

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE BOTUCATU

Guilherme Eiji Matsuno

**Expressão e Purificação de proteínas recombinantes do
organismo modelo *Neurospora crassa***

Botucatu - São Paulo

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE BOTUCATU

Guilherme Eiji Matsuno

**Expressão e Purificação de proteínas recombinantes do
organismo modelo *Neurospora crassa***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, em preenchimento aos
requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

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

Botucatu – São Paulo

2014

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

Matsuno, Guilherme Eiji.

Expressão e purificação de proteínas recombinantes do organismo modelo *Neurospora crassa* / Guilherme Eiji Matsuno. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Coorientador: Agnes Alessandra Sekijima Takeda
Capes: 20901003

1. *Neurospora crassa*. 2. Proteínas recombinantes. 3. Dicroísmo circular. 4. Análise cromatográfica. 5. Proteínas - Pesquisa.

Palavras-chave: Cromatografia; Dicroísmo circular; Expressão; *Neurospora crassa*.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida e pela força que me deu todos os dias nessa caminhada. Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes por disponibilizar a infra-estrutura e material para condução dos experimentos. Agradeço à minha co-orientadora Dr^a. Agnes Alessandra Sekijima Takeda pela supervisão em laboratório, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho e pelo paciente trabalho de revisão da redação.

Agradeço aos professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender; aos funcionários e ao departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu que me acolheu nesse período de graduação.

Agradeço à minha família: Minha mãe dona Elisa, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço; ao meu pai seu Albino pelo suporte; ao meu irmão André que esteve sempre ao meu lado; à minha namorada Jéssica por ter compreendido minhas ausências; aos meus amigos e colegas que vivenciei nesse período, pelos pensamentos positivos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

RESUMO

Organismos modelos são aqueles considerados representantes para atributos fundamentais dos reinos dos organismos ou mesmo da própria vida. Dentre os organismos modelo, os primeiros trabalhos de George W. Beadle e Edward L. Tatum com o fungo *Neurospora crassa* estimularam o uso de microorganismos e foi dado início a uma nova era, unindo genética e bioquímica. O fungo *N. crassa* é de fácil cultivo, apresentando maior complexidade morfológica e de desenvolvimento devido as suas características multicelulares. Além disso, muitas proteínas preditas são semelhantes às proteínas em animais, plantas e outros fungos filamentosos. Essas informações reforçam o potencial de *N. crassa* como modelo para elucidação de mecanismos bioquímicos e genéticos ainda desconhecidos. No entanto, 41% das proteínas analisadas são relacionadas com proteínas conhecidas. Outros 30% correspondem a proteínas hipotéticas sem semelhanças com proteínas depositadas em bancos de dados. Dentre as vias metabólicas alvo de estudo em *Neurospora*, uma característica interessante é o metabolismo do glicogênio. Sob condições de estresse a temperatura (*heat shock*), a concentração de glicogênio diminui, enquanto em leveduras o comportamento é oposto. Dessa maneira, estudos identificaram proteínas envolvidas nessas vias. A proteína Importina- α é importante devido ao seu papel de reconhecer proteínas a ser transportadas do citoplasma para o núcleo celular. Seu estudo é importante pois participa de transporte de proteínas envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio. Outra proteína é a NCU03482, a qual encontra-se identificada como proteína semelhante a helicase RuvB, que é responsável pela remodelagem da cromatina em humanos. Nesse trabalho, foram realizadas a expressão e purificação das proteínas recombinantes Importina- α (Imp- α) e NCU03482, bem como o experimento de dicroísmo circular com a amostra de Imp- α . Resultados indicam que as proteínas foram expressas em *Escherichia coli* com sucesso, bem como a purificação das mesmas. No entanto dentre as proteínas, a Imp- α foi obtida em concentração adequada para outros experimentos, enquanto a NCU03482 encontrou-se instável em solução, precipitando logo após purificação. O dicroísmo circular possibilitou a constatação de enovelamento da Imp- α , conforme o esperado para essa proteína, validando a viabilidade da amostra para futuros experimentos de cristalografia e interação proteína-proteína. A caracterização dessas moléculas é de grande importância para compreensão da via metabólica do glicogênio e de outros mecanismos ainda pouco descritos em *Neurospora*, que poderão ser relacionados a outros organismos Eucariontes.

Palavras-chave: *Neurospora crassa*, expressão, cromatografia, dicroísmo circular

ABSTRACT

Model organisms are those considered representatives to fundamental attributes of the kingdoms of organisms or even life itself. Among model organisms, the early works of George W. Beadle and Edward L. Tatum with the fungus *Neurospora crassa* stimulated the use of microorganisms and has initiated a new era, combining genetics and biochemistry. The fungus *N. crassa* is easy to grow, showing greater morphological and developmental complexity due to its multicellular characteristics. Moreover, many proteins are predicted as similar proteins in animals, plants and other filamentous fungi. This information emphasizes the potential of *N. crassa* as a model for elucidation of still unknown biochemical and genetic mechanisms. However, 41% of the analyzed proteins are related to known proteins. Another 30% are hypothetical proteins with no similarity to proteins deposited in databases. Among metabolic pathways targets of studies in *Neurospora*, an interesting feature is the glycogen metabolism. Under stress conditions, the temperature (heat shock), the glycogen concentration decreases, while in yeast the behavior is opposite. Thus, studies have identified proteins involved in these pathways. The Importin- α protein is important because of its role in recognizing proteins to be transported from the cytoplasm to the cell nucleus. Its study is important as it participates in the transport of proteins involved in the regulation of glycogen metabolism. Another protein is NCU03482, which is identified as a helicase RuvB-like protein, which is responsible for the remodeling of chromatin in human protein. In this work, the expression and purification of recombinant protein Importin- α (Imp- α) and NCU03482 were performed, and the circular dichroism experiment with the sample of Imp- α . Results indicate that the proteins were expressed in *Escherichia coli* successfully, as well as purification of them. However, among the proteins, the Imp- α was obtained in a concentration suitable for other experiments, while NCU03482 was unstable in solution, precipitating after purification. The circular dichroism confirmed the folding Imp- α , as expected for this protein, validating the viability of the sample for future experiments in crystallography and protein-protein interaction. The characterization of these molecules is important for understanding of the metabolic pathway of glycogen and other mechanisms still not described in *Neurospora*, which may be related to other Eukaryotic organisms.

Keywords: *Neurospora crassa*, expression, chromatography, circular dichroism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Neurospora crassa* cultivada em laboratório (DAVIS, 2002).

Figura 2: Os três tipos celulares principais de *Neurospora crassa*: Ilustração de Hifas, Conídios e Ascósporos (A) (*Fungal Genetics Stock Center*). Microscopia eletrônica de hifas (B) e conídios (C) (DAVIS, 2002).

Figura 3: Estrutura da Importina- α de *S. cerevisiae*. ARMs 1-10 correspondem aos motivos que compõem a estrutura da proteína. Cada ARM corresponde a um conjunto de 2 ou 3 hélices (CONTI et al., 1998).

Figura 4: Indução da expressão da proteína recombinante IMP α de *N. crassa* em dois litros de meio LB, divididos em 4 erlenmeyers (250mL de indução). As colunas 1, 3, 5 e 7 são Imp α -Nc não induzidas, já 2, 4, 6 e 8 são induzidas. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa).

Figura 5: Gel 1 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 1-4 foram eluídas 5% de B; Frações 5-8, eluídas 10% de B; Fração 9, 15% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

Figura 6: Gel 2 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 10-11 foram eluídas 15% de B; Frações 12-14, eluídas 19,4% de B; Frações 15-17, 24% de B; Fração 18, 30% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

Figura 7: Gel 3 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 19-20 foram eluídas 30% de B; Frações 21-23, eluídas 50% de B; Frações 24-27, 100% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

Figura 8: Espectro de CD da Imp α de *N. crassa*. Neste gráfico contém o experimento realizado (verde), reconstruído pelo programa (azul) e a diferença entre eles (roxo) . Gráfico gerado pelo programa Spectra Manager II[®].

Figura 9: Espectros de CD das Importinas- α de *N. crassa* (vermelho) e *M. musculus* (preto). A sobreposição quase perfeita das curvas indica que ambas as proteínas apresentam conformações secundárias muito semelhantes. Gráfico gerado no programa Origin (TAKEDA et al., 2013).

Figura 10: A) Expressão da proteína recombinante NCU03482 de *N. crassa*. B) Purificação da NCU03482 induzida com 0,1 mM IPTG por 24h a 12 °C.; S corresponde ao extrato solúvel de *E. coli*; FT- fração do que não se ligou a coluna de Níquel; números de 8-16 correspondem a eluição da amostra com gradiente de imidazol de 15 a 150mM. MW e LMW (à esquerda) indicam marcadores de massa molecular.

Figura 11: Purificação da proteína recombinante NCU03482 de *N. crassa*. Picos 2-5 indicam eluição a 42, 63, 150 e 300 mM de Imidazol, respectivamente. Números no topo de cada coluna indicam frações de eluição. MW indica marcador de massa molecular (kDa).

SUMÁRIO

1. Introdução	09
1.1. O Fungo <i>Neurospora crassa</i>	10
1.2. As proteínas Importina- α e NCU03482 de <i>Neurospora crassa</i>	12
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Importina- α de <i>Neurospora crassa</i>	15
3.1.1. Clonagem e preparo do pré-inóculo	15
3.1.2. Expressão da proteína recombinante Imp α -Nc	15
3.1.3. Purificação da proteína recombinante Imp α -Nc	16
3.2. Dicroísmo circular da Imp α -Nc	18
3.3. Proteína NCU03482	18
3.3.1. Clonagem e preparo do pré-inóculo	18
3.3.2. Expressão da proteína NCU03482	19
3.3.3. Purificação da proteína NCU03482 por cromatografia por afinidade	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1. Produção e purificação da proteína recombinante Imp α -Nc	21
4.2. Ensaio de dicroísmo circular (CD): Predição de estrutura secundária	23
4.3. Produção e purificação da proteína recombinante NCU03482	24
5. Conclusão	27
6. Referências	28

1. Introdução

No século passado, com o início da domesticação genética de moscas do gênero *Drosophila*, as mutações prometeram resolver características do organismo em processos biologicamente identificáveis e indicar como eles foram integrados. Os geneticistas foram em busca do desenvolvimento, sistemas funcionais e morfologias, que acumulou mais e mais informações sobre o organismo. A dedicação e a comunidade que se acumularam em torno de um organismo geneticamente domesticado levaram ao estabelecimento, de um conjunto de modelos - organismos que são considerados representantes para atributos fundamentais dos reinos dos organismos ou mesmo da própria vida. Em virtude da possibilidade de toda biologia poder ser explorada, desde o nível molecular ao da população, esses organismos tornam-se convencionais para um trabalho comparativo sobre os organismos mais intimamente relacionados (DAVIS, 2002).

Dentre os organismos modelo, os primeiros trabalhos de George W. Beadle e Edward L. Tatum com o fungo *Neurospora crassa* estimularam o uso de microorganismos, desenvolvendo uma estratégia para propor que cada enzima poderia ser relacionada a um gene (BEADLE; TATUM, 1941). Nesse trabalho, os pesquisadores utilizaram raios-X para induzir mutações no fungo, os quais foram isolados por alterar reações essenciais para o crescimento do organismo. Após crescimento em meio de cultura rico (contendo vitaminas e aminoácidos essenciais para seu desenvolvimento), as linhagens mutantes foram transferidas para meios mínimos, em que espera-se que fungos incapazes de sintetizar os fatores essenciais para seu crescimento não se desenvolvam, apresentando alguma mutação envolvida com a nutrição.

Ao transferir esses mutantes para meios com suplementos específicos, como um aminoácido, Beadle e Tatum conseguiram identificar quais mutações ocorreram nas linhagens de fungos e foi possível observar que cada mutação causava perda de uma atividade enzimática. Foi então dado início a uma nova era, unindo genética e bioquímica.

1.1. O Fungo *Neurospora crassa*

O reino dos fungos abrange uma enorme diversidade, com ecologias, estratégias de ciclos de vida e morfologia variadas, sendo muito utilizados em estudos biotecnológicos; obtendo o desenvolvimento de novos materiais e a produção de enzimas de uso industrial e laboratorial. Contudo, pouco se sabe da verdadeira biodiversidade do reino Fungi, que se estima incluir 1,5 milhões de espécies, com apenas cerca de 5% destas formalmente classificadas (HAWKSWORTH, 2001).

Neurospora crassa é um fungo multicelular com a coloração alaranjada que vive em habitats com climas tropicais e subtropicais (JACOBSON et al., 2004) (Figura 1). Este fungo não é danoso à saúde ou à agricultura e pode ser visto, por exemplo, em plantações de cana-de-açúcar, principalmente alguns dias após uma queimada (FERREIRA, 2005). É um organismo de fácil manipulação, com rápido crescimento em meio de cultura simples, sendo interessante para o uso em pesquisas (PERKINS, 1992).

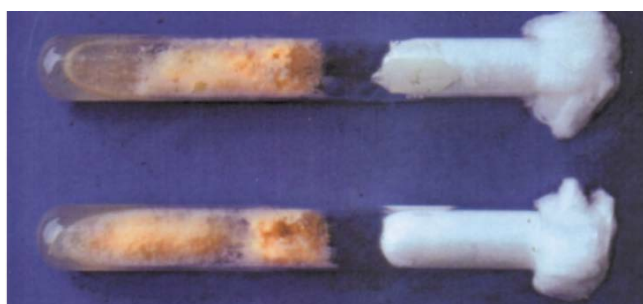


Figura 1: *Neurospora crassa* cultivada em laboratório (DAVIS, 2002).

Todas as células de *N. crassa* contém os componentes básicos de uma célula eucarionte. Além disso, seu citoplasma é envolto por uma membrana plasmática recoberta por uma rígida parede celular composta por uma grande quantidade do polissacarídeo quitina (MCCLUSKEY et al, 2010). As espécies de *Neurospora* são haplóides, com genoma de 43Mb de tamanho. Esse genoma é distribuído em sete cromossomos, contendo cerca de dez mil genes (GALAGAN et al, 2003).

Há descritos em literatura diversos tipos celulares, os quais podem ser identificados em diferentes estágios do ciclo celular. Dentre eles, três tipos são os mais frequentes: Hifas, conídios e ascósporos. As hifas são tubos cujas paredes

celulares são rígidas, exceto na sua extremidade, onde ocorre o crescimento. Conídios são células de formato esférico, as quais são responsáveis pela dispersão. Sob condições adequadas, ocorre o crescimento e desenvolvimento para hifa. Por fim, os ascósporos são células em formato alongado, similar a forma de uma bola de futebol americano. Apresentam parede celular espessa desenvolvida dos produtos da meiose. Contém diversos núcleos haplóides idênticos. São também unidade de dispersão, porém mais resistentes ao estresse ambiental (MCCLUSKEY et al, 2010).

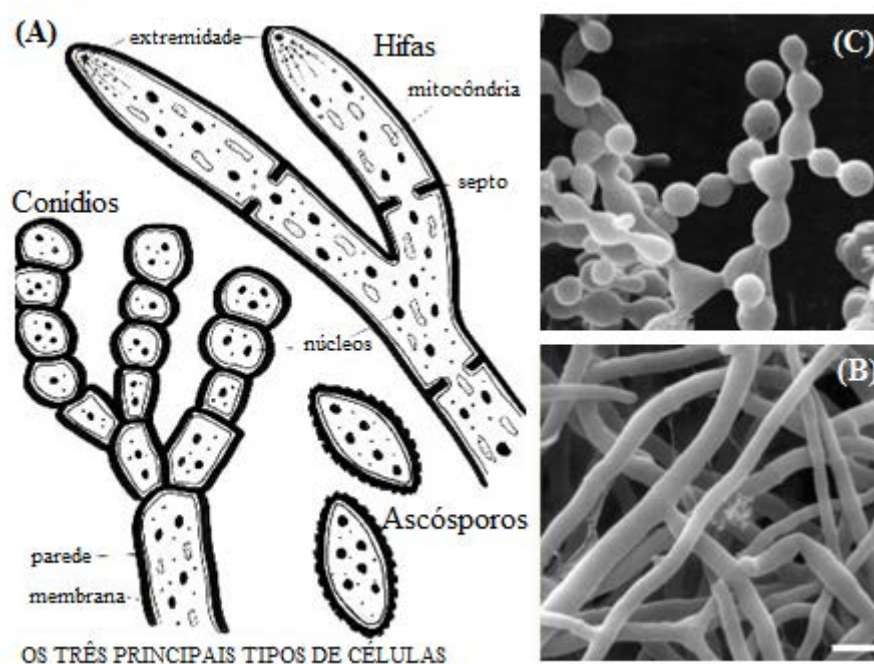


Figura 2: Os três tipos celulares principais de *Neurospora crassa*: Ilustração de Hifas, Conídios e Ascósporos (A) (Fungal Genetics Stock Center). Microscopia eletrônica de hifas (B) e conídios (C) (DAVIS, 2002).

Junto das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe*), o fungo *N. crassa* tem sido amplamente empregados como organismo modelo para aspectos fundamentais da biologia de eucariontes. No entanto, comparado as leveduras, *N. crassa* apresenta maior complexidade morfológica e de desenvolvimento devido as suas características multicelulares (GALAGAN et al., 2003). Além disso, muitas proteínas preditas são semelhantes às proteínas em animais, plantas e outros fungos filamentosos (BORKOVICH et al., 2004). Essas informações reforçam o potencial de *N. crassa* como modelo para elucidação de mecanismos bioquímicos e genéticos ainda desconhecidos.

1.2. As proteínas Importina- α e NCU03482 de *Neurospora crassa*

Embora um organismo modelo, *N. crassa* apresenta 41% das proteínas analisadas relacionadas com proteínas conhecidas. Outros 30% correspondem a proteínas hipotéticas sem semelhanças com proteínas depositadas em bancos de dados (SCHULTE et al., 2002), o que traduz o pouco conhecimento do genoma dos fungos.

Dentre as vias metabólicas alvo de estudo em *Neurospora*, uma característica interessante é o metabolismo do glicogênio. O glicogênio é uma reserva de energia na forma de carboidrato que apresenta-se em altos níveis de concentração no final da fase de crescimento (GONÇALVES et al., 2011). No entanto, sob condições de estresse a temperatura (*heat shock*), a concentração de glicogênio diminui (DE PAULA et al., 2002; NOVENTA-JORDÃO et al., 1996). O comportamento oposto foi observado em *S. cerevisiae* (PARROU et al., 1997) e estudos indicam que em *Neurospora* esse comportamento deve-se a proteínas interagindo com o gene que codifica a glicogênio-sintase (*gsn*). Dessa maneira, estudos identificaram proteínas envolvidas nessas vias (GONÇALVES et al., 2011).

A proteína Importina- α é importante devido ao seu papel de reconhecer proteínas a ser transportadas do citoplasma para o núcleo celular. É uma proteína alongada, composta por alfa-hélices (Figura 3) e contém sítios de ligação para sequência específicas de importação nuclear, as NLSs (Sequências de localização nuclear)(CONTI et al, 1998; FONTES et al., 2000). Essa proteína foi elucidada em levedura (CONTI et al, 1998) e outros organismos, porém pouco se sabe sobre seu funcionamento em *N. crassa*. Seu estudo é importante pois participa de transporte de proteínas envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio.

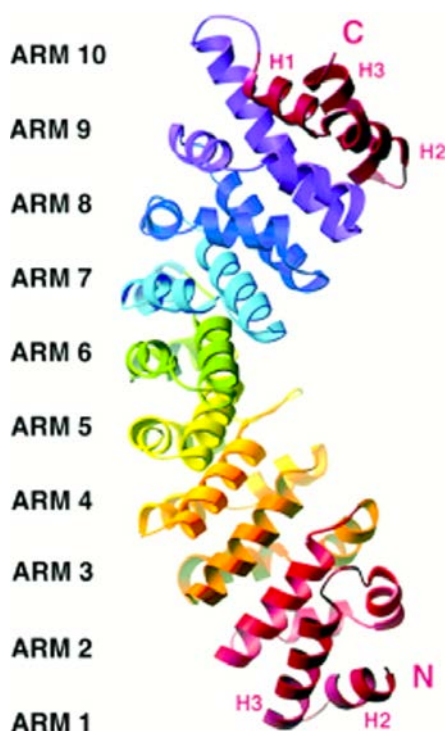


Figura 3: Estrutura da Importina- α de *S. cerevisiae*. ARMs 1-10 correspondem aos motivos que compõem a estrutura da proteína. Cada ARM corresponde a um conjunto de 2 ou 3 hélices (CONTI et al, 1998).

Outra proteína é a NCU03482, a qual encontra-se identificada como proteína semelhante a helicase RuvB, que é uma proteína responsável pela remodelagem da cromatina em humanos (FREITAS, 2007). Além da informação da participação da proteína na regulação do gene que codifica a *gsn*, pouco se sabe de fato sobre sua estrutura e função. A caracterização dessas moléculas é de grande importância para compreensão dessa via metabólica e de outros mecanismos ainda pouco descritos em *Neurospora*, que poderão ser relacionados a outros organismos Eucariontes.

2. Objetivos

O objetivo desse projeto é a obtenção de proteínas, envolvidas no metabolismo do glicogênio, adequadas para experimentos de caracterização estrutural. Para esse fim, os objetivos específicos são:

- Expressão, purificação e predição de estrutura secundária da proteína recombinante Importina- α de *Neurospora crassa*
- Expressão e purificação da proteína NCU03482 de *Neurospora crassa*.

3. Material e Métodos

3.1. Importina- α *Neurospora crassa*

3.1.1. Clonagem e preparo do pré-inóculo

A proteína Importina- α de *Neurospora crassa* (Imp α -Nc) foi clonada pela Dr^a. Fernanda Zanolli Freitas, do grupo da Prof^a Maria Célia Bertolini do Departamento de Química da UNESP de Araraquara. A clonagem foi realizada através da inserção do cDNA da proteína truncada em pET28A (Novagen) e a expressão em *Escherichia coli*, linhagem Rosetta (DE3) pLysS (Novagen). A proteína recombinante foi produzida fusionada a uma cauda de histidina e truncada, através da exclusão da porção N-terminal correspondente ao domínio auto-inibitório: ¹MADRYIPEHRRTQFKAKSAFK PDELRRRREEQQVEIRKAKREENLAKRRGIGAGDSRPGASLGAAPDSDDENPP⁷⁴.

Para o preparo do pré-inóculo para Imp α -Nc, foi preciso 4 tubos Falcon de (50 mL) estéreis, 40 mL de meio LB (Luria Bertani), 40 μ L dos agentes de seleção Cloranfenicol (50 μ g/mL) e Canamicina (100 μ g/mL) e a cultura permanente de *E. coli* contendo a sequência de DNA que codifica a Imp α -Nc, a qual encontrava-se armazenada em condições criogênicas.

O pré-inóculo foi preparado no fluxo laminar previamente esterilizado por uma lâmpada UV, durante 15 min. Os antibióticos foram adicionados aos 40 mL de meio LB e em seguida homogeneizado. Aliquotou-se o meio LB em frações de 10 mL para cada tubo Falcon, previamente identificado, e adicionou-se a cultura permanente. Os tubos foram colocados na incubadora com agitação (*Shaker IKA® KS 4000 i control*), inclinados e fixados em suportes, mantidos a uma temperatura de 37° C, velocidade de agitação de 145 rpm e por aproximadamente 15 h.

3.1.2. Expressão da proteína recombinante Imp α -Nc

Após 15 horas na incubadora, o pré-inóculo foi levado ao fluxo laminar junto a frascos contendo meio LB, antibióticos Cloranfenicol e Canamicina e 4 erlenmeyers estéreis. Os materiais foram levados para o fluxo laminar conforme procedimento de esterilização previamente descrito. Os agentes de seleção Cloranfenicol (50 μ g/mL) e Canamicina (100 μ g/mL) foram adicionados a 1L de meio de cultura LB. O bico de bunsen foi utilizado para manter as condições estéreis e esterilizar a “boca” da garrafa contendo meio de cultura para que fosse possível homogeneizar o meio de maneira a

evitar contaminação. Posteriormente, foi adicionado o pré-inóculo dentro do meio e a mistura foi homogenizada. Essa mistura foi dividida em 500 mL os quais foram colocados em erlenmeyers de 2L. Esses frascos foram fechados com alumínio e plástico filme. Em seguida foram colocados na incubadora a uma temperatura de 37°C, velocidade de agitação de 115 rpm até atingir a densidade óptica (Abs_{600}) 0,6 – 1,0.

Após atingir a densidade óptica, os erlenmeyers contendo bactérias e meio de cultura foram levados novamente ao fluxo laminar. Alíquotas de 2 mL foram retiradas e identificadas para controle. Em seguida, a indução da expressão da proteína Imp α -Nc foi realizada com adição de 100 mM de IPTG (*Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo*) aos erlenmeyers os quais foram mantidos na incubadora por 3 horas e meia de indução à 28°C e 115 rpm. Após este passo, foram levados na centrífuga refrigerada (*Eppendorf 5810 R*), em frascos de 400 mL à 4°C e 2057 G durante 20 min e em seguida, transferidos para tubos tipo falcon de 50 mL à 4°C e 6000 rpm durante 10 min. Essa etapa serve para separar bactérias do meio de cultura. Todo líquido (sobrenadante) foi retirado dos tubos tipo falcon, deixando somente as bactérias (péleti). Antes de serem colocados na centrífuga, os frascos foram pesados igualmente na balança semi-analítica para não danificar o aparelho. Todos os tubos contendo os péletis foram levados no freezer à -20°C, identificados com nome e data. Para verificação da expressão da proteína foram feitos géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

3.1.3. Purificação da proteína recombinante Imp α -Nc

Como uma etapa preliminar à purificação, foi realizada a lise química das bactérias com a utilização de Lisozima. O Tampão de Lise (50 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl, 5% de Glicerol, 1 mM de $MgCl_2$, 5 mM de Imidazol, 1 mg/mL de Lisozima, 1 mg/mL de Inibidores de Protease (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina), 1 mM de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil), 0,1 mM de TECEP (Cloridrato de Tris(2-carboxietil) fosfina), 100 μ L de DNase e RNase) foi preparado em um balão volumétrico de 100 mL e separado em dois tubos tipo Falcon de 50 mL. Esse tampão foi adicionado aos tubos que continham os péletis de bactéria, sendo homogenizado. A mistura foi mantida em gelo durante 1 h, sendo homogenizada em vários intervalos de tempo. Posteriormente, esta foi levada à centrífuga refrigerada a 4°C e 6000 rpm

durante 30 min, sendo possível separar a parte solúvel (sobrenadante) da insolúvel (péleti). O extrato de bactérias (sobrenadante) foi armazenado à -20°C até ser submetido a purificação.

A cromatografia por afinidade foi realizada em coluna cromatográfica de níquel, HisTrapHP (GE Healthcare™) acoplada ao aparelho ÄKTA Purifier (GE Healthcare™), onde cerca de 50 mL de extrato de *E. coli* foram injetados no sistema a um fluxo de 0,5 mL/min e pressão de 0,3 MPa. Primeiramente, a coluna foi preparada para receber a amostra, ou seja, foi submetida ao processo de substituição de fase móvel, em que todo o sistema mantido sob etanol 20%, teve o mesmo substituído por água e, posteriormente por tampões. Nesse processo, todo o sistema (bombas, coluna, conexões, porta-amostra) foi condicionado inicialmente com água para que o tampão em contato com o etanol 20% não promovesse formação de precipitado dentro do cromatógrafo. Em seguida, a água foi substituída pelo tampão A (50 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl, 100 mM de Imidazol e 5% de Glicerol) na bomba A1 e tampão B (na bomba B1 (50 mM de Hepes pH 7, 500 mL de NaCl, 150 mM de Imidazol e 10% de Glicerol). Cada uma das etapas (água e tampão) foi realizada em 5 a 6 volumes de coluna (25-30mL), monitorado por Abs₂₈₀ para garantir condicionamento do sistema.

Com a estabilização do cromatógrafo, o mesmo foi programado para injeção do extrato de bactéria ao sistema, seguida da passagem de tampão A para remoção de moléculas com ligação inespecífica, ou seja, o que tiver afinidade com níquel permanece na coluna, o restante do extrato é removido do sistema. A eluição da proteína (Imp α -Nc) foi realizada com gradiente 0 – 100% de tampão B combinado a eluição em etapas (*stepwise*). Durante essa etapa, foram coletadas as frações de 2 mL em tubos Eppendorf, sendo enumeradas e mantidas no gelo. Para verificação da purificação da proteína foram feitos géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. As amostras contendo Imp α -Nc foram submetidas a diálise em tampão C (20 mM de Tris HCl pH 8 e 0,1 M de NaCl), em que a diálise foi executada e a proteína mantida em uma membrana de diálise (*dialysis tubing*) sendo mergulhada em tampão, sob agitação constante, *overnight*. Após a diálise, foi utilizado o dispositivo de ultrafiltração *Amicon* (Millipore) para obter maior concentração da amostra, ou seja, a amostra foi centrifugada até atingir a concentração de 20 mg/mL.

3.2. Dicroísmo circular da Imp α -Nc

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (*circular dichroism* - CD) é um método utilizado para analisar a estrutura secundária de proteínas e peptídeos em solução. A técnica consiste na incidência de uma luz polarizada nos sentidos horário e anti-horário sob uma cubeta contendo a amostra. O espectro resultante corresponde a uma absorção diferenciada da luz polarizada, ou seja, uma somatória vetorial da quantidade de luz polarizada circular absorvida nos dois sentidos, direita e esquerda (GREENFIELD, 2004). O experimento de Dicroísmo Circular foi realizado com a amostra de Imp α -Nc diluída a 0,35 mg/mL, em cubeta de quartzo de 0,5 cm. As medidas foram feitas utilizando o aparelho Jasco J-815 (JASCO Inc., Tokyo, Japan), equipado com um sistema *peltier* PTC-423-S para controle de temperatura, em um espectro de 190 – 260 nm a 20°C, velocidade de varredura de 100 nm/min; comprimento de bandas de 2 nm e tempo de resposta de 1 s. O espectro final obtido correspondeu a média de 20 acumulações corrigidas em relação a linha de base referente ao tampão e normalizadas em razão da elipticidade molar residual $[\theta]$. A estimativa de conteúdo de estrutura secundária foi realizada com a utilização do programa CONTINN do pacote CDPPro (SREERAMA & WOODY, 2000).

3.3. Proteína NCU03482

3.3.1. Clonagem e preparo do pré-inóculo

A clonagem da proteína NCU03482 de *N. crassa* foi realizada pela Dr^a. Fernanda Zanolli Freitas, do grupo da Prof^a. Dr^a. Maria Célia Bertolini da UNESP – Araraquara. Experimentos para obtenção da proteína NCU03482 foram realizados com dois vetores. O cDNA da NCU03482 foi inserido no vetor de expressão pET28a (Novagen) e no pETSUMO, resultando na produção de proteína recombinante fusionada à cauda de poli-Histidinas (NCU03482-His) e proteína recombinante fusionada à proteína SUMO cauda de poli-Histidinas (NCU03482-SUMO), respectivamente. Os vetores de expressão foram inseridos em bactérias *Escherichia coli*, linhagem Rosetta™ (DE3) pLysS (Novagen).

Para cada experimento realizado, no preparo do pré-inóculo da proteína NCU 03482, foi preciso 4 tubos tipo Falcon de (50 mL), 40 mL de meio LB (Luria Bertani),

40 µL dos agentes de seleção Cloranfenicol (50 µg/mL) e Canamicina (100 µg/mL) e a cultura permanente da NCU03482. O pré-inóculo foi preparado no fluxo laminar previamente esterilizado por uma lâmpada UV, durante 15 min. Os antibióticos foram adicionados aos 40 mL de meio LB e em seguida homogeneizado. Aliquotou-se o meio LB em frações de 10 mL para cada tubo Falcon, previamente identificado, e adicionou-se a cultura permanente. Os tubos foram colocados na incubadora com agitação, inclinados e fixados em suportes, mantidos a uma temperatura de 37° C, velocidade de agitação de 145 rpm e por 15 h.

3.3.2. Expressão da proteína NCU03482

Crescido o pré-inóculo, frascos contendo meio LB, antibióticos Cloranfenicol e Canamicina e 4 erlenmeyers estéreis, foram levados ao fluxo laminar fazendo o procedimento de esterilização. Os agentes de seleção Cloranfenicol (50 µg/mL) e Canamicina (100 µg/mL) foram adicionados a 1L de meio de cultura LB. Em sequência, o pré-inóculo foi adicionado dentro do meio e a mistura foi homogeneizada. Essa mistura foi dividida em 500 mL os quais foram colocados em erlenmeyers de 2L, fechados com alumínio e plástico filme, e colocados na incubadora a uma temperatura de 37° C, velocidade de agitação de 115 rpm até atingir a densidade óptica (Abs_{600}) 0,6 – 1,0. Sendo atingida a densidade óptica, os erlenmeyers contendo bactérias e meio de cultura foram levados novamente ao fluxo laminar. Alíquotas de 2 mL foram retiradas e identificadas para controle. Para indução da expressão da proteína NCU03482, 100 mM de IPTG foi adicionado aos erlenmeyers. A indução da NCU03482-His foi realizada em duas diferentes maneiras.; i) por adição de 0,1 mM IPTG por 24h à 12 °C e ii) adição de 0,1 mM IPTG por 6 h à 28 °C, ambos à 115 rpm na incubadora. Para a NCU03482-SUMO, a indução foi realizada por adição de 0,4 mM IPTG por 20h à 12°C. A seguir, as culturas bacterianas foram levadas à centrífuga refrigerada (*Eppendorf 5810 R*), em frascos de 400 mL à 4°C e 2057 G durante 20 min e em seguida com tubos Falcon de 50 mL à 4°C e 6000 rpm durante 10 min. Essa etapa serve para separar bactérias do meio de cultura. Todo líquido (sobrenadante) foi retirado dos tubos Falcon, deixando somente as bactérias (péleti). Antes de serem colocados na centrífuga, os frascos foram pesados igualmente na balança semi-analítica para não danificar o aparelho, como também foi feito para a

proteína Imp- α Nc. Todos os tubos contendo os péletis foram levados no freezer   -20 C, identificados com nome e data. A verifica  o da expressão da proteína foram feitos géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

3.3.3. Purifica  o da proteína NCU03482 por cromatografia por afinidade

Para purifica  o da proteína NCU03482, as células coletadas por centrifuga  o foram submetidas a lise química com Lisozima em 100mL de tampão de Lise (50 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl, 5% de Glicerol, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de Imidazol, 0,5% de NP-40, 1 mg/mL de Lisozima, 1 mg/mL de Inibidores de Protease (Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina), 1 mM de PMSF, 0,1 M de TCEP, 15 mg/mL de DNase e 10 mg/mL de RNase). Esse tampão foi adicionado aos tubos que continham os péletis de bactéria, sendo homogeneizado. A mistura foi mantida em gelo durante 1 h, sendo homogeneizada em vários intervalos de tempo. Posteriormente, esta foi levada   centrífuga refrigerada a 4 C e 6000 rpm durante 30 min, sendo possível separar a parte solúvel (sobrenadante) da insolúvel (péleti). O extrato de bactérias (sobrenadante) foi armazenado   -20 C até ser submetido a purifica  o.

A cromatografia por afinidade foi realizada coluna de níquel, HisTrapHP (GE HealthcareTM) acoplada ao aparelho  KTA Purifier (GE HealthcareTM), onde cerca de 50 mL de extrato de *E. coli* foram injetados no sistema a um fluxo de 0,5 mL/min e pressão de 0,3 MPa. Primeiramente, a coluna foi preparada para receber a amostra, ou seja, condicionada e equilibrada com 30 mL de Tampão A (50 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl, 100 mM de Imidazol e 5% de Glicerol). Em seguida, foi aplicada 30 mL de amostra (extrato de *E. coli*). O Tampão A foi novamente passado pela coluna cromatográfica para retirar algumas prote  inas da *E. coli* que não interagem com a coluna de níquel, e somente prote  inas de interesse são fixadas, pois elas tem intera  o   níquel, como   o caso da histidina. As amostras purificadas foram coletadas em frações de 1,5 mL sendo eluídas de gradiente 0 – 100% do Tampão B (50 mM de Hepes pH 7, 500 mL de NaCl, 1,5 M de Imidazol e 10% de Glicerol) combinado a elui  o em etapas (*stepwise*), sendo 200 mL e o fluxo de 1 mL/min. Em cada fração de 1,5 mL foram aliquotados 20  L para serem analisados em gel SDS PAGE – 12%, com o intuito de averiguar a pureza da amostra.

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção e purificação da proteína recombinante Imp α -Nc

A proteína recombinante Imp α -Nc foi produzida truncada em sua porção N-terminal e em fusão a uma cauda de Histidina. A proteína foi expressa em *E. coli* com sucesso em todas as amostras submetidas à indução em larga escala (Figura 4).

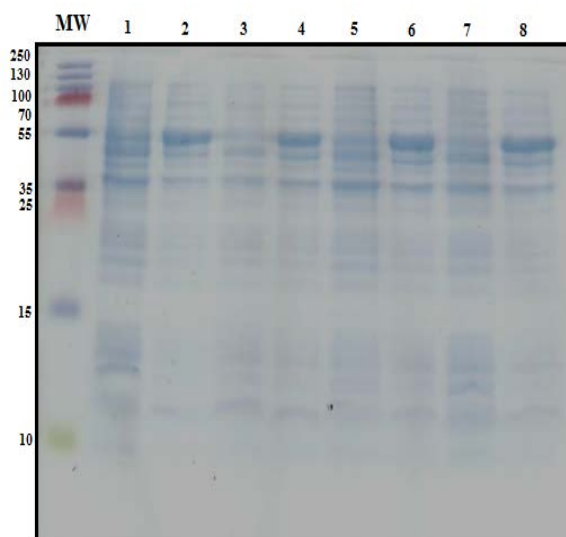


Figura 4: Indução da expressão da proteína recombinante IMP α de *N. crassa* em dois litros de meio LB, divididos em 4 erlenmeyers (250mL de indução). As colunas 1, 3, 5 e 7 são Imp α -Nc não induzidas, já 2, 4, 6 e 8 são induzidas. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa).

Para a etapa de purificação, injetou-se o extrato de bactéria no sistema do cromatógrafo e seguido da adição de tampão A para remover moléculas que não tem ligação específica com níquel, pois ele tem afinidade com a proteína de interesse, sendo ela a Imp α -Nc. A eluição da proteína foi realizada com gradiente 0 – 100% de tampão B combinado a eluição em etapas (*stepwise*). Com essas etapas de eluição, foi encontrada a proteína de interesse a partir de 15% de B, o que corresponde a cerca de 22,5 mM de Imidazol. Nas primeiras etapas de purificação foram eluídas proteínas com baixa massa molecular (kDa). Para verificação da purificação da proteína foram feitos géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, conforme figuras 5, 6 e 7.



Figura 5: Gel 1 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 1-4 foram eluídas 5% de B; Frações 5-8, eluídas 10% de B; Fração 9, 15% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

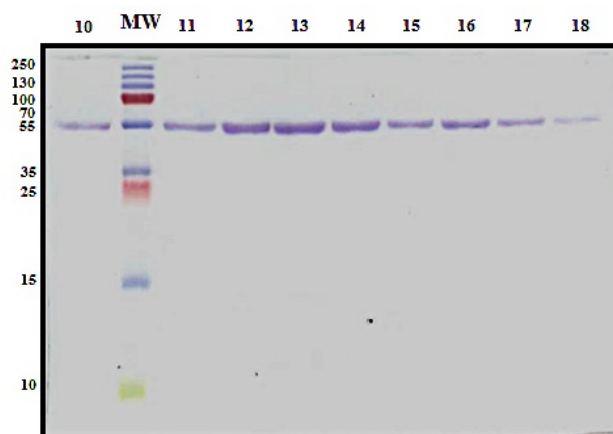


Figura 6: Gel 2 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 10-11 foram eluídas 15% de B; Frações 12-14, eluídas 19,4% de B; Frações 15-17, 24% de B; Fração 18, 30% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

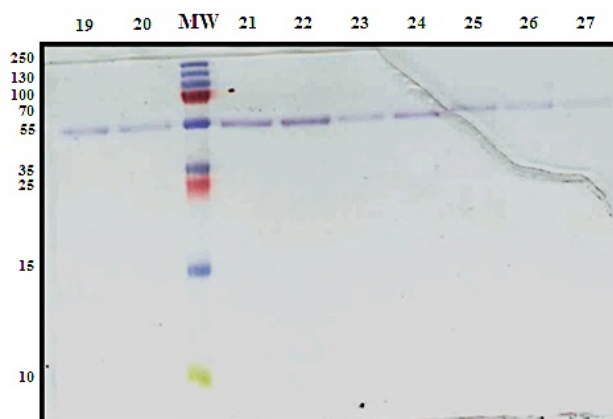


Figura 7: Gel 3 de cromatografia para purificação da proteína recombinante IMP α de *N. crassa*. Frações 19-20 foram eluídas 30% de B; Frações 21-23, eluídas 50% de B; Frações 24-27, 100% de B. Números à esquerda indicam marcadores de massa molecular (kDa) e os números acima, frações.

As amostras contendo Imp α -Nc foram submetidas ao processo de diálise em tampão C (20 mM de Tris HCl pH 8 e 0,1 M de NaCl). A proteína foi mantida em uma membrana de diálise (*dialysis tubing*) sendo mergulhada em tampão, sob agitação constante, *overnight*. Após a diálise, foi utilizado o dispositivo de ultrafiltração *Amicon* (Millipore) para obter maior concentração da amostra, ou seja, a amostra foi centrifugada até atingir a concentração de 20 mg/mL. Essa permaneceu estável em solução e foi possível seu armazenamento e diluição para o experimento de dicroísmo circular.

4.2. Ensaios de dicroísmo circular (CD): Predição de estrutura secundária

O espectro de dicroísmo circular da proteína recombinante Imp α -Nc, apresentou predominantemente picos negativos característicos de α -hélices a 208 nm (-20177,4 [θ]) e 222 nm (-19339,1 [θ]), e um pico positivo a 193 nm (+41090,8) como é observado na figura 8. Através do processamento dos dados pelo algoritmo CONTINN (SREERAMA, 2000), obteve-se uma predição da estrutura secundária da IMP α Nc, sendo apresentado: 61,6% de α -hélices, 16,1% de *loops* e 19,2% de elementos desordenados.

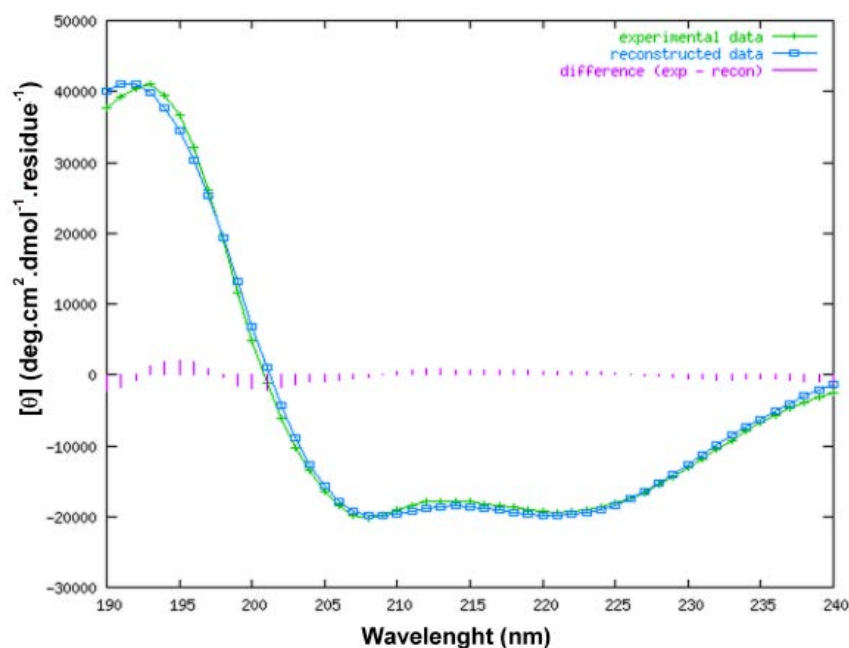


Figura 8: Espectro de CD da Imp α de *N. crassa*. Neste gráfico contém o experimento realizado (verde), reconstruído pelo programa (azul) e a diferença entre eles (roxo). Gráfico gerado pelo programa Spectra Manager II®.

Estudos realizados com uma amostra de Imp α -Nc comparada a Importina- α de camundongo (*Mus musculus*) (TAKEDA et al., 2013) indicam que o espectro das proteínas são similares (Figura 9). A proteína de camundongo é rica em alfa hélices e já apresenta sua estrutura elucidada por cristalografia. Dessa maneira é um bom controle experimental.

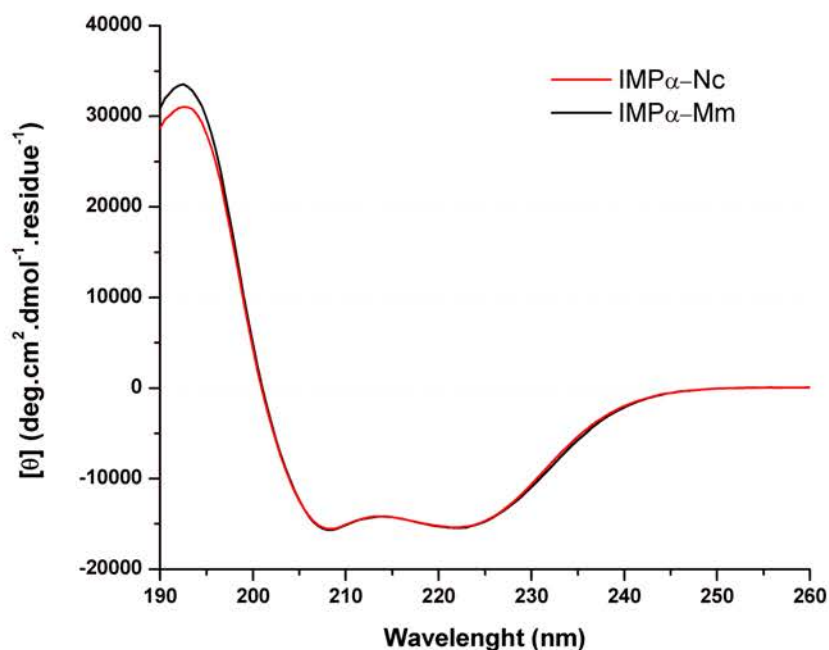


Figura 9: Espectros de CD das Importinas- α de *N. crassa* (vermelho) e *M. musculus* (preto). A sobreposição quase perfeita das curvas indica que ambas as proteínas apresentam conformações secundárias muito semelhantes. Gráfico gerado no programa Origin (TAKEDA et al., 2013).

A amostra de Imp α -Nc obtida nesse trabalho apresenta as mesmas características, com valores mínimos em 208 e 222 nm, bem como um máximo de 193nm, característico de proteínas ricas em alfa hélices. Isso confirma que a proteína encontra-se enovelada e adequada para outros experimentos.

4.3. Produção e purificação da proteína recombinante NCU03482.

A proteína recombinante NCU03482 também foi produzida truncada em fusão a uma cauda de histidina. A proteína foi expressa em *E. coli*, obtendo-se a amostra solúvel com sucesso. (Figura 10A). Experimentos com a proteína induzida com 0,1 mM IPTG por 24h a 12 °C possibilitou a obtenção de grande quantidade de proteína induzida na fração solúvel do extrato de *E. coli*, entretanto na purificação com

gradiente de imidazol de 15 a 1,5 M combinado a eluição em etapas (*stepwise*), a NCU03482 foi eluída à partir de 150 mM (10%B) com grande quantidade de proteínas da *E. coli* (Figura 10B). Testes com outros tampões de lise foram realizados com o intuito de obter a proteína solúvel com menor quantidade de contaminantes, entretanto não foi obtido o sucesso.

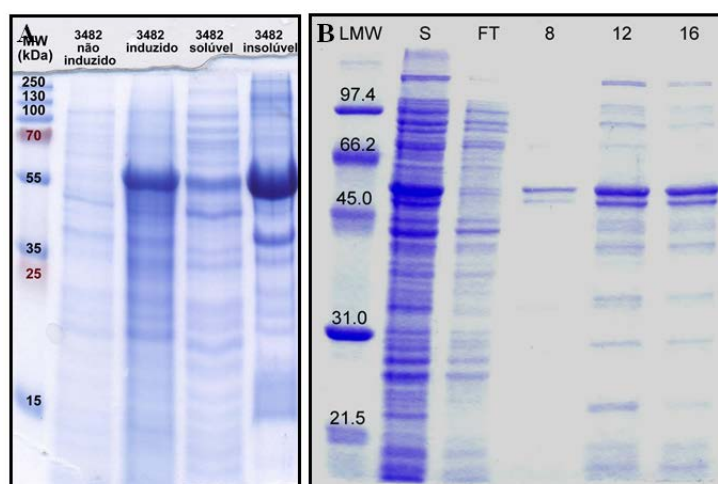


Figura 10: A) Expressão da proteína recombinante NCU03482 de *N. crassa*. B) Purificação da NCU03482 induzida com 0,1 mM IPTG por 24h a 12 °C.; S corresponde ao extrato solúvel de *E. coli*; FT- fração do que não se ligou a coluna de Níquel; números de 8-16 correspondem a eluição da amostra com gradiente de imidazol de 15 a 150mM. MW e LMW (à esquerda) indicam marcadores de massa molecular.

Como alternativa, foi realizada a alteração da condição de indução para 0,1 mM IPTG por 6 h a 28 °C, o que alterou a solubilidade de todas as proteínas. Dessa maneira, observou-se menor quantidade da NCU03482 na fração solúvel e também menor quantidade de proteínas contaminantes. Um novo gradiente, de 15 a 300 mM (0-20%B) de Imidazol foi realizado. Grande parte do contaminante eluiu com concentrações abaixo da concentração de eluição da NCU03482, o que possibilitou a obtenção da proteína com menor quantidade de contaminante (Figura 10).

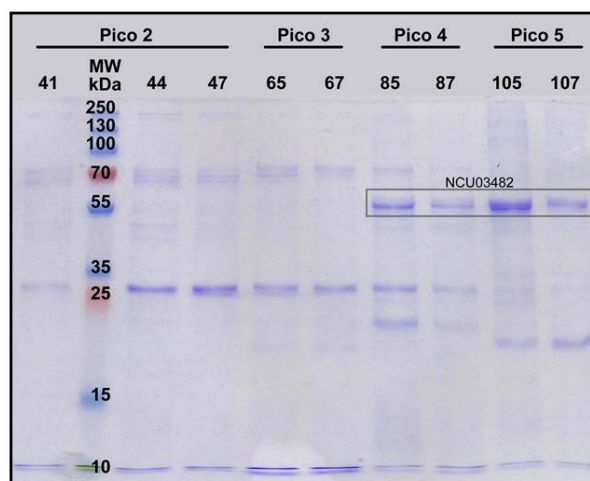


Figura 11: Purificação da proteína recombinante NCU03482 de *N. crassa*. Picos 2-5 indicam eluição a 42, 63, 150 e 300 mM de Imidazol, respectivamente. Números no topo de cada coluna indicam frações de eluição. MW indica marcador de massa molecular (kDa).

Experimentos anteriores (FREITAS, 2007) utilizando maior concentração de imidazol no tampão para remoção de proteínas com ligação inespecífica não foi tão eficiente quanto a eluição gradativa dos mesmos com um gradiente linear combinado a eluição em etapas (*stepwise*). No entanto a variação dos parâmetros não possibilitou a purificação da proteína NCU03482 em apenas uma etapa.

A menor concentração de proteínas contaminantes possibilitará realizar uma segunda etapa de purificação de maneira mais eficiente, podendo esta ser uma troca iônica ou cromatografia de exclusão molecular. Porém é essencial encontrar uma condição em que a proteína não precipite após purificação.

5. Conclusão

As proteínas recombinantes Imp α e NCU0482 foram expressas em *E. coli* com sucesso. Dentre elas, a Imp α permaneceu estável em solução, pura e enovelada. Isso permitirá sua utilização em experimentos de cristalografia de proteínas e de interação proteína-proteína.

Em relação a proteína NCU03482, a indução da expressão por 24 horas, 12°C resultou em uma maior quantidade de proteína recombinante. Porém a essa temperatura, a solubilidade de proteínas de *E. coli* também foi alta, o que dificultou a purificação em uma etapa única. Ao realizar a indução por 6 horas, 28°C houve menor expressão da NCU03482, assim como das proteínas da bactéria, resultando em uma proteína mais pura. No entanto a NCU03482 após essa purificação, precipitou devido a instabilidade em solução. Novos experimentos serão necessários para conseguir uma proteína mais estável, para permitir seu estudo com técnicas biofísicas.

6. Referências

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 27, n.11, p. 499-506, Oct. 1941.

BORKOVICH, K. A. et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genetic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 1, n. 68, p. 1-108, Mar. 2004.

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.

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Macmillan Magazines Ltd**, v. 3, p. 7-13, May 2002.

DE PAULA, R. M. et al. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the gsn cDNA. **Mol. Genet. Genomics.**, v. 267, n. 2, p. 241-253, Apr. 2002.

FERREIRA, A. V. B. Fungos: Os primórdios do sexo. **Ciência Hoje**, Minas Gerais, v. 37, n. 218, p. 34-41, Ago. 2005.

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

FREITAS, F. Z. **Caracterização funcional dos elementos de transcriçao do gene da Glicogênio sintase (gsn) de Neurospora crassa**. UNESP, 2007. 180 f. Tese (doutorado). Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, 2007.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GONÇALVES, R. D. et al. **Fatores de transcrição reguladores do metabolismo do glicogênio em *Neurospora crassa*. Caracterização parcial e identificação de alvos de ligação por ChIP.** 2012. 175 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

GREENFIELD, N.J. Analysis of circular dichroism data. **Methods Enzymol**, 383, 282-317. 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, Dec. 2001.

JACOBSON, D. J. et al. *Neurospora* in temperate forests of western North America. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 66-74. 2004.

MCCLUSKEY K., WIEST A., PLAMANN M., 2010. The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. J Biosci. 35(1):119-26. **Nature**, v. 422, 859-868 (24 April 2003) | doi: 10.1038/nature01554; Received 24 Dec. 2002; Accepted 14 Mar. 2003.

NOVENTA-JORDÃO, M. A. et al. Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. **FEBS Lett.**, v. 378, n. 1, p. 32–36. Jan. 1996.

PARROU, J. L., TESTE, M. A., FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, p. 1891–1900. 1997.

PERKINS, D. D. *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. **Genetics**, v. 130, n. 4, p. 687-701, Apr. 1992.

SCHULTE, U.; BECKER, I.; MEWES, H. W.; MANNHAUPT, G. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem.**, 287(2), p.252-260. 2000.

TAKEDA, A. A. S.; FREITAS, F. Z.; MAGRO, A. J.; BERNARDES, N. E.; FERNANDES, C. A. H.; GONCALVES, R. D.; BERTOLINI, M. C.; FONTES, M. R. M. Biophysical characterization of the recombinant importina- α from *Neurospora crassa*. **Prot. Pep. Letters**. 20(1), 8-16. 2013.