α . A presença de resíduo hidrofóbicos em P3 ou P4 ajuda a manter a superfície de contato entre peptídeo e Imp α . Nessas posições, a formação de ligações de hidrogênio com átomos da cadeia principal são mais importantes que com suas cadeias laterais, por isso não é essencial a ocupação dessa região com resíduos de cadeias longas, entretanto, melhores resultados de afinidade são obtidos quando essas regiões são preenchidas por esse tipo de resíduos (Takeda, 2009).

No sítio secundário de ligação, P1' e P2' são consideradas posições muito importantes. Em P2', a interação hidrofóbica com os carbonos da cadeia lateral do ligante tem destaque, desta maneira, a ocupação dessa posição por lisina ou arginina não resulta em grandes diferenças, ambas apresentam cadeias laterais longas que realizam as interações hidrofóbicas com os W 399 e 357 da Imp α (Takeda, 2009).

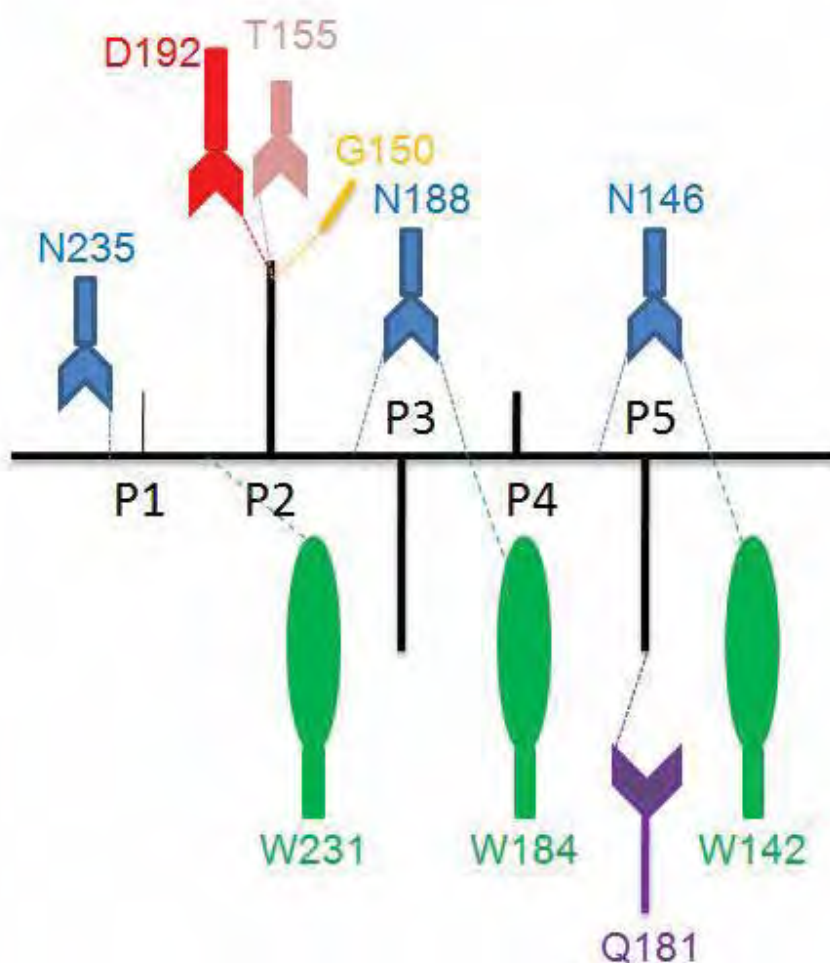


Figura 35 – Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS Ku80 com a Impα no sítio principal de ligação (S₁). A cadeia principal é mostrada com uma linha preta, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Impα. Cadeias laterais de resíduos da Impα que interagem com o peptídeo são indicadas em: letras D representam o ácido aspártico, N a asparagina, W o triptofano, T a treonina, G a glicina e Q a glutamina.

Nesse trabalho, tanto os peptídeos NLSs Ku80 e FEN1 se ligaram ao sítio principal de maneira esperada, conforme demonstrado na figura 35. O peptídeo NLS Ku80 possui uma sequência ⁵⁶³AKKLK⁵⁶⁷ localizada na posição P1-P5 do sítio principal. Os pares de triptofanos W231, W184 e W142 conservados das repetições vizinhas criam sítios de ligação para as cadeias laterais das lisinas nas posições P3 e P5. A carga positiva da lisina é equilibrada a curta distância na posição P2, e, a mais longo alcance nas posições P3 e P5. A carga positiva da lisina de P2 foi também neutralizada pelo dipolo das hélices H3 nesta posição.

O peptídeo NLS bipartido FEN1 possui uma sequência ³⁶⁵KKKAK³⁷¹ localizada na posição P1-P5 do sítio principal e uma sequência ³⁵⁴KRKE³⁵⁹

localizada na posição P1'-P4' do sítio secundário. No sítio principal, as interações realizadas foram idênticas com o complexo com o peptídeo NLS monopartido Ku80.

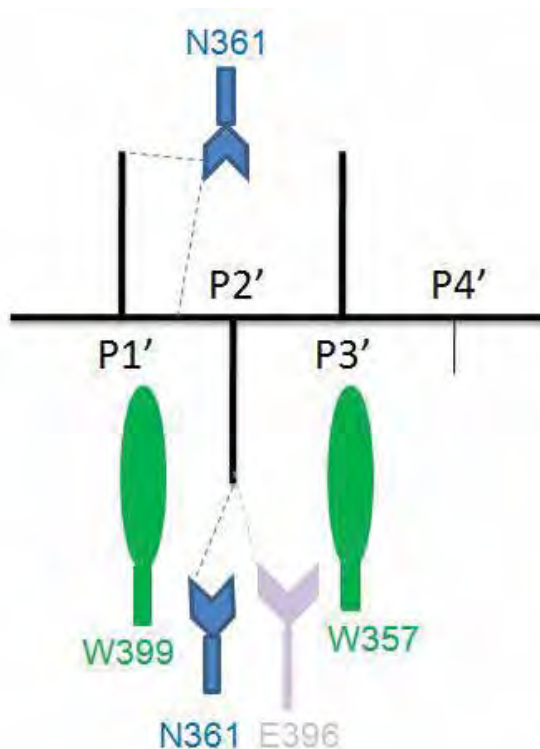


Figura 36 – Diagrama das interações realizadas entre os resíduos do peptídeo NLS FEN1 com a Impα no sítio secundário de ligação (S₂). A cadeia principal é mostrada com uma linha preta, com as cadeias laterais mostradas perpendiculares a esta. Tracejado indica ligação de hidrogênio entre o peptídeo e a Impα. Cadeias laterais de resíduos da Impα que interagem com o peptídeo são indicadas, letras N representam a asparagina, W o triptofano e o E ácido glutâmico.

No sítio secundário, os pares de triptofanos W 399 e 357 conservados das repetições vizinhas criam sítios de ligação para as cadeias laterais nas posições P2', selecionando desta maneira cadeias longas. As cargas positivas são equilibradas nas posições P1' e P2' e também neutralizadas pelo dipolo das hélices H3 nas posições P1', P3'. Diante dos resultados apresentados, os peptídeos NLSs em estudo nesta dissertação, comprovam as características essenciais propostas em trabalhos anteriores (Fontes *et al.*, 2000; Fontes *et al.*, 2003a; Kosugi *et al.*, 2008; Takeda, 2009)

6. CONCLUSÕES

O peptídeo NLS Ku80, relacionado ao reparo NHEJ, ligou-se à Imp α de maneira similar ao NLS do antígeno T da SV40, no sítio de ligação principal (S₁), confirmando ser uma sequência monopartida clássica. Já o peptídeo NLS FEN1, relacionado ao reparo BER, ligou-se tanto ao sítio S₁ como ao sítio secundário (S₂), comprovando ser uma sequência bipartida. Além disso, a região de *linker* do peptídeo FEN1 com somente 10 resíduos, possibilitou uma melhor ligação com a Imp α com uma conformação mais estendida e possivelmente mais favorável para a ligação com a Imp α do que peptídeos que possuem de 11-12 resíduos.

Posições específicas nos sítios de ligação foram confirmadas como essenciais, bem como resíduos da Imp α conservados nessas regiões, indicando a importância das interações intermoleculares nesses sítios. A elucidação do complexo FEN1NLS:Imp α proveu maiores informações a respeito da região denominada *linker* de uma NLS bipartida em virtude da qualidade dos dados obtidos. Resíduos da Imp α entre os sítios de ligação que interagem com o *linker*, possuem uma importância fundamental para a ligação de NLS por apresentarem uma importância similar a do arranjo Trp-Asn para os sítios principal e secundário proposto em estudos anteriores.

As informações obtidas nesse estudo indicam que as proteínas Ku80 e FEN1 podem ser transportadas de maneira independente para o núcleo através Imp α , pela chamada via clássica, sem a necessidade da formação de complexos com outras proteínas envolvidas em reparo. Novos estudos nessa área auxiliarão na compreensão do mecanismo de importação dessas proteínas que podem apresentar mais de uma atividade nuclear.

7. REFERÊNCIAS

- ADAM, E. J.; ADAM, S. A. Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. **J Cell Biol**, v.125, p.547-55. 1994.
- AKEY, C. W.; RADERMACHER, M. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. **J Cell Biol**, v.122, p.1-19. 1993.
- ALBERT, I.; MAVRICH, T. N.; TOMSHO, L. P.; QI, J.; ZANTON, S. J.; SCHUSTER, S. C.; PUGH, B. F. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nature**, v.446, p.572-6. 2007.
- ANDRADE, M. A.; BORK, P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. **Nat Genet**, v.11, p.115-6. 1995.
- ANDRADE, M. A.; PETOSA, C.; O'DONOGHUE, S. I.; MULLER, C. W.; BORK, P. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. **J Mol Biol**, v.309, p.1-18. 2001.
- ASAGOSHI, K.; TANO, K.; CHASTAIN, P. D., 2ND; ADACHI, N.; SONODA, E.; KIKUCHI, K.; KOYAMA, H.; NAGATA, K.; KAUFMAN, D. G.; TAKEDA, S.; WILSON, S. H.; WATANABE, M.; SWENBERG, J. A.; NAKAMURA, J. FEN1 functions in long patch base excision repair under conditions of oxidative stress in vertebrate cells. **Mol Cancer Res**, v.8, p.204-15.
- BAILEY, S. M.; MEYNE, J.; CHEN, D. J.; KURIMASA, A.; LI, G. C.; LEHNERT, B. E.; GOODWIN, E. H. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.14899-904. 1999.
- BAYLISS, R.; LITTLEWOOD, T.; STEWART, M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. **Cell**, v.102, p.99-108. 2000.
- BECK, M.; FORSTER, F.; ECKE, M.; PLITZKO, J. M.; MELCHIOR, F.; GERISCH, G.; BAUMEISTER, W.; MEDALIA, O. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. **Science**, v.306, p.1387-90. 2004.
- BERTINATO, J.; SCHILD-POULTER, C.; HACHE, R. J. Nuclear localization of Ku antigen is promoted independently by basic motifs in the Ku70 and Ku80 subunits. **J Cell Sci**, v.114, p.89-99. 2001.
- BREEUWER, M.; GOLDFARB, D. S. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. **Cell**, v.60, p.999-1008. 1990.
- BRIEGER, A.; PLOTZ, G.; RAEDLE, J.; WEBER, N.; BAUM, W.; CASPARY, W. F.; ZEUZEM, S.; TROJAN, J. Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. **Mol Carcinog**, v.43, p.51-8. 2005.
- The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.50, p.760-3. 1994.
- CHELSKY, D.; RALPH, R.; JONAK, G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. **Mol Cell Biol**, v.9, p.2487-92. 1989.

CHEN, M. H.; BEN-EFRAIM, I.; MITROUSIS, G.; WALKER-KOPP, N.; SIMS, P. J.; CINGOLANI, G. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. **J Biol Chem**, v.280, p.10599-606. 2005.

CHI, N. C.; ADAM, E. J.; ADAM, S. A. Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. **J Cell Biol**, v.130, p.265-74. 1995.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. **Nature**, v.399, p.230-7. 1999.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Curr Opin Struct Biol**, v.11, p.703-15. 2001.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v.193, p.3-34. 2003.

CHRISTOPHE, D.; CHRISTOPHE-HOBERTUS, C.; PICHON, B. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? **Cell Signal**, v.12, p.337-41. 2000.

CINGOLANI, G.; BEDNENKO, J.; GILLESPIE, M. T.; GERACE, L. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. **Mol Cell**, v.10, p.1345-53. 2002.

CINGOLANI, G.; PETOSA, C.; WEIS, K.; MULLER, C. W. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. **Nature**, v.399, p.221-9. 1999.

CONTI, E.; IZAURRALDE, E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. **Curr Opin Cell Biol**, v.13, p.310-9. 2001.

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

CONTI, E.; MULLER, C. W.; STEWART, M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. **Curr Opin Struct Biol**, v.16, p.237-44. 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 alpha. **Cell**, v.94, p.193-204. 1998.

COOK, A.; BONO, F.; JINEK, M.; CONTI, E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v.76, p.647-71. 2007.

COSTA, R. M.; CHIGANCAS, V.; GALHARDO RDA, S.; CARVALHO, H.; MENCK, C. F. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v.85, p.1083-99. 2003.

CUTRESS, M. L.; WHITAKER, H. C.; MILLS, I. G.; STEWART, M.; NEAL, D. E. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **J Cell Sci**, v.121, p.957-68. 2008.

DEVOS, D.; DOKUDOVSKAYA, S.; ALBER, F.; WILLIAMS, R.; CHAIT, B. T.; SALI, A.; ROUT, M. P. Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. **PLoS Biol**, v.2, p.e380. 2004.

DIKOMEY, E.; DAHM-DAPHI, J.; BRAMMER, I.; MARTENSEN, R.; KAINA, B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. **Int J Radiat Biol**, v.73, p.269-78. 1998.

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

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

DOMBROVSKY, L.; DONG, A.; WERNIMONT, A.; LOPPNAU, P.; BOUNTRA, C.; WEIGELT; ARROWSMITH, C.H.; EDWARDS, A.M.; MIN, J.; WU, H. Crystal structure of MutL protein homolog 1 isoform 1 [Homo Sapiens]. DOI: 10.2210/pdb3rbn/pdb. 2011.

DOWNS, J. A.; JACKSON, S. P. A means to a DNA end: the many roles of Ku. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5, p.367-78. 2004.

DRENTH, J. **Principles of protein X-ray crystallography**
New York: Springer-Verlag. 1994. 311 p.

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

FAN, J.; WILSON, D. M., 3RD. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. **Free Radic Biol Med**, v.38, p.1121-38. 2005.

FANARA, P.; HODEL, M. R.; CORBETT, A. H.; HODEL, A. E. Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. **J Biol Chem**, v.275, p.21218-23. 2000.

FEATHERSTONE, C.; DARBY, M. K.; GERACE, L. A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. **J Cell Biol**, v.107, p.1289-97. 1988.

FELDHERR, C. M.; AKIN, D.; COHEN, R. J. Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. **J Cell Sci**, v.114, p.4621-7. 2001.

FONTES, M. R.; TEH, T.; JANS, D.; BRINKWORTH, R. I.; KOBE, B. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. **J Biol Chem**, v.278, p.27981-7. 2003a.

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

FONTES, M. R.; TEH, T.; RIELL, R. D.; PARK, S. B.; STANDAERT, R. F.; KOBE, B. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of importin-alpha complexed with NLS peptidomimetics. **Biochim Biophys Acta**, v.1750, p.9-13. 2005.

FONTES, M. R.; TEH, T.; TOTH, G.; JOHN, A.; PAVO, I.; JANS, D. A.; KOBE, B. Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. **Biochem J**, v.375, p.339-49. 2003b.

FONTES, M. R. D. M. Estudos estruturais com a Importina, um receptor de importação nuclear. (Livre docência). Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu, 2002. 78 p.

FRANK, G.; QIU, J.; ZHENG, L.; SHEN, B. Stimulation of eukaryotic flap endonuclease-1 activities by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is independent of its in vitro interaction via a consensus PCNA binding region. **J Biol Chem**, v.276, p.36295-302. 2001.

FRANKE, W. W.; SCHEER, U. Pathways of nucleocytoplasmic translocation of ribonucleoproteins. **Symp Soc Exp Biol**, p.249-82. 1974.

FUKUHARA, N.; FERNANDEZ, E.; EBERT, J.; CONTI, E.; SVERGUN, D. Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. **J Biol Chem**, v.279, p.2176-81. 2004.

GIFFIN, W.; TORRANCE, H.; RODDA, D. J.; PREFONTAINE, G. G.; POPE, L.; HACHE, R. J. Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. **Nature**, v.380, p.265-8. 1996.

GLOOR, J. W.; BALAKRISHNAN, L.; BAMBARA, R. A. Flap endonuclease 1 mechanism analysis indicates flap base binding prior to threading. **J Biol Chem**, v.285, p.34922-31.

GOLDFARB, D. S.; CORBETT, A. H.; MASON, D. A.; HARREMAN, M. T.; ADAM, S. A. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends Cell Biol**, v.14, p.505-14. 2004.

GORLICH, D. Transport into and out of the cell nucleus. **EMBO J**, v.17, p.2721-7. 1998.

GORLICH, D.; KOSTKA, S.; KRAFT, R.; DINGWALL, C.; LASKEY, R. A.; HARTMANN, E.; PREHN, S. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. **Curr Biol**, v.5, p.383-92. 1995a.

GORLICH, D.; KUTAY, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.15, p.607-60. 1999.

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

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

GORLICH, D.; PREHN, S.; LASKEY, R. A.; HARTMANN, E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell**, v.79, p.767-78. 1994.

GORLICH, D.; VOGEL, F.; MILLS, A. D.; HARTMANN, E.; LASKEY, R. A. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. **Nature**, v.377, p.246-8. 1995b.

GU, Y.; SEKIGUCHI, J.; GAO, Y.; DIKKES, P.; FRANK, K.; FERGUSON, D.; HASTY, P.; CHUN, J.; ALT, F. W. Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, p.2668-73. 2000.

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

GUIMARAES, B. G.; SANFELICI, L.; NEUENSCHWANDER, R. T.; RODRIGUES, F.; GRIZOLLI, W. C.; RAULIK, M. A.; PITON, J. R.; MEYER, B. C.; NASCIMENTO, A. S.;

POLIKARPOV, I. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **J Synchrotron Radiat**, v.16, p.69-75. 2009.

HAREL, A.; FORBES, D. J. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. **Mol Cell**, v.16, p.319-30. 2004.

HOSFIELD, D. J.; MOL, C. D.; SHEN, B.; TAINER, J. A. Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. **Cell**, v.95, p.135-46. 1998.

IMAMOTO, N.; TACHIBANA, T.; MATSUBAE, M.; YONEDA, Y. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. **J Biol Chem**, v.270, p.8559-65. 1995.

ITZHAKI, L. S.; LOWE, A. R. From Artificial Antibodies to Nanosprings: The Biophysical Properties of Repeat Proteins. **NCBI** 2000.

JANCARICK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.**, v.24, p.409-411. 1991.

JANS, D. A.; ACKERMANN, M. J.; BISCHOFF, J. R.; BEACH, D. H.; PETERS, R. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. **J Cell Biol**, v.115, p.1203-12. 1991.

JANS, D. A.; HUBNER, S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. **Physiol Rev**, v.76, p.651-85. 1996.

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

KEMINER, O.; SIEBRASSE, J. P.; ZERF, K.; PETERS, R. Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.11842-7. 1999.

KNUDSEN, N. O.; ANDERSEN, S. D.; LUTZEN, A.; NIELSEN, F. C.; RASMUSSEN, L. J. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. **DNA Repair (Amst)**, v.8, p.682-9. 2009.

KNUDSEN, N. O.; NIELSEN, F. C.; VINTHER, L.; BERTELSEN, R.; HOLTEN-ANDERSEN, S.; LIBERTI, S. E.; HOFSTRA, R.; KOOL, K.; RASMUSSEN, L. J. Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1). **Nucleic Acids Res**, v.35, p.2609-19. 2007.

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

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

KOIKE, M. Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. **J Radiat Res (Tokyo)**, v.43, p.223-36. 2002.

KOIKE, M.; IKUTA, T.; MIYASAKA, T.; SHIOMI, T. Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of Ku70 using its own nuclear localization signal. **Oncogene**, v.18, p.7495-505. 1999a.

KOIKE, M.; IKUTA, T.; MIYASAKA, T.; SHIOMI, T. The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. **Exp Cell Res**, v.250, p.401-13. 1999b.

KOIKE, M.; KOIKE, A. The Ku70-binding site of Ku80 is required for the stabilization of Ku70 in the cytoplasm, for the nuclear translocation of Ku80, and for Ku80-dependent DNA repair. **Exp Cell Res**, v.305, p.266-76. 2005.

KOIKE, M.; SHIOMI, T.; KOIKE, A. Dimerization and nuclear localization of ku proteins. **J Biol Chem**, v.276, p.11167-73. 2001.

KOSUGI, S.; HASEBE, M.; ENTANI, T.; TAKAYAMA, S.; TOMITA, M.; YANAGAWA, H. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. **Chem Biol**, v.15, p.940-9. 2008.

L. SANFELICI; F. DE MATTOS. Photon-beam stabilization systems for the MX2 beamline at LNLS. **Nuclear Instruments and Methods In Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**.

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

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

LANGE, A.; MILLS, R. E.; LANGE, C. J.; STEWART, M.; DEVINE, S. E.; CORBETT, A. H. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J Biol Chem**, v.282, p.5101-5. 2007.

LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J. A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR**, v.8, p.477-86. 1996.

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-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. **Science**, v.302, p.1571-5. 2003.

LEONG, V.; LORENOWICZ, J.; KOZIJ, N.; GUARNE, A. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutLalpha: redundancy is the key. **Mol Carcinog**, v.48, p.742-50. 2009.

LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res**, v.18, p.85-98. 2008.

LIPS, J.; KAINA, B. Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. **Mutat Res**, v.487, p.59-66. 2001.

LIU, W.; NICHOLS, A. F.; GRAHAM, J. A.; DUALAN, R.; ABBAS, A.; LINN, S. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. **J Biol Chem**, v.275, p.21429-34. 2000.

MACARA, I. G. Transport into and out of the nucleus. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.65, p.570-94, table of contents. 2001.

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

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. **EMBO J**, v.24, p.3681-9. 2005.

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

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

MELCHIOR, F.; PASCHAL, B.; EVANS, J.; GERACE, L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. **J Cell Biol**, v.123, p.1649-59. 1993.

MODRICH, P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. **J Biol Chem**, v.281, p.30305-9. 2006.

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

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

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.53, p.240-55. 1997.

NADLER, S. G.; TRITSCHLER, D.; HAFFAR, O. K.; BLAKE, J.; BRUCE, A. G.; CLEVELAND, J. S. Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. **J Biol Chem**, v.272, p.4310-5. 1997.

NAVAZA, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. **Acta Cryst.**, v.A50, p.157-163. 1994.

OCHI, T.; SIBANDA, B. L.; WU, Q.; CHIRGADZE, D. Y.; BOLANOS-GARCIA, V. M.; BLUNDELL, T. L. Structural biology of DNA repair: spatial organisation of the multicomponent complexes of nonhomologous end joining. **J Nucleic Acids**, v.2010.

OHNO, M.; FORNEROD, M.; MATTATJ, I. W. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. **Cell**, v.92, p.327-36. 1998.

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

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

PETERS, R. Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. **Traffic**, v.6, p.421-7. 2005.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v.15, p.289-302. 2000.

POLIKARPOV, I.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R. C.; ARRUDA, P.; LEITE, A.; CRAIEVICH, A. The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source. . **Nucl Instrum Methods A** v.405, p.159-164. 1997.

POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; DE OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R. C.; CRAIEVICH, A. Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **J Synchrotron Radiat**, v.5, p.72-6. 1998.

POTTERTON, E.; BRIGGS, P.; TURKENBURG, M.; DODSON, E. A graphical user interface to the CCP4 program suite. **Acta. Cryst.**, v.D59, p.1131-1137. 2003.

QIU, J.; LI, X.; FRANK, G.; SHEN, B. Cell cycle-dependent and DNA damage-inducible nuclear localization of FEN-1 nuclease is consistent with its dual functions in DNA replication and repair. **J Biol Chem**, v.276, p.4901-8. 2001.

RADU, A.; BLOBEL, G.; MOORE, M. S. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, p.1769-73. 1995.

REICHELT, R.; HOLZENBURG, A.; BUHLE, E. L., JR.; JARNIK, M.; ENGEL, A.; AEBI, U. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. **J Cell Biol**, v.110, p.883-94. 1990.

RIBBECK, K.; GORLICH, D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. **EMBO J**, v.20, p.1320-30. 2001.

RIBBECK, K.; LIPOWSKY, G.; KENT, H. M.; STEWART, M.; GORLICH, D. NTF2 mediates nuclear import of Ran. **EMBO J**, v.17, p.6587-98. 1998.

RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v.407, p.777-83. 2000.

RIGGLEMAN, B.; WIESCHAUS, E.; SCHEDL, P. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene. **Genes Dev**, v.3, p.96-113. 1989.

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

ROUT, M. P.; AITCHISON, J. D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B. T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **J Cell Biol**, v.148, p.635-51. 2000.

SEKI, T.; TADA, S.; KATADA, T.; ENOMOTO, T. Cloning of a cDNA encoding a novel importin- α homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. **Biochem Biophys Res Commun**, v.234, p.48-53. 1997.

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

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

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

SUNTHARALINGAM, M.; WENTE, S. R. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. **Dev Cell**, v.4, p.775-89. 2003.

TAKEDA, A. A. S. Estudos estruturais com a Importina alfa Genética, Instituto do Biociências - UNESP, Botucatu, 2009. 89 p.

TALCOTT, B.; MOORE, M. S. The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin alpha3/Qip. **J Biol Chem**, v.275, p.10099-104. 2000.

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

TRAN, E. J.; WENTE, S. R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. **Cell**, v.125, p.1041-53. 2006.

TSUTAKAWA, S. E.; CLASSEN, S.; CHAPADOS, B. R.; ARVAI, A. S.; FINGER, L. D.; GUENTHER, G.; TOMLINSON, C. G.; THOMPSON, P.; SARKER, A. H.; SHEN, B.; COOPER, P. K.; GRASBY, J. A.; TAINER, J. A. Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily. **Cell**, v.145, p.198-211.

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

WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature**, v.412, p.607-14. 2001.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng**, v.8, p.127-34. 1995.

WEIS, K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. **Cell**, v.112, p.441-51. 2003.

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

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

ZHANG, Z.; HU, W.; CANO, L.; LEE, T. D.; CHEN, D. J.; CHEN, Y. Solution structure of the C-terminal domain of Ku80 suggests important sites for protein-protein interactions. **Structure**, v.12, p.495-502. 2004.

ZHANG, Z.; ZHU, L.; LIN, D.; CHEN, F.; CHEN, D. J.; CHEN, Y. The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70. **J Biol Chem**, v.276, p.38231-6. 2001.

ZHENG, L.; JIA, J.; FINGER, L. D.; GUO, Z.; ZER, C.; SHEN, B. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer. **Nucleic Acids Res**, v.39, p.781-94.