

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPARATIVOS ENTRE AS
IMPORTINA- α DE *Homo sapiens* E *Mus musculus*

TAINÁ DORTE DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para defesa de
Mestrado no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas – Estrutura e Função

Orientador: *Prof. Tít. Marcos R. M. Fontes*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPARATIVOS ENTRE AS
IMPORTINA- α DE *Homo sapiens* E *Mus musculus*

TAINÁ DORTE DA SILVA

Aluna

Prof. TIT MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para defesa de
Mestrado no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas – Estrutura e Função

Orientador: *Prof. Tit. Marcos R. M Fontes*

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Tainá Dorte da.

Estudos estruturais comparativos entre as Importina- α de *Homo sapiens* e *Mus musculus* / Tainá Dorte da Silva. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Capes: 20901003

1. Camundongos. 2. Importinas. 3. Homem. 4. Transporte ativo do núcleo celular.

Palavras-chave: *Homo sapiens*; Importina- α ; *Mus musculus*; Sequências de Localização Nuclear - NLS; Transporte nucleocitoplasmático.

“O que é significativo em sua própria existência é apenas consciente, e certamente não deve incomodar o outro companheiro. O que um peixe sabe sobre a água em que ele nada toda a sua vida?”
– Albert Einstein

Dedico este trabalho a todos aqueles que lutam por uma educação justa e de qualidade, e àqueles que de alguma maneira estiveram comigo em todo o meu processo de formação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado nas instalações do Laboratório de Biofísica Molecular e Estrutural.

À minha mãe, Rute, por todo incentivo que me é dado desde criança, sempre me apoiando a não desistir do que acredito. E ao senhor Orlando e Filó por todo auxílio educacional que me é dado.

Aos meus companheiros de laboratório, Ms. Cíntia, Ivan e Ana Júlia, por compartilhar momentos de alegria e tristeza com nossas pesquisas. E, especialmente a Doutoranda Hamine, Dr. Guilherme e Dr. Fábio essenciais na análise e realização dos experimentos feitos neste trabalho.

E aos meus amigos, Laíza e Leonardo, e a minha companheira Driéle por estarem comigo nessa caminhada do conhecimento, sempre me ouvindo e incentivando a continuar esta jornada.

No atual cenário brasileiro que, além da pandemia de COVID-19, enfrentamos forte descredibilidade da ciência, apresentar este trabalho é mais que uma vitória pessoal, é uma vitória da educação e da ciência. Por isso, sou grata a cada um que acredita que o conhecimento científico é o caminho para dias melhores.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.482358/2020-00;

Resumo

Uma das vias de transporte melhor caracterizada é mediada pela Importina- α (Imp α), chamado via clássica de importação nuclear. Nesta via, a Importina- β (Imp β) se liga à Imp α , afastando o domínio auto inibitório da Imp α , permitindo o reconhecimento e a ligação das sequências de localização nuclear (NLS) presentes nas proteínas a serem importadas. Já foram identificadas diversas variantes da Imp α em diferentes organismos, as quais foram classificadas em três subfamílias ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) baseado na similaridade sequencial entre elas. A Imp α de *Homo sapiens* possui sete variantes, sendo que a sua variante $\alpha 1$ possui alta similaridade com a variante $\alpha 2$ de *Mus musculus* (MmImp α), primeira Imp α de mamífero a ser estruturalmente elucidada e amplamente utilizada no estudo de processos de importação nuclear. Além disso, com o avanço nos estudos nesta área, as estruturas das Imp α de humano, fungo e arroz foram elucidadas, revelando que estas estruturas são altamente conservadas, mas apresentam diferentes características, como a afinidade à diferentes NLSs, em razão das regiões adjacentes aos sítios de ligação da Imp α . Ainda existem poucas informações acerca destas diferenças, apesar da grande importância acadêmica e farmacológica, devido a especificidade do transporte proteico. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo a produção da variante $\alpha 1$ da HsImp α e sua comparação estrutural com a MmImp α , e o estudo da interação entre a HsImp α e os peptídeos NLS SV40, XPG1 e PAC-3. Para tal feito, foram realizadas a transformação, expressão e purificação da proteína HsImp α , bem como a análise estrutural com as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de fluorescência (FS). A análise da afinidade dos complexos HsImp α /XPG1-NLS, HsImp α /SV40-NLS e HsImp α /PAC-3 foi realizada com a técnica de calorimetria por titulação isotérmica (ITC). O CD mostrou que a HsImp α possui estrutura similar à outras Imp α , apresentando, majoritariamente, hélices- α em sua estrutura. O DLS e o FS da amostra da HsImp α isolada mostram que há uma possível oligomerização quando submetida ao aumento gradual da temperatura (5 °C a 25 °C), sendo que a 5 °C ela se mostra majoritariamente monomérica. Já a análise dos resultados de DLS e FS do complexo HsImp α /SV40-NLS mostram que há uma melhor estabilização do complexo na presença da NLS. Quando analisada a amostra da HsImp α isolada pela técnica de FS, medindo diferentes amostras para cada temperatura (5, 10, 20 e 25 °C, foi observado que não há a oligomerização. A FS do complexo HsImp α /SV40-NLS, também medida uma amostra para cada temperatura (5, 10, 20 e 25 °C), sendo observado pequenas variações na exposição dos triptofanos, indicando que a afinidade do complexo é baixa, posteriormente confirmada com a técnica de ITC. A mesma análise de FS foi empregada para o complexo HsImp α /XPG1-NLS, sendo observado que há ligação em todas as temperaturas analisadas. Esta ligação se mostra forte e favorável, quando analisada pelo ITC, assim como já observado com a MmImp α em outro estudo realizado por nosso grupo. Foi realizado também a análise da HsImp α com peptídeo NLS de outro organismo (fungo), PAC-3-NLS com ITC, resultando que a afinidade do complexo não pode ser determinada, pois os termogramas obtidos não foram reprodutíveis, diferente do observado em outro estudo com a MmImp α , em que a afinidade do complexo é alta. Experimentos de co-cristalização estão sendo realizados visando a obtenção dos detalhes da interação dos complexos, sendo obtidos pequenos cristais que precisam ser otimizados. Os resultados apresentados indicaram uma possível oligomerização da Imp α truncada quando isolada, porém, quando complexada com peptídeos NLSs de alta afinidade, como a XPG1, a proteína é majoritariamente monomérica. Possíveis diferenças na estequiometria e na afinidade do complexo HsImp α /XPG1-NLS em comparação com o MmImp α /XPG1-NLS podem indicar o modo de interação diferente entre eles. Estes resultados fortalecem a importância dos estudos entre as Imp α e NLSs de diferentes organismos, extremamente importante para futuros estudos farmacológicos.

Abstract

One of the best characterized transport routes is mediated by Importin- α (Imp α), called the classical nuclear import pathway. In this pathway, Importin- β (Imp β) binds to Imp α , pushing away the self-inhibitory domain of Imp α , allowing the recognition and binding of nuclear localization sequences (NLS) present in the proteins to be imported. Several variants of Imp α have been identified in different organisms, which have been classified into three subfamilies ($\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$) based on the sequential similarity between them. The *Homo sapiens* Imp α has seven variants, and its $\alpha 1$ variant has high similarity with the $\alpha 2$ variant of *Mus musculus* (MmImp α), the first mammalian Imp α to be structurally elucidated and widely used in the study of nuclear import processes. Furthermore, with advances in studies in this area, the structures of Imp α from human, fungus and rice were elucidated, revealing that these structures are highly conserved, but have different characteristics, such as affinity to different NLSs, due to the regions adjacent to the Imp α binding sites. There is still little information about these differences, despite the great academic and pharmacological importance, due to the specificity of protein transport. Therefore, this work aimed to produce the $\alpha 1$ variant of HsImp α and its structural comparison with MmImp α , and to study the interaction between HsImp α and NLS SV40, XPG1 and PAC-3 peptides. For this purpose, transformation, expression and purification of the HsImp α protein were performed, as well as structural analysis with dynamic light scattering (DLS), circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy (FS) techniques. The affinity analysis of the complexes HsImp α /XPG1-NLS, HsImp α /SV40-NLS and HsImp α /PAC-3 were performed using isothermal titration calorimetry (ITC). The CD showed that HsImp α has a structure similar to other Imp α , mostly presenting α -helices in its structure. The DLS and FS of the isolated HsImp α sample show that there is a possible oligomerization when subjected to a gradual increase in temperature (5 °C to 25 °C), but at 5 °C it is mostly monomeric. The analysis of the DLS and FS results of the HsImp α /SV40-NLS complex showed that there is better stabilization of the sample in the presence of the NLS. When the isolated HsImp α sample was analyzed by the FS technique, measuring different samples for each temperature (5, 10, 20 and 25 °C), it was observed that there is not oligomerization. The FS of the complex HsImp α /SV40-NLS, with also one sample measured at each temperature (5, 10, 20 and 25 °C), indicated small variations in the exposure of tryptophans, showing that the affinity of the complex is low, which was later confirmed by the ITC technique. The same FS analysis was performed for the HsImp α /XPG1-NLS complex, being observed that there was binding at all temperatures analyzed. This binding was strong and favorable when analyzed by the ITC, as has already been observed with MmImp α in another study carried out by our group. A analysis of HsImp α with NLS peptide from other organism (fungus) was also performed (HsImp α /PAC-3-NLS complex) by ITC, but its affinity could not be determined, as the thermograms obtained were not reproducible, unlike that observed in another study with MmImp α , which the affinity was high. Co-crystallization experiments are being carried out in order to obtain details of the interaction of the complexes, obtaining small crystals that need to be optimized. The results presented here indicated the possible oligomerization of truncated Imp α when isolated, however, when complexed with high-affinity NLSs peptides, such as XPG1, the protein is mostly monomeric. Possible differences in the stoichiometry and affinity of the HsImp α /XPG1-NLS complex compared to MmImp α /XPG1-NLS may indicate different mode of interaction between them. These results strengthen the importance of studies between Imp α and NLSs from different organisms, extremely important for future pharmacological studies.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Composição do Complexo Poro Nuclear humano gerado por docking e reconstrução de cristal por Cryo-EM. As estruturas coloridas são as proteínas (nucleoporinas) que compõe o complexo poro nuclear. (A) Vista de cima da face citoplasmática do complexo poro nuclear; (B) uma vista em corte transversal de dentro do canal de transporte (Electron Microscopy Data Bank entry number EMD-3103) Figura adaptada de (Lin et al., 2016)). 14
- Figura 2 – Esquema simplificado da Via Clássica de Importação Nuclear. A Imp β se acopla a Imp α afastando o seu domínio auto inibitório (1,2) permitindo a ligação da NLS que será importada (3). Imp β interage com os filamentos citoplasmático (4), possibilitando a passagem do complexo Imp α /Imp β /NLS pela cesta do poro nuclear (5). Dentro do núcleo, a RanGTP se acopla ao complexo Imp α /Imp β /NLS (6), ocasionando sua dissociação, deixando o NLS livre no núcleo (7) para exercer sua função, enquanto, a Imp α e a Imp β , são recicladas para o citoplasma com auxílio das exportinas. 16
- Figura 3-Representação da estrutura tridimensional da Importina- α contendo um domínio IBB e 10 repetições armadillo (Adaptado de Kobe, 1999). 17
- Figura 4 -Gel de Eletroforese em SDS (12%) para conferência do teste de indução. A) teste de indução da linhagem DE3-pLysS. B) teste de indução da linhagem DE3-Códonplus. Os símbolos representam: Ø – Não Induzido; M - Marcador; 1- 50mM de IPTG em 3h; 2-100mM em 3h; 3-150mM em 3h; 4- 50mM de IPTG em 4h; 5-100mM em 4h; 6-150mM em 4h; 7- 50mM de IPTG em 5h; 8-100mM em 5h; 9-150mM em 5h; 30
- Figura 5- A) Cromatograma referente a purificação por afinidade utilizando tampão de 300mM de imidazol. Neste cromatograma observa-se a injeção da amostra (Inj) e os picos de proteína obtidos durante a lavagem (1), 30% e 100% do tampão de eluição; B) Os picos foram analisados por western blotting, em que 1,2,3, mostram a presença da proteína HsImp α , porém com a presença de outras proteínas com maiores e menores massas moleculares. A referência (ref) usada foi a proteína importina- α de *Mus musculus*, que apresenta massa semelhante a HsImp α 31
- Figura 6- Cromatograma referente cromatografia líquida por exclusão molecular realizado com a HsImp α utilizando a coluna Superdex 75. 32
- Figura 7 – A) Cromatograma referente a purificação por afinidade utilizando tampão de 150mM de imidazol. Neste cromatograma observa-se a injeção da amostra (Inj) e os picos de proteínas obtidos: 1- lavagem, 2, 3, 4, 5- 5%, 10%, 25%, 30% e 100% de tampão de eluição, respectivamente. B) Gel de Eletroforese 12% contendo as etapas de expressão e purificação: Ø – Não induzido; Ind – Induzido; P- Pellet; S – Solúvel; Inj – Injeção; 1, 2, 3, 4 e 5-Picos referentes ao cromatograma em A); M- Marcador. 33
- Figura 8 -A) Espectro de dicroísmo circular da HsImp α . B) Curva de desnaturação da HsImp α obtida a partir da técnica de CD, quando analisada nos comprimentos de onda de 190 a 260nm, nas temperaturas de 10 a 90 °C. C) Espectro de dicroísmo circular da MmImp α . D) Curva de desnaturação da MmImp α obtida a partir da técnica de CD, quando analisada nos comprimentos de onda de 190 a 260nm, nas temperaturas de 10 a 90 °C. 34

Figura 9 – Espectroscopia de Fluorescência realizada com a HsImp α isolada em rampa de temperatura de 5 a 25 °C.....	38
Figura 10 -Espectroscopia de Fluorescência realizada com a interação da HsImp α com o peptídeo SV40-NLS, também realizada em rampa de temperatura de 5 °C a 25 °C.	39
Figura 11 – Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /SV40-NLS em rampa de temperatura. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.	40
Figura 12 - Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /SV40-NLS, quando analisadas separadamente. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.	41
Figura 13 - Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /XPG1-NLS. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.....	42
Figura 14- Comparação dos espectros obtidos pela Espectroscopia de Fluorescência. A) HsImp α Isolada; B) HsImp α /XPG1-NLS; C) HsImp α /SV40-NLS	43
Figura 15 - Termogramas referentes aos complexos A) HsImp α /SV40-NLS e B) HsImp α /XPG1-NLS, realizados a 20 °C.	45
Figura 16 - Termogramas referentes ao complexo HsImp α /PAC-3-NLS A) e B) realizados com a PAC-3-NLS à 300 μ M, C) e D) 600 μ M.	46
Figura 17 - Cristais obtidos pelas técnicas sitting-drop da HsImp α isolada (A e B) e hanging drop do complexo HsImp/XPG1-NLS (C e D).....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Divisão das subfamílias entre importinas de Homo sapiens e Mus musculus.	19
Tabela 2 - Complexos contendo isoformas da HsImp α depositadas no Protein Data Bank (PDB)	20
Tabela 3 - Sequências de localização nuclear dos peptídeos NLS SV40 e Nucleoplasmina utilizadas como exemplos de NLSs monopartidas e bipartidas, respectivamente.	21
Tabela 4 – Resultados da técnica de Dicroísmo Circular para a HsImp α	34
Tabela 5 - Resultado do espalhamento de luz dinâmico da HsImp α	35
Tabela 6 - Resultados do espalhamento de luz dinâmico da MmImp α	35
Tabela 7 - Resultados do espalhamento de luz dinâmico da MmImp α com uma nova amostra	36
Tabela 8- Resultado espalhamento de luz dinâmico HsImp α /SV40-NLS	36
Tabela 9 - Resultados espalhamento de luz dinâmico MmImp α /SV40-NLS.....	36
Tabela 10- Dados Calorimétricos dos complexos HsImp α /SV40-NLS e HsImp α / XPG1-NLS	44
Tabela 11 - Dados Calorimétricos do complexo HsImp α / PAC-3 realizado a 20 °C.....	45

Lista de siglas

NPC – Complexo poro nuclear
Nups – Nucleoporinas
Imp α - Importina- α
IPTG – Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Imp β – Importina- β
NLS – Sequência de localização nuclear
NLSs – Sequências de localização nuclear
cNLS - Sequências de localização nuclear clássicas
RanGTP - Guanosina trifostato complexada a proteína Ran
RBBP4 - *Retinoblastoma binding protein 4*
IBB – Importin beta binding
PTAC – Nuclear pore-targeting complex
ARM repeats – repetições *armadillo*
HsImp α - Importina- α de *Homo sapiens*
MmImp α – Importina- α de *Mus musculus*
NcImp α – Importina- α de *Neurospora crassa*
PDB – *Protein data bank*
SV40 – Antígeno T do vírus Símio-40
Nucleop1 – Nucleoplasmina
PAC-3 – Fator de transcrição responsivo ao pH
XPG1 – Xeroderma Pigmentoso tipo G
K_d – Constante de dissociação
DLS – Espalhamento de luz dinâmico
ITC – Calorimetria por Titulação Isotérmica
CD – Dicroísmo Circular
SEC – Cromatografia por exclusão de tamanho
E. coli – *Escherichia coli*
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
NaCl – Cloreto de Sódio
K_{av} – Volume de retenção

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Características do transporte núcleo - citoplasma	13
1.2 Estrutura da Importina- α	17
1.3 Variantes da Importina- α de <i>Homo sapiens</i>	19
1.4 Sequências de localização nuclear (<i>nuclear localization sequences</i> – NLSs)	20
1.5 Peptídeos NLSs escolhidos para a análise com a HsImp α	21
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Síntese dos peptídeos NLS	24
3.2 Clonagem da proteína recombinante HsImp α	24
3.3 Transformação bacteriana	24
3.4 Testes de indução	25
3.5 Expressão HsImp α	25
3.6 Testes de purificação da HsImp α	26
3.7 Western Blotting	27
3.8 Expressão e purificação das proteínas MmImp α	27
3.9 Dicroísmo Circular	27
3.10 Espalhamento de Luz Dinâmico	27
3.11 Espectroscopia de Fluorescência	28
3.12 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	28
3.13 Cristalização de proteínas	28
4. RESULTADOS	30
4.1 Transformação e Expressão da HsImp α	30
4.2 Purificação da HsImp α	31
4.3 Dicroísmo Circular (CD) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	33
4.4 Espectroscopia de Fluorescência (FS)	37
4.5 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	44
4.6 Cristalização de Proteínas	46
5. DISCUSSÃO	47
5.1 A Produção da Importina- α de <i>Homo sapiens</i>	47
5.2 Análise da estrutura da HsImp α mostra que ela possui características similares à outras Imp α	48
5.3 Estudos da interação da HsImp α com peptídeos NLSs	50
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características do transporte núcleo - citoplasma

As células eucariontes são caracterizadas pela presença de um núcleo muito bem definido, envolto por uma membrana que o separa do citoplasma. Por esta membrana ocorre o transporte de moléculas necessárias para o funcionamento das células.

O transporte de moléculas entre o núcleo e o citoplasma, ocorre por meio do complexo poro nuclear (*nuclear pore complex* – NPC) (Figura 1) que está ancorado ao envelope nuclear, e por onde moléculas pequenas, como íons, metabólitos e outras com até 40 kDa, atravessam-no livremente, enquanto moléculas maiores, como proteínas, RNA e DNA necessitam de um receptor de transporte nuclear, como as importinas, para atravessá-lo (Gorlich & Kutay, 1999)

O NPC é constituído por proteínas chamadas de nucleoporinas (Nups) e apresenta uma estrutura bidirecional, que permite o transporte de moléculas tanto do citoplasma para o núcleo, quanto do núcleo para o citoplasma. Em vertebrados, o NPC possui espessura de ~50 nm, diâmetro externo (região voltada ao citoplasma), de 80 a 120 nm de diâmetro interno (região voltada ao núcleo) (Bui et al., 2013), e massa de ~125 MDa em vertebrados (Reichelt et al., 1990). Além disso, cada poro possui uma estrutura em forma de cesta de basquete, que é ancorada por anéis octogonais nas partes citoplasmática e nuclear do NPC (Beck et al., 2004; Stoffler et al., 2003), e apresenta filamentos que se estendem ao citoplasma, conhecidos como filamentos citoplasmáticos (Grossman et al., 2012, Lin et al., 2016).

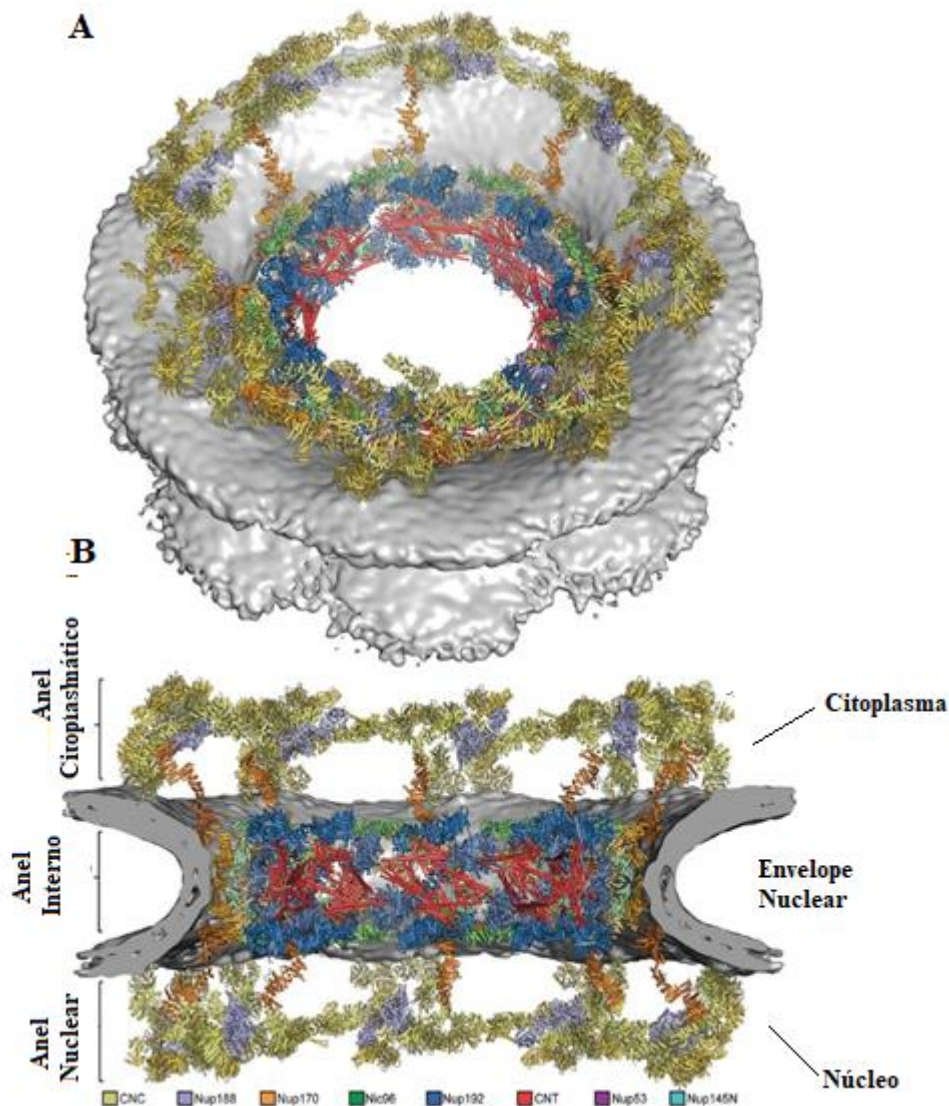


Figura 1 – Composição do Complexo Poro Nuclear humano gerado por *docking* e reconstrução de cristal por Cryo-EM. As estruturas coloridas são as proteínas (nucleoporinas) que compõe o complexo poro nuclear. (A) Vista de cima da face citoplasmática do complexo poro nuclear; (B) uma vista em corte transversal de dentro do canal de transporte (*Electron Microscopy Data Bank entry number EMD-3103*) Figura adaptada de (Lin et al., 2016).

O transporte núcleo-citoplasmático é dividido em duas fases: a móvel, na qual estão envolvidos os adaptadores e receptores de moléculas, e outra estacionária, que são os componentes estruturais do NPC (Mattaj & Englmeier, 1998). Os componentes da fase estacionária são as nucleoporinas, que são de suporte (*Scaffold Nups*), que formam o canal central por onde passam as moléculas, e as nucleoporinas-FG (*FG-Nups*), ricas em repetições de fenilalanina-glicina, responsáveis por formar uma barreira de permeabilidade e seletividade do canal central (Frey et al., 2018; Timney et al., 2016). As nucleoporinas-FG são fundamentais para a importação nuclear, por possuírem sítios de ligação para as importinas, que são as

proteínas responsáveis pela direção do transporte e liberação das moléculas maiores que 40 kDa (Sorokin et al., 2010; Suntharalingam & Wenthe, 2003).

Para o transporte de macromoléculas há uma série de interações dos componentes da fase estacionária com os da móvel, como no caso da Via Clássica de Importação (Lange et al., 2007) (Figura 2). Nesta via são importadas para o núcleo proteínas que possuem Sequências de Localização Nuclear (NLSs), com o auxílio do heterodímero Importina- α /Importina- β (Imp α /Imp β).

A importação das NLSs inicia-se com a ligação da Imp β ao *Importin Beta Binding* (IBB domain), que atua como domínio auto inibitório da Imp α , ocasionando seu afastamento, deixando a Imp α ativa, para que ela faça o reconhecimento e ligação das NLSs. Com isso é formado o complexo Imp α /Imp β /NLS, sendo este importado para o núcleo por meio da série de eventos desencadeados com a interação da Imp β com os filamentos citoplasmáticos do NPC (Conti et al., 1998; Conti & Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2000; Stewart, 2007, Oka & Yoneda, 2018).

Após adentrar o núcleo celular, o complexo é desassociado com a ligação do RanGTP à Imp β , modificando a sua conformação e deixando o domínio IBB livre (Lindsay et al., 2002; Matsuura & Stewart, 2004). O domínio IBB passa a competir com os sítios de ligação da NLS e interage com a nucleoporina Npap60 ou RBBP4 (*Retinoblastoma binding protein 4*, também chamada de RbAp48), contribuindo na regulação do processo de importação e na liberação da macromolécula, uma vez que este diminui a afinidade do NLS à Imp α (Kobe, 1999; Lindsay et al., 2002; Matsuura & Stewart, 2004; Ogawa et al., 2009).

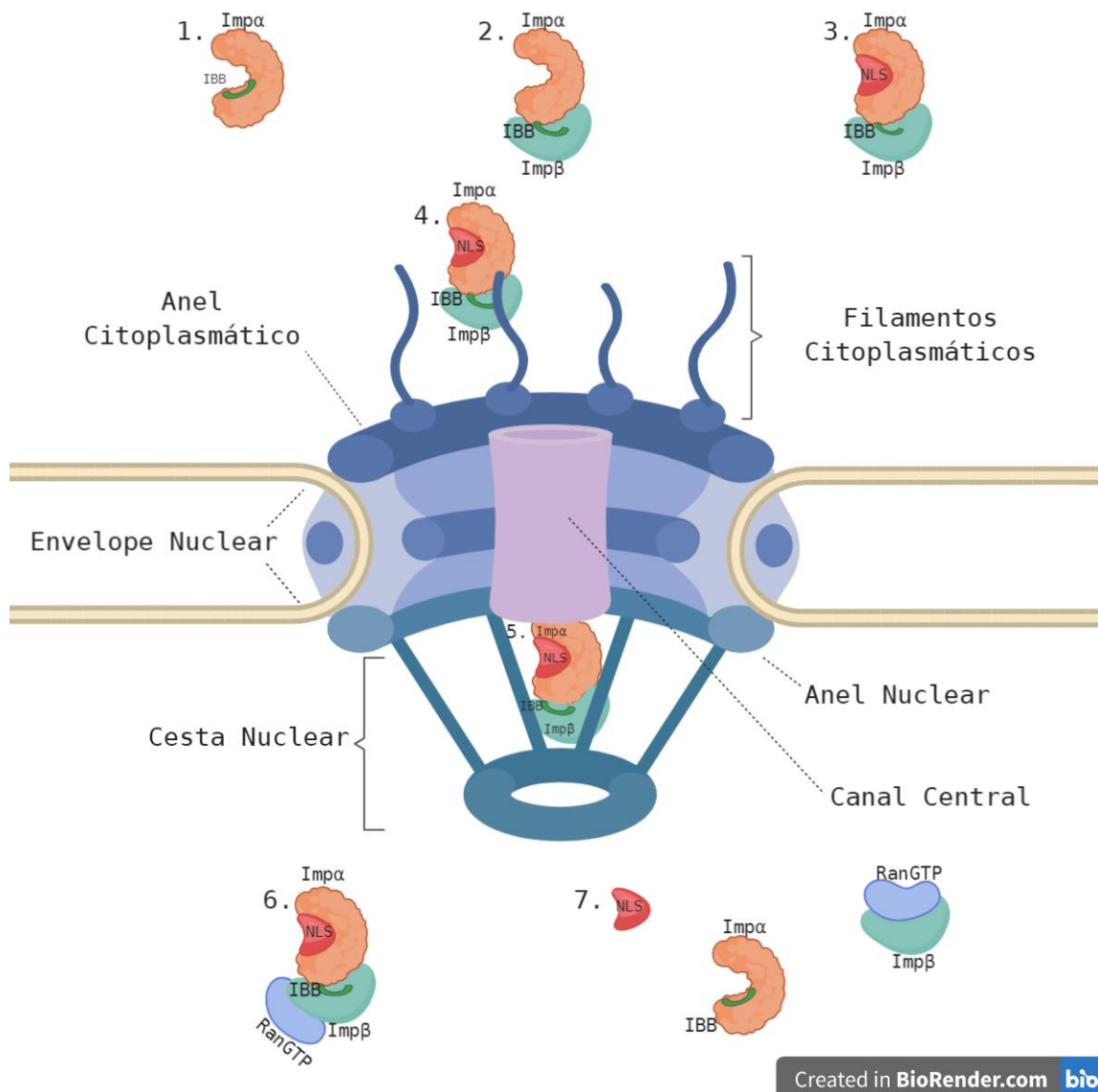


Figura 2 – Esquema simplificado da Via Clássica de Importação Nuclear. A $\text{Imp}\beta$ se acopla a $\text{Imp}\alpha$ afastando o seu domínio auto inibitório (1,2) permitindo a ligação da NLS que será importada (3). $\text{Imp}\beta$ interage com os filamentos citoplasmático (4), possibilitando a passagem do complexo $\text{Imp}\alpha/\text{Imp}\beta/\text{NLS}$ pela cesta do poro nuclear (5). Dentro do núcleo, a RanGTP se acopla ao complexo $\text{Imp}\alpha/\text{Imp}\beta/\text{NLS}$ (6), ocasionando sua dissociação, deixando o NLS livre no núcleo (7) para exercer sua função, enquanto, a $\text{Imp}\alpha$ e a $\text{Imp}\beta$, são recicladas para o citoplasma com auxílio das exportinas.

Com a desassociação do complexo no núcleo, há a formação de um novo complexo contendo a $\text{Imp}\alpha$, a RanGTP e a exportina CAS/CSE1L, que auxiliam na reciclagem da proteína $\text{Imp}\alpha$, transportando-a de volta ao citoplasma (Kutay et al., 1997; Lange et al., 2007). A $\text{Imp}\beta$ também é reciclada para o citoplasma de maneira similar, a partir da formação do complexo $\text{Imp}\beta/\text{RanGTP}/\text{exportinas}$, que é dissociado no citoplasma por meio da RanGAP , (hidrólise da RanGTP) e, assim como a $\text{Imp}\alpha$, ficando disponível para um novo ciclo de importação (M Stewart, 2006).

1.2 Estrutura da Importina- α

As estruturas cristalográficas da Imp α de diferentes organismos, como *Mus musculus* (Kobe, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Conti et al., 1998), *Homo sapiens* (Cutress et al., 2008), *Oryza sativa* (Chang et al., 2012), *Neurospora crassa* (Natalia E. Bernardes et al., 2015) e *Arabidopsis thaliana* (Wirthmueller et al., 2015), já foram elucidadas.

A estrutura da Imp α é bem conservada, sendo que em sua porção N-terminal está o domínio auto inibitório ou domínio IBB, que abrange aproximadamente 70 resíduos. Na sua região central estão presentes dez repetições *armadillo* (ARM repeats), constituídas por três estruturas em alfa hélice cada, responsáveis pela formação dos dois sítios de ligação e reconhecimento das NLSs.

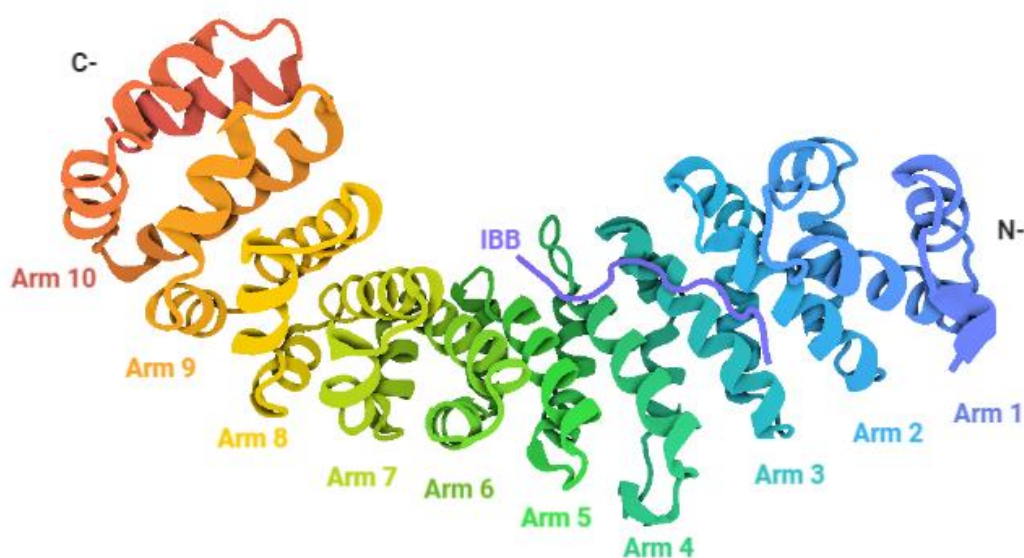


Figura 3 - Representação da estrutura tridimensional da Importina- α contendo um domínio IBB e 10 repetições *armadillo* (Adaptado de Kobe, 1999).

Apesar da conservação da estrutura, a Imp α sofreu diversas alterações devido às exigências cada vez mais complexas dos seres vivos, como a necessidade de realizar funções específicas em suas células e tecidos (Mason et al., 2009), ocasionando no surgimento de variantes que possuem especificidades à diferentes moléculas.

As variantes da Imp α apresentam diferenças funcionais que possibilitam a identificação e o transporte de diversas macromoléculas como proteínas, fatores de transcrição e vírus. Em alguns organismos, tais como *S. cerevisiae* (ScImp α - levedura de cerveja) e *N. crassa* (NcImp α

- fungo vermelho do pão), as Imp α possuem apenas uma variante, enquanto a *Drosophila melanogaster*, apresenta três variantes. As Imp α de mamíferos, como *M. musculus* e *H. Sapiens*, apresentam seis e sete variantes respectivamente, apresentando alto grau de similaridade entre elas (Tabela 1)(Pumroy & Cingolani, 2015).

Baseado na similaridade da sequência de aminoácidos, as Imp α de diferentes organismos são classificadas em três subfamílias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (Miyamoto et al., 2016; Pumroy & Cingolani, 2015). Em contrapartida, as Imp α dos reinos *Viridiplantae* e *Fungi*, como a *O. sativa* e *N.crassa*, pertencem à classe $\alpha 1$ -like, pois suas sequências se diferenciam em mais de 75% das variantes de outros reinos (Christie et al., 2016a; Köhler et al., 1999).

As variantes da Imp α desempenham funções fisiológicas diferentes nos mais variados organismos (Miyatake et al., 2015) e são expressas em diferentes estágios de desenvolvimento dos organismos. Por exemplo, as variantes humanas ($\alpha 1$, $\alpha 3$, etc) estão presentes em todas as células adultas, com exceção da variante $\alpha 6$, expressa apenas nos testículos, e a $\alpha 8$, encontrada nos ovários e em estágios embrionários iniciais (Hu et al., 2010; Tejomurtula et al., 2009).

Além das diferenças fisiológicas, as variantes da Imp α possuem diferenças em suas estruturas e propriedades bioquímicas, que podem alterar, significativamente, sua especificidade à outras moléculas (Pumroy & Cingolani, 2015). Um exemplo disto são os estudos comparativos entre as Importinas- α de camundongos e humanos realizados por ensaios *in silico*, nos quais há altos indícios de que a isoforma $\alpha 3$ da Imp α de *Homo sapiens* (HsImp α) possui uma maior flexibilidade em sua estrutura, devido à presença de uma “dobradiça” no sítio principal (Pumroy et al., 2014), podendo explicar a menor afinidade a algumas NLSs clássicas (Pumroy et al., 2014; Tachibana et al., 2000).

Tabela 1 - Divisão das subfamílias entre importinas de *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

Gene	Subfamília	Identidade entre as variantes	Imp α de Homo sapiens	Imp α de Mus musculus
KPNA2	$\alpha 1$	55%	$\alpha 1$	$\alpha 2$
KPNA7			$\alpha 8$	$\alpha 8$
KPNA4			$\alpha 3$	$\alpha 4$
KPNA3	$\alpha 2$	86%	$\alpha 4$	$\alpha 3$
KPNA1			$\alpha 5$	$\alpha 1$
KPNA5	$\alpha 3$	74%	$\alpha 6$	-
KPNA6			$\alpha 7$	$\alpha 6$

Fonte: (Oka & Yoneda, 2018; Pumroy & Cingolani, 2015)

1.3 Variantes da Importina- α de *Homo sapiens*

Os seres humanos apresentam sete variantes da Imp α , das quais cinco já foram elucidadas e estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Tabela 2). Estas estão divididas em três subfamílias: a $\alpha 1$ apresenta as variantes $\alpha 1$ e $\alpha 8$, a $\alpha 2$ apresenta as variantes $\alpha 3$ e $\alpha 4$, e a $\alpha 3$ apresenta as variantes $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$ (Miyamoto et al., 2016; Oka & Yoneda, 2018; Pumroy & Cingolani, 2015).

A subfamília $\alpha 1$ apresenta 59% de identidade entre suas sequências (Pumroy & Cingolani, 2015). A variante $\alpha 1$ da HsImp α é conhecida há quase duas décadas (Weis et al., 1995) e foi elucidada pela primeira vez em 2008, quando analisada sua interação com o *cap-binding complex* (CBC) (Dias et al., 2010). Esta variante possui alta similaridade com a variante $\alpha 2$ de *Mus musculus* (99,2%), usada na maioria dos estudos estruturais realizados até o momento, e apresenta similaridade sequencial com a Kap60 (Imp α de *S. cerevisiae*), com a $\alpha 2$ da mosca das frutas (*D. melanogaster*) e com a variante do anfíbio *Xenopus laevis*. A variante $\alpha 8$ foi recentemente caracterizada, portanto, pouco se sabe sobre ela e suas funções fisiológicas, além do fato de ser hiperexpressa em algumas formas de câncer de próstata (Laurila et al., 2014).

A subfamília $\alpha 2$ possui uma maior similaridade entre suas variantes, com aproximadamente 86% (Pumroy & Cingolani, 2015). As variantes $\alpha 3$ e $\alpha 4$ foram descobertas no ano de 1997 (Miyamoto et al., 1997), e são conhecidas por possuírem alta afinidade à fatores de transcrição (Fagerlund et al., 2005). Apesar da alta similaridade entre as variantes desta família, apenas a estrutura da $\alpha 3$ é conhecida (Pumroy et al., 2014).

A subfamília $\alpha 3$ contém duas variantes: a variante $\alpha 5$ (Cortes et al., 1994), caracterizada simultaneamente à $\alpha 1$, teve sua estrutura elucidada em duas conformações, sendo que uma delas interage com a NLS do vírus da Influenza A PB2 (Tarendeau et al., 2007) e a outra com a nucleoporina Nup50 (Pumroy et al., 2012). A variante $\alpha 7$ (Köhler, 1999) também teve sua estrutura resolvida com a interação com a NLS do vírus da Influenza A PBA. Diferentemente das duas anteriores, a variante $\alpha 6$ de HsImp α teve sua elucidação em um complexo formado com a NLS do vírus Ebola VP24 (Xu et al., 2015)

Tabela 2 - Complexos contendo isoformas da HsImp α depositadas no *Protein Data Bank* (PDB)

Variante	Subfamília	Código PDB	Autor/Ano
$\alpha 1$	$\alpha 1$	4WV6	(Trowitzsch et al., 2015)
$\alpha 3$	$\alpha 4$	4UAE	(Pumroy et al., 2014)
$\alpha 5$		3TJ3	(Pumroy et al., 2012)
$\alpha 6$	$\alpha 3$	4U2X	(Xu et al., 2015)
$\alpha 7$		4UAD	(Pumroy et al., 2014)

1.4 Sequências de localização nuclear (*nuclear localization sequences* – NLSs)

As NLSs são a chave para que exista o transporte pela Via Clássica de Importação, uma vez que o transporte núcleo-citoplasmático só ocorre a partir do reconhecimento destas sequências pela Imp α . Elas são melhor caracterizadas pelas NLS clássicas (cNLS) que se apresentam de duas maneiras: monopartida, que possui um trecho de aminoácidos básicos (Lys ou Arg); ou bipartida, que possuem dois trechos destes (Lange et al., 2007). As cNLS monopartidas apresentam uma sequência consenso, sendo que na posição P2 há a presença de uma lisina, seguida por resíduos básicos até a posição P5, formando assim uma sequência do tipo K(K/R)X(K/R), sendo X um aminoácido diferente de Lys e Arg (Fanara et al., 2000; Lange

et al., 2007). Um exemplo é a NLS do antígeno T do vírus símio 40 (SV40), ¹²⁶PKKKRRV¹³², ((Fanara et al., 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2003b)). Já as NLSs bipartidas, possuem uma região de *linker*, formada por 10 a 12 aminoácidos que separam os dois conjuntos de aminoácidos que as constituem (Knudsen et al., 2009), sendo a sua forma consenso KRX₁₀₋₁₂KRXK, exemplificada pela NLS da nucleoplasmina, ¹⁵³AVKRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰ (Dingwall & Laskey, 1991; Fanara et al., 2000; Lange et al., 2007).

Tabela 3 - Sequências de localização nuclear dos peptídeos NLS SV40 e Nucleoplasmina utilizadas como exemplos de NLSs monopartidas e bipartidas, respectivamente.

NLS	S2										S1									
	P0'	P1'	P2'	P3'	P4'	Linker						P1	P2	P3	P4	P5				
SV40	P	K	K	K	R	K	V			A	A	P	P	K	K	K	R	K	V	E
Nucleop1	A	V	K	R	P	A		A	T	K	K	A	G	Q	A	K	K	K	K	
Consenso																				
Bipartido			K/R	K/R	X					X ₁₀₋₁₂					K	K/R	X	K/R		
Consenso																				
Monopartido															K	K/R	X	K/R		

1.5 Peptídeos NLSs escolhidos para a análise com a HsImpα

A maioria dos estudos estruturais realizados e depositados no *Protein Data Bank* foram realizados com a Impα de *M. musculus* (MmImpα) e NLSs de proteínas de diferentes organismos (Bernardes et al., 2020; Christie et al., 2016b; Cutress et al., 2008; de Barros et al., 2018; Fontes, et al., 2003). Por ser a primeira Impα de mamífero a ser elucidada (Kobe, 1999), a variante α2 de MmImpα é a mais utilizada em grande parte dos estudos, além do fato de que esta apresenta alto grau de identidade com a variante α1 da HsImpα. Porém, com o avanço dos estudos na área, notou-se que, eventualmente, alguma mutação em aminoácidos de regiões adjacentes às NLSs pode acarretar modificações significativas na afinidade entre a Impα e a proteína a ser transportada.

A cNLS do antígeno T do vírus Símio 40 (SV40) foi a primeira a ser trabalhada quando complexada com a Impα de *S. cerevisiae* (Conti et al., 1998), e por isso é considerada o padrão para análise da interação com a Impα de diversos organismos. Sendo assim, a utilização da SV40 para a análise da interação com a variante α1 da HsImpα é de extrema importância.

Apesar de ser considerada o padrão de cNLS, a SV40 não é a que apresenta a melhor afinidade a MmImp α e para uma melhor caracterização da interação de peptídeos NLSs com a HsImp α , foi escolhido o peptídeo NLS da proteína do Xeroderma Pigmentoso tipo G (XPG1), que apresenta uma maior afinidade à MmImp α , já trabalhada por nosso grupo de pesquisa (Barros et al., 2016).

Com o intuito de estudar a interação da HsImp α com NLSs de outros organismos, foi utilizado o peptídeo NLS do fator de transcrição PAC-3 do fungo *Neurospora crassa*, o qual já possui estudos estruturais e calorimétricos quando complexado às MmImp α e NcImp α (Bernardes et al., 2020).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi produzir a variante $\alpha 1$ da importina- α de *Homo sapiens* para a realização da análise estrutural comparativa com a variante $\alpha 2$ da importina- α de *Mus musculus* e, a análise calorimétrica dos complexos formados entre a HsImp α e os peptídeos NLSs SV40, XPG1 e PAC-3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese dos peptídeos NLS

Os peptídeos NLSs SV40 (¹²⁵PPKKKRKV¹³²), XPG1 (¹⁰⁵⁴KTQKRGITNTLEESSSLKKRLSD¹⁰⁷⁶) e PAC-3 (²⁸¹FDARKRQFDDLNDFFGSVKRRQIN³⁰⁴) foram sintetizados pela empresa GenOne Biotech - Brasil, com aproximadamente 98% de pureza.

3.2 Clonagem da proteína recombinante HsImp α

A sequência da variante $\alpha 1$ da HsImp α foi truncada em sua porção N-terminal, na região correspondente ao domínio auto inibitório Δ IBB (1-70):

Δ IBB:¹MSTNENANTPAARLHRFKNKGKDSTEMRRRRRIENVNVELRKAKKDDQMLKRRNVSSFPDDATSPLQENRNN⁷⁰

A sequência truncada foi inserida no vetor pET30a, sendo que em sua porção N-terminal, foi adicionada uma cauda de histidina (His-tag). Este procedimento foi realizado pela empresa GenOne Biotech – Brasil.

3.3 Transformação bacteriana

O processo de transformação das células competentes de *E. coli*, para a inserção do plasmídeo que continha a sequência da HsImp α , consistiu no uso da técnica de choque térmico. Neste processo, foram utilizadas as linhagens BL21(DE3) - Códon Plus e BL21(DE3) - pLysS, cedidas pela Prof^a Dr^a Maria Isabel Cano do Departamento Ciências Químicas e Biológicas – Setor Genética.

Alíquotas de 100 μ L de cada linhagem de células competentes descongeladas, com a adição de 0,6 μ L do plasmídeo da HsImp α com concentração de 85 ng/ μ L e colocados a ~ 2 °C durante vinte minutos. Após, as células foram colocadas a 45 °C por dois minutos e novamente a 2 °C por mais dois minutos, sendo esse processo repetido duas vezes.

As células competentes foram adicionadas a 500 μ L de meio LB e inoculadas por 1 hora. Em seguida, as células foram cultivadas em meio LB ágar, com os antibióticos cloranfenicol (50 mg/mL) e canamicina (100 mg/mL), e incubadas à 37 °C por aproximadamente 15 horas. Passadas as 15 horas, as células foram inoculadas novamente com 5 mL de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos, com a mesma concentração anterior, para serem armazenadas à -80 °C em cultura permanente com glicerol 20%.

3.4 Testes de indução

Antes da expressão definitiva da HsImp α foi necessário testar quais as melhores condições para indução da produção da proteína. Os testes foram realizados com as duas linhagens de *E. coli* transformadas, com as concentrações de 50, 100 e 150 mM do agente indutor IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) durante 3, 4 e 5 horas. Em seguida, as amostras foram avaliadas por meio de eletroforese em SDS 12% para identificação das melhores condições de indução.

3.5 Expressão da proteína recombinante HsImp α

Para que fosse possível trabalhar com a proteína HsImp α com alto grau de pureza, foi necessário fazer a expressão da proteína. Aliquotas da bactéria *E. coli* da linhagem BL21(DE3) - pLysS transformadas, foram pré-inoculadas com 20 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos cloranfenicol (50 mg/mL) e canamicina (100 mg/mL), mantidos sob agitação à 37 °C, por 15 horas.

Após, o conteúdo que apresentava crescimento celular foi adicionado à 1 L de meio LB líquido com os antibióticos à mesma concentração, para que houvesse crescimento celular em larga escala. Este foi mantido sob agitação à 37 °C até atingir a densidade óptica ótima (entre 0,6 e 1 de absorbância à 280 nm). A densidade óptica foi medida no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). Com a densidade ótima foi adicionado 10 mL de IPTG 100 mM (concentração final de 0,40 mM) para a indução da produção da proteína, ficando sob agitação por 4 horas com temperatura de 28 °C. Ao fim desse período, o conteúdo foi centrifugado (1969xg) por 20 min, a 4 °C para sedimentação das células bacterianas, permitindo a separação destas do meio de cultura.

O conteúdo sobrenadante foi descartado e a parte sedimentada foi submetida a lise celular química para a ruptura das células bacterianas. O tampão de lise continha 50 mM de Hepes pH 7, 150 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, lisozima (50 mg/mL), DNase (100 mg/mL), RNase (50 mg/mL) e 1 mg/mL de inibidores de proteases: Aprotinin, Leupeptin e Pepstatin. Em seguida, a solução foi centrifugada (1969xg) por 20 min a 4 °C, para que houvesse, novamente, a sedimentação das células bacterianas, e recuperação do sobrenadante contendo a proteína solúvel.

3.6 Testes de purificação da HsImpα

Os três testes de purificação da HsImpα foram realizados com o emprego da técnica de cromatografia líquida por afinidade, com a utilização da coluna His-Trap FF 5 mL (GE Healthcare, Inglaterra), acoplada ao HPLC ÄKTA *Purifier System* (GE Healthcare, Inglaterra).

Em um primeiro momento foram usadas as condições de purificação já caracterizadas, com sucesso, por outro grupo de pesquisa (Boivin & Hart, 2011), no qual as moléculas inespecíficas foram eluídas com 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl e 15 mM imidazol e a HsImpα foi eluída com 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl e 0.5 M imidazol.

No segundo teste, utilizou-se, para a eluição de moléculas inespecíficas, o tampão contendo 20 mM de Hepes pH 7,0, 1 M de NaCl e 15 mM de Imidazol e, para a eluição da HsImpα, utilizou-se o tampão contendo 20 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl e 300 mM de Imidazol.

Os picos de maior pureza observados no cromatograma da purificação por afinidade foram submetidos a cromatografia por exclusão molecular (gel filtração) com a utilização da coluna Superdex 75 (GE Healthcare, Inglaterra). A eluição foi feita com o tampão contendo 20 mM de Tris-HCl e 100 mM de NaCl.

O terceiro teste foi realizado utilizando o tampão contendo 20 mM de Hepes pH 7,0, 1 M de NaCl e 5 mM de Imidazol para a eluição de moléculas inespecíficas. Para a eluição da HsImpα, foi utilizado gradiente de imidazol, utilizando o tampão que continha 20 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol. Neste caso, não houve a necessidade de purificação por exclusão molecular.

Os picos de eluição observados através dos cromatogramas obtidos, foram coletados e as amostras de cada pico foram submetidas à análise por SDS-PAGE 12%. Assim, as frações mais puras foram concentradas através de centrifugação, utilizando o Amicon de 30 kDa (Millipore, Alemanha). Neste processo também foi possível a retirada do imidazol, para uma melhor estabilidade da proteína. As amostras concentradas foram guardadas à -20 °C e posteriormente, utilizada nos experimentos de Dicroísmo Circular, Espalhamento de Luz Dinâmico, Calorimetria por Titulação Isotérmica e Espectroscopia de Fluorescência.

3.7 Western Blotting

Para a averiguação da presença da HsImp α e de sua pureza durante as etapas de purificação, foi realizado o *western blotting*. Para isso, foram feitos dois géis SDS-Page 12% contendo amostras dos picos coletados durante a purificação por afinidade do segundo teste e uma única amostra de referência, MmImp α , que contém massa molecular aproximada da HsImp α . Em seguida foi realizada a transferência para a membrana, que foi incubada com o anticorpo Anti-His-tag (Sigma-Aldrich) por 2 horas e em seguida com o anticorpo Imunoglobulina G (Igg). A revelação se deu por quimiluminescência (ECL, GE Healthcare).

3.8 Expressão e purificação das proteínas MmImp α

A variante $\alpha 2$ da MmImp α truncada foi utilizada para comparação com a HsImp α , que foi expressa com base em procedimentos idênticos aos utilizados para a expressão da HsImp α (item 3.4)

A purificação da MmImp α foi realizada com uma coluna de níquel His-Trap FF 5mL acoplada ao HPLC ÄKTA *Purifier System* (GE Healthcare, Inglaterra). O tampão para eluição de moléculas inespecíficas continha 20 mM de Hepes pH 7, 1 M de NaCl e 15 mM de Imidazol. A eluição da proteína ocorreu por um gradiente de tampão contendo 20 mM de Hepes pH 7, 500 mM de NaCl e 150 mM de Imidazol. Após a purificação, o pico de maior concentração foi dialisado com tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8 e 100 mM de NaCl e depois foi concentrado, utilizando o Amicon 30 kDa (Millipore, Alemanha).

3.9 Dicroísmo Circular

Para a avaliação do enovelamento das proteínas Imp α de *M. musculus* e *H. sapiens*, foi utilizado o equipamento de Dicroísmo Circular Jasco J-815 (Jasco Inc., Canadá). As amostras de MmImp α e HsImp α tinham concentração de 0,180 mg/mL e 0,111 mg/mL, respectivamente, e foram avaliadas sob aquecimento gradual de 5 a 90 °C.

3.10 Espalhamento de Luz Dinâmico

Para a análise de agregação (grau de polidispersividade) e do raio hidrodinâmico das proteínas MmImp α e HsImp α isoladas e quando ligadas ao peptídeo SV40, foi realizado o Espalhamento de Luz Dinâmico com o equipamento DynaPro TITAN (Wyatt Technology,

EUA). Antes das medidas serem feitas, as amostras concentradas a 2 mg/mL foram filtradas com uma membrana de 0,22 μm e, em seguida feitas as medidas de DLS em rampa de temperatura de 5 a 25 $^{\circ}\text{C}$.

3.11 Espectroscopia de Fluorescência

Com o intuito de encontrar variações no ambiente dos triptofanos presentes na estrutura da HsImp α , foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência. Primeiro foram realizadas medidas em rampa de temperatura de 5 a 25 $^{\circ}\text{C}$. Para comparação, utilizou-se o complexo HsImp α /SV40-NLS, com o peptídeo concentrado a 240 μM e a proteína à 30 μM , também submetidos à rampa de temperatura de 5 a 25 $^{\circ}\text{C}$.

A técnica também foi realizada entre a proteína HsImp α (30 μM) e os complexos HsImp α /SV40-NLS (30 μM /240 μM) e HsImp α /XPG1-NLS (30 μM /300 μM) sem rampa de temperatura, apenas medidas, separadamente, nas temperaturas 5, 10, 20 e 25 $^{\circ}\text{C}$, para a verificar se haveria diferença em relação à rampa de temperatura.

Em todos os casos foi empregado o teste *t-student* para análise da diferença entre os espectros, considerando nível de significância de 5% (*p-value*<0.05)

3.12 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)

A fim de obter as constantes de afinidade relacionadas a interação da proteína HsImp α com o peptídeo SV40-NLS, XPG1 e PAC-3, utilizou-se um calorímetro MicroCal ITC 200 (GE Healthcare, Inglaterra).

Mais lindaPara os complexos HsImp α /SV40-NLS (30 μM /240 μM) e HsImp α /XPG1-NLS (30 μM /300 μM) foram realizadas vinte titulações, à 20 $^{\circ}\text{C}$, com rotações de 800 rpm e os dados foram processados pelo programa Origin ITC (Microcal Software, EUA), para a obtenção dos valores de entalpia (ΔH), entropia (ΔS), constante de dissociação (K_d) e estequiometria (n) de cada interação. Já o complexo HsImp α /PAC-3-NLS (30 μM /300 μM) também foi realizado com os mesmos parâmetros, entretanto, não foi possível a repetição do experimento, então novos parâmetros foram testados, sendo mudado a rotação de 800 rpm para 600 rpm, a temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$ para 10 $^{\circ}\text{C}$ e a concentração do peptídeo para 600 μM .

3.13 Cristalização de proteínas

Para obtenção de cristais da proteína HsImp α e, dos complexos HsImp α /XPG1-NLS, HsImp α /PAC-3-NLS e HsImp α /SV40-NLS, ocorreu uma busca para encontrar condições adequadas para as soluções com a utilização dos kits de soluções de cristalização pré-estabelecidos, JCGS HT-96 (Molecular Dimensions) e JCSG ++HTS L (Jena Bioscience).

A montagem das placas pela técnica de sitting-drop, foi realizada com o auxílio do robô de cristalização Oryx4 (Douglas Instruments). Foram montadas quatro placas, sendo que duas continham 1,5 μ L de HsImp α (12 mg/mL) e 0,5 μ L das soluções do reservatório, na gota e 500 μ L das soluções dos kits de cristalização, no reservatório, E, as outras duas, continham as mesmas quantidades, porém a HsImp α estava na concentração de 18 mg/mL. Já para os três complexos, foram utilizados 1 μ L de proteína (12 mg/mL), 0,5 μ L de peptídeo (1:8 moléculas) e 0,5 μ L de solução do reservatório, na gota e, 500 μ L no reservatório.

Além das placas de sitting-drop, foram montadas placas pela técnica de hanging-drop para o complexo HsImp α /XPG1-NLS. Antes da montagem das placas, foi realizado o teste para encontrar a melhor concentração da proteína HsImp α , com o kit de Pré Cristalização (PCT - Hampton Research). As gotas continham 1 μ L de proteína (10 mg/mL), 0,5 de peptídeo (1:8 moléculas) e 0,5 das soluções do reservatório. Desta vez, as soluções do reservatório utilizadas foram as condições que obtiveram maior taxa de sucesso em triagens iniciais, contendo Citrato de sódio 0,1 M e os agentes precipitantes PEG 3500, 4000 e 6000, sendo variadas suas concentrações de 15 a 22%.

4. RESULTADOS

4.1 Transformação e Expressão da HsImp α

A inserção do vetor contendo o gene da variante $\alpha 1$ da HsImp α , na bactéria *E. coli* (linhagens BL21 (DE3) *Códon Plus* e pLysS) foi bem-sucedida. As bactérias foram pré-inoculadas e submetidas ao teste de indução (Figura 4) com diferentes concentrações de IPTG, analisados de hora em hora, a partir de 3 horas de indução.

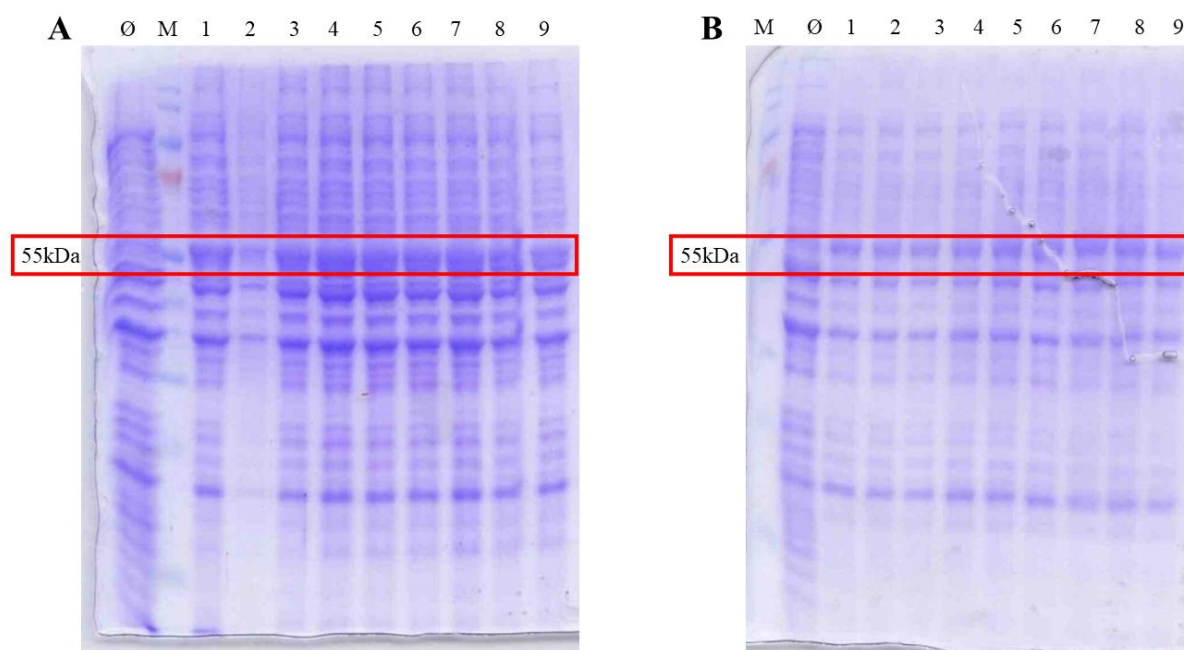


Figura 4 -Gel de Eletroforese em SDS (12%) para conferência do teste de indução. A) teste de indução da linhagem DE3-pLysS. B) teste de indução da linhagem DE3-Códonplus. Os símbolos representam: Ø – Não Induzido; M - Marcador; 1- 50mM de IPTG em 3h; 2-100mM em 3h; 3-150mM em 3h; 4- 50mM de IPTG em 4h; 5-100mM em 4h; 6-150mM em 4h; 7- 50mM de IPTG em 5h; 8-100mM em 5h; 9-150mM em 5h;

A análise do gel (Figura 4) indica que a proteína, que possui ~55 kDa, está bem induzida a partir da 4ª hora com a utilização do IPTG 100 mM Assim, o extrato da indução foi centrifugado e, o conteúdo da sedimentação, submetido à lise celular química.

4.2 Purificação da HsImp α

Para a obtenção da proteína com alto grau de pureza, a porção sobrenadante do conteúdo da lise celular foi submetida a cromatografia por afinidade. No primeiro teste realizado, seguindo o protocolo descrito por Boivin e Hart (Boivin & Hart, 2011), a proteína precipitou logo após a eluição, dando indícios de que a concentração salina estaria muito alta.

Para tanto, um novo teste de purificação foi realizado, com tampões de equilíbrio e eluição contendo menores concentrações salinas. Com isso, obteve-se 3 picos no cromatograma (Figura 5a) que foram coletados e verificados pela técnica de *western blotting*. O pico 1 foi obtido durante a lavagem da coluna e os picos 2 e 3 a 30% e a 100% do tampão de eluição. Os picos 2 e 3 apresentaram a presença da proteína HsImp α com alguns contaminantes (Figura 5b).

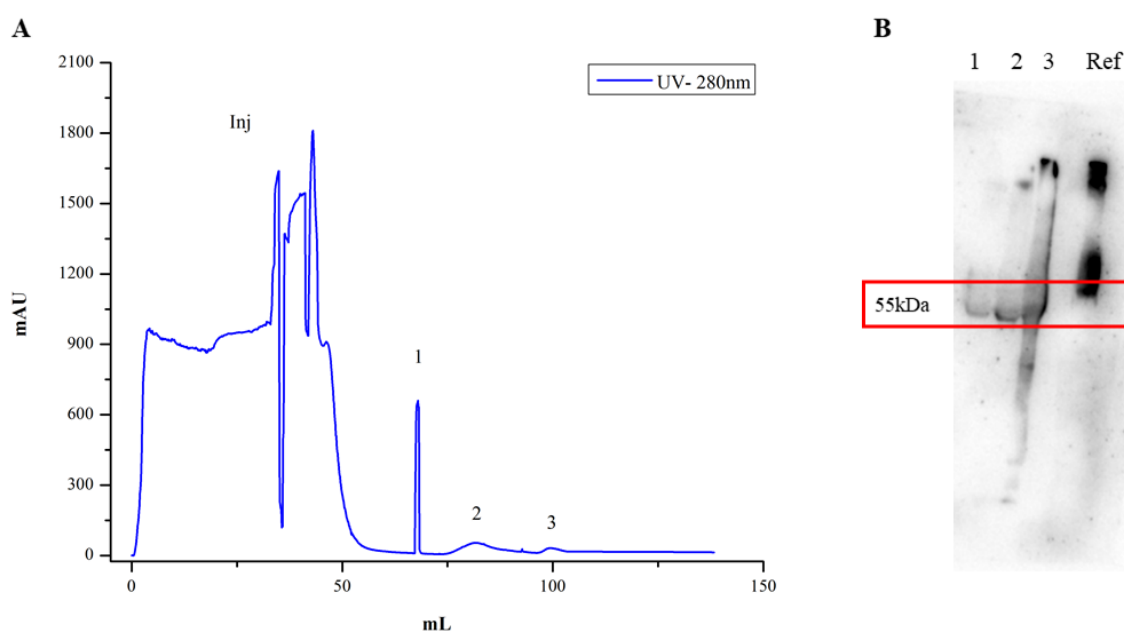


Figura 5- A) Cromatograma referente a purificação por afinidade utilizando tampão de 300mM de imidazol. Neste cromatograma observa-se a injeção da amostra (Inj) e os picos de proteína obtidos durante a lavagem (1), 30% e 100% do tampão de eluição; B) Os picos foram analisados por *western blotting*, em que 1,2,3, mostram a presença da proteína HsImp α , porém com a presença de outras proteínas com maiores e menores massas moleculares. A referência (ref) usada foi a proteína importina- α de *Mus musculus*, que apresenta massa semelhante a HsImp α .

Os contaminantes apresentavam massas moleculares diferentes da HsImp α , portanto, optou-se pela realização da cromatografia de exclusão molecular (Figura 6). Os picos desta cromatografia foram quantificados através do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) e constatou-se que estes se encontravam em baixa concentração, cerca de 0,0021 mg/mL em média, indicando que se perdeu uma grande massa de proteína.

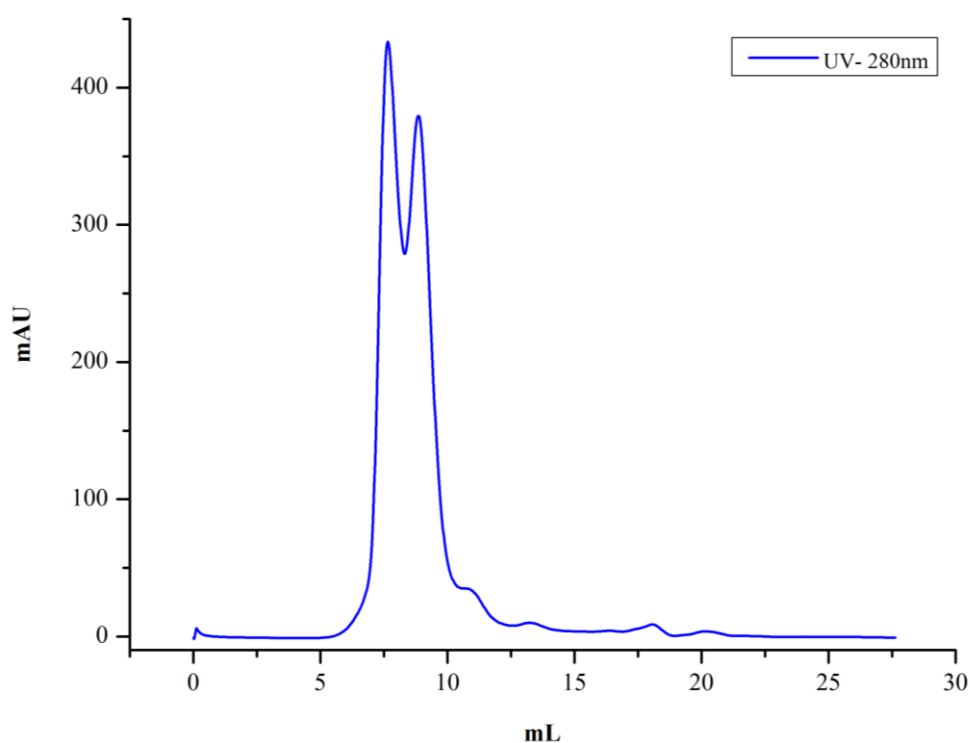


Figura 6- Cromatograma referente cromatografia líquida por exclusão molecular realizado com a HsImpα utilizando a coluna Superdex 75.

Com o intuito de melhorar a pureza da amostra, sem grandes perdas de massa de proteína, foi realizada uma nova expressão e, para a cromatografia, optou-se pelo tampão contendo 150 mM de imidazol (Figura 7a). Esta purificação apresentou uma melhora na pureza da amostra, como mostrado no pico 5 da Figura 7b, possibilitando a concentração da amostra em 14 mg/mL, para ser utilizada nos experimentos posteriores.

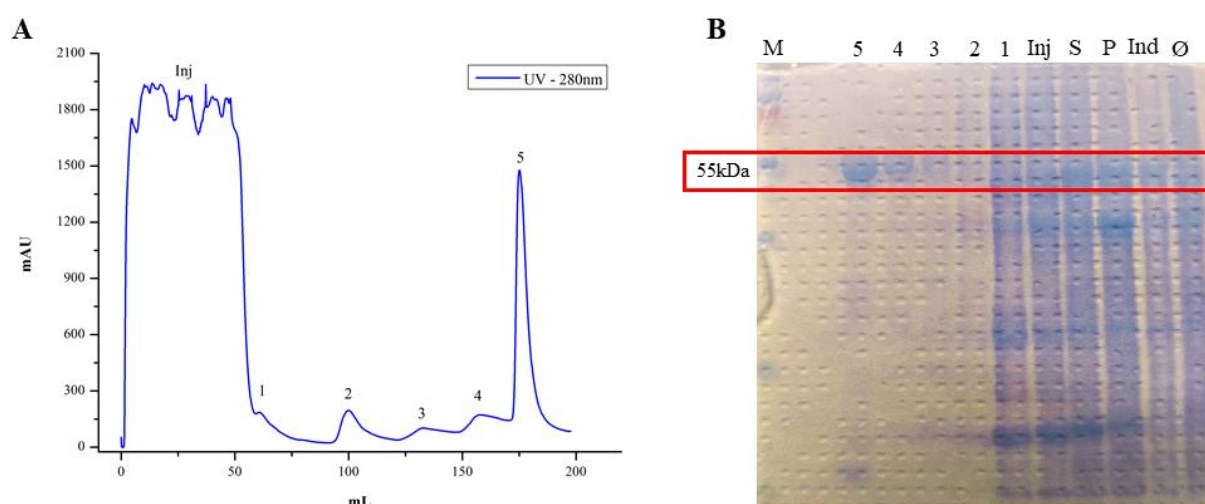


Figura 7 – A) Cromatograma referente a purificação por afinidade utilizando tampão de 150mM de imidazol. Neste cromatograma observa-se a injeção da amostra (Inj) e os picos de proteínas obtidos: 1- lavagem, 2, 3, 4, 5- 5%, 10%, 25%, 30% e 100% de tampão de eluição, respectivamente. B) Gel de Eletroforese 12% contendo as etapas de expressão e purificação: Ø – Não induzido; Ind – Induzido; P- Pellet; S – Solúvel; Inj – Injeção; 1, 2, 3, 4 e 5-Picos referentes ao cromatograma em A); M- Marcador.

A variante $\alpha 2$ da MmImp α foi expressada e purificada com protocolos já caracterizados previamente (Christie et al., 2016b; De Barros et al., 2012; Fontes, Teh, Jans, et al., 2003; Teh et al., 1999), sendo concentrada à 2 mg/mL.

4.3 Dicroísmo Circular (CD) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Devido ao fato da variante $\alpha 1$ da HsImp α ser uma proteína nova a ser trabalhada por nosso grupo de pesquisa, algumas características quanto a sua estrutura deveriam ser verificadas, como o enovelamento e sua polidispersão.

Para verificar o enovelamento das proteínas HsImp α e MmImp α , foi empregada a técnica de dicroísmo circular, no qual a amostra foi analisada sob aquecimento gradual. Os espectros de dicroísmo circular (Figura 8A e 8C) de ambas as proteínas exibiram picos característicos de moléculas ricas em hélices- α (picos em 208 e 222 nm). As curvas de desnaturação (Figura 8B e 8D) de ambas proteínas foram realizadas de 10 à 90 °C (de 5 em 5 °C), em que se observa um decaimento mais suave da MmImp α em relação a HsImp α .

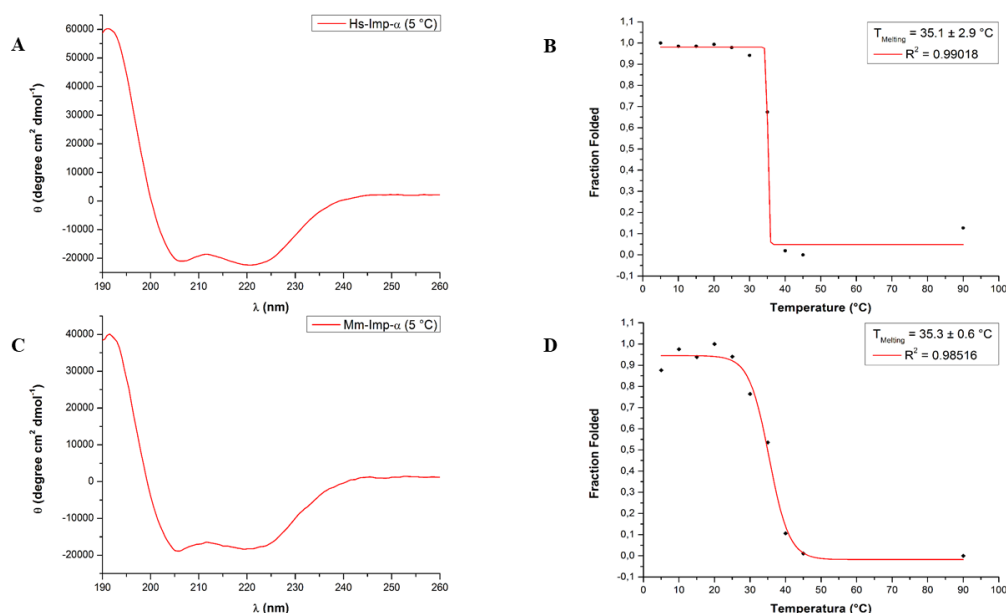


Figura 8 -A) Espectro de dicroísmo circular da HsImpα. B) Curva de desnaturação da HsImpα obtida a partir da técnica de CD, quando analisada nos comprimentos de onda de 190 a 260nm, nas temperaturas de 10 a 90 °C. C) Espectro de dicroísmo circular da MmImpα. D) Curva de desnaturação da MmImpα obtida a partir da técnica de CD, quando analisada nos comprimentos de onda de 190 a 260nm, nas temperaturas de 10 a 90 °C.

O uso do programa K2D (Andrade et al., 1993) para a avaliação dos espectros, mostrou que a estrutura da HsImpα é composta, majoritariamente, de hélices-α (Tabela 4), como a MmImpα e já caracterizado em outras Impα (Natalia E. Bernardes et al., 2015; Conti et al., 1998; Kobe, 1999). A medida de qualidade dos ajustes utilizado foi o desvio médio quadrático normalizado (NRMSD - *Normalized Root Mean Square Deviation*), que varia de 0 (ajuste perfeito) a 1 (ajuste totalmente imperfeito) (Miles, 2005)

Tabela 4 – Resultados da técnica de Dicroísmo Circular para a HsImpα

Estrutura	HsImpα	MmImpα
Hélices α	69%	51%
Folhas β	4%	10%
“Aleatório”	27%	38%
NRMSD*	0.216	0.220

*Normalized Root Mean Square Deviation – Desvio Quadrático Médio Normalizado

A técnica de DLS foi empregada para a obtenção de características de agregação (polidispersidade) e raio hidrodinâmico (R_h) da HsImpα. Partindo do pressuposto de que a molécula é globular e monomérica, como a Ovoalbumina (44 kDa e $R_h \sim 2.98$ nm) ou a Conalbumina (75 kDa e $R_h \sim 3.72$ nm) (Stetefeld et al., 2016), os resultados presentes na Tabela

4 apontam que a proteína se oligomeriza com o aumento da temperatura, pois há aumento de seu R_h , podendo apontar que há uma mistura de monômeros e dímeros na amostra analisada, sendo que à 5 °C há, majoritariamente, monômeros, devido ao seu menor R_h .

Tabela 5 - Resultado do espalhamento de luz dinâmico da HsImp α

Temperatura	R_h	Polidispersividade
5°C	3,3 nm	10,9%
10°C	4,4 nm	13,5%
20°C	4,5 nm	16,4%
25°C	4,6 nm	10,4%

R_h -Raio hidrodinâmico

Utilizando a mesma amostra, foi possível repetir as medidas, permitindo a validação dos valores iniciais, indicando que há alta estabilidade da estrutura terciária com a variação térmica.

Para a comparação com outra Imp α , a MmImp α foi submetida à rampa de temperatura, também de 5 °C a 25 °C. Após o processamento, foi possível constatar que o comportamento da MmImp α é similar ao da HsImp α .

Tabela 6 - Resultados do espalhamento de luz dinâmico da MmImp α

Temperatura	R_h	Polidispersividade
5 °C	3,9 nm	17,4%
10 °C	4,0 nm	7,9%
20 °C	2,7 nm	12,5%
25 °C	4,8 nm	11,0%

R_h – Raio hidrodinâmico

Como não houve a possibilidade de repetição das medidas com a mesma amostra, devido à baixa produção da proteína, acredita-se que houve um erro do equipamento ao analisar o R_h à 20 °C, uma vez que o tamanho do R_h sofre brusca diminuição de 10 °C para 20 °C. No entanto, a análise com uma nova amostra, não possibilitou medidas à 5 °C e 10 °C devido à falhas no equipamento, apenas os resultados nas temperaturas de 20 °C e 25 °C (Tabela 7). De

qualquer maneira, podemos confirmar R_h da mesma ordem de grandeza das medidas à 10 e 25 °C com os dados obtidos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 7 - Resultados do espalhamento de luz dinâmico da MmImp α com uma nova amostra

Temperatura	R_h	Polidispersividade
20 °C	3,7 nm	12,4%
25 °C	3,9 nm	4,2%

R_h – Raio hidrodinâmico

Além das medidas realizadas com as proteínas isoladas, também foram feitas medidas com os complexos HsImp α /SV40-NLS (Tabela 8) e MmImp α /SV40-NLS (Tabela 9), pois estudos indicaram que a Imp α quando complexada com peptídeos NLSs sua estrutura se estabiliza (Miyatake et al., 2015; Takeda et al., 2013).

Tabela 8- Resultado espalhamento de luz dinâmico HsImp α /SV40-NLS

Temperatura	R_h	Polidispersividade
5 °C	3 nm	11,8%
10 °C	3,4 nm	13,6%
20 °C	4,3 nm	11,7%
25 °C	4,6 nm	11,5%

R_h – Raio hidrodinâmico

Tabela 9 - Resultados espalhamento de luz dinâmico MmImp α /SV40-NLS

Temperatura	R_h	Polidispersividade
5 °C	2 nm	10,3%
10 °C	3,9 nm	9,1%
20 °C	3,9 nm	16,5%
25 °C	3,8 nm	9,5%

R_h – Raio hidrodinâmico

Entretanto, observa-se que os resultados obtidos para as Imp α são da mesma ordem de grandeza, sendo difícil obter uma conclusão definitiva. Nota-se, porém, que no caso da HsImp α

nativa e complexada com SV40-NLS há um aumento do R_h , principalmente em temperaturas mais elevadas, indicando uma possível tendência a oligomerização da amostra.

4.4 Espectroscopia de Fluorescência (FS)

A espectroscopia de fluorescência foi empregada para a análise da estrutura terciária bem como a possibilidade de mudança conformacional quando há a formação dos complexos com peptídeos NLSs.

Em um primeiro momento, foi realizada a análise de mudanças na conformação da estrutura da proteína HsImp α isolada (Figura 9), nas temperaturas de 5 a 25 °C. Os espectros obtidos possibilitam a percepção de mudanças na exposição dos triptofanos ao solvente, visto que a intensidade de fluorescência possui uma correlação inversa com a temperatura. Desta forma, quando comparadas as temperaturas, nota-se que a 5 °C há uma diferença estatística maior em relação as demais temperaturas ($p\text{-value} < 2,2e^{-16}$), indicando a possibilidade de existir mais monômeros do que dímeros nessa temperatura.

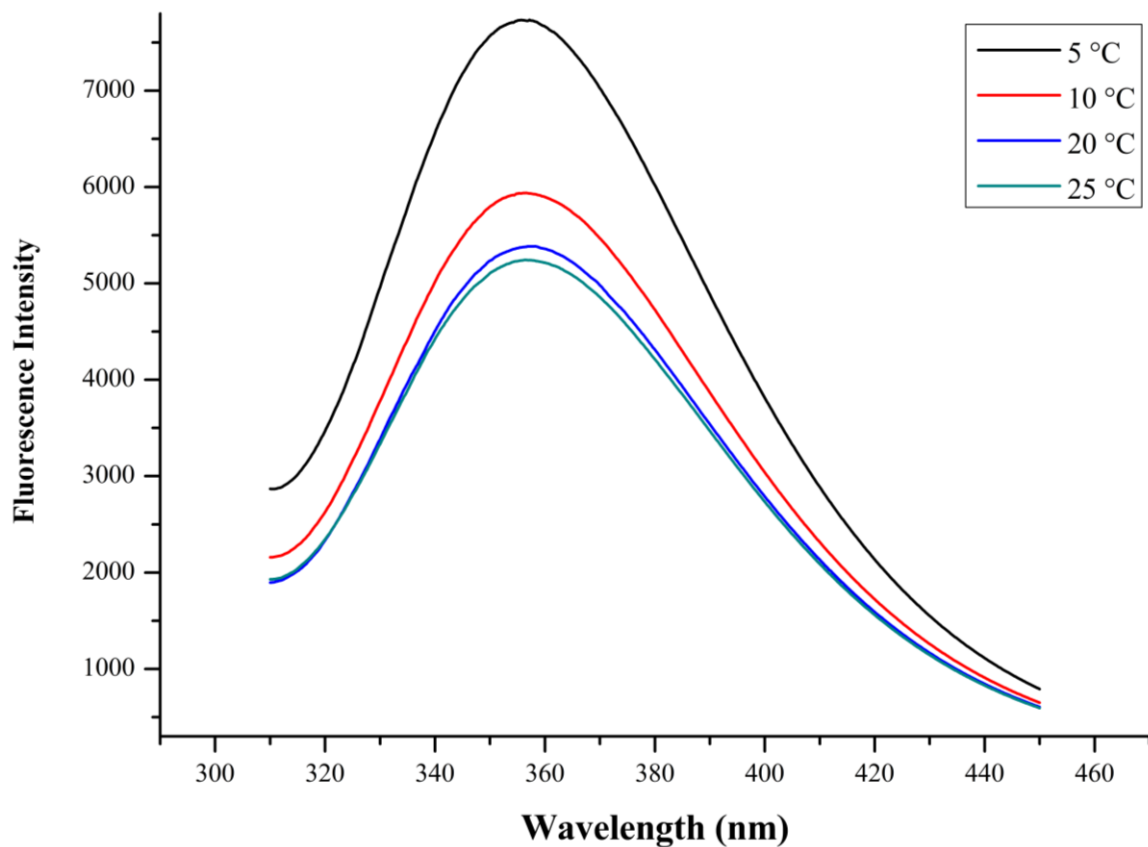


Figura 9 – Espectroscopia de Fluorescência realizada com a HsImp α isolada em rampa de temperatura de 5 a 25 °C.

Visando analisar melhor as mudanças estruturais ocorridas, a mesma análise foi realizada com a formação do complexo da HsImp α com o peptídeo SV40-NLS (Figura 10). Diferente do comportamento da proteína isolada, a interação do complexo HsImp α /SV40-NLS apresenta pouca variação na exposição dos triptofanos ao solvente quando comparada as temperaturas.

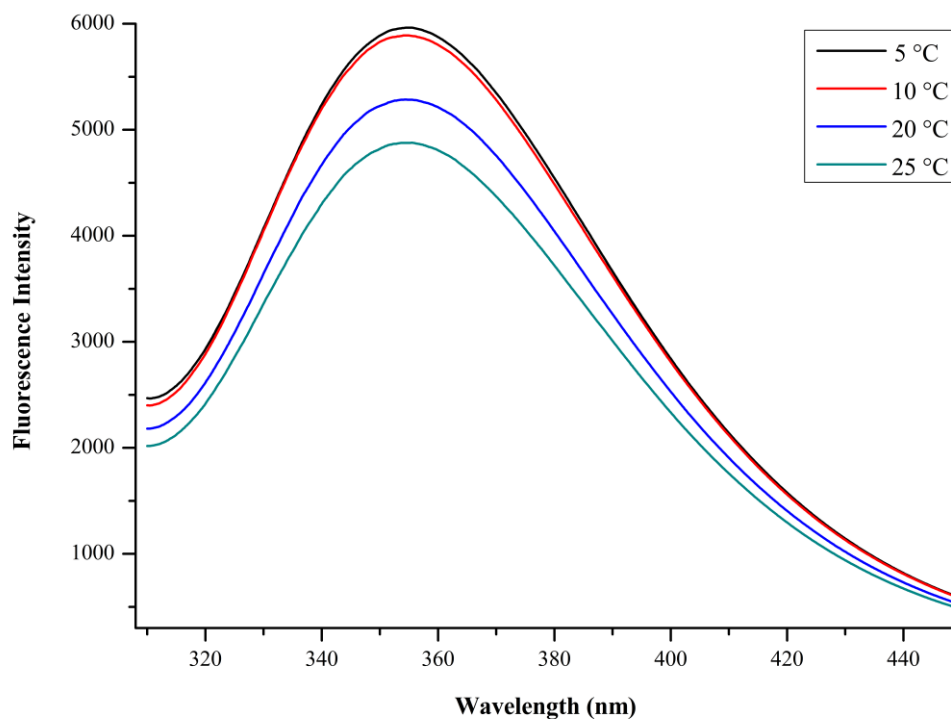


Figura 10 -Espectroscopia de Fluorescência realizada com a interação da HsImp α com o peptídeo SV40-NLS, também realizada em rampa de temperatura de 5 °C a 25 °C.

Ao se comparar as mudanças na estrutura da proteína isolada e com a interação com a SV40-NLS, nota-se que a 5 °C (Figura 11a), os triptofanos estão mais expostos ao solvente quando a proteína está isolada em relação ao complexo com a SV40-NLS ($p\text{-value}=2.2e^{-16}$). Este comportamento não é visível nas demais temperaturas, devido a intensidade de fluorescência apresentar pouca diferença, podendo indicar que os sítios estão ocupados em ambos os casos: com a (suposta) formação do homodímero ou com a interação com a SV40-NLS (Figura 11).

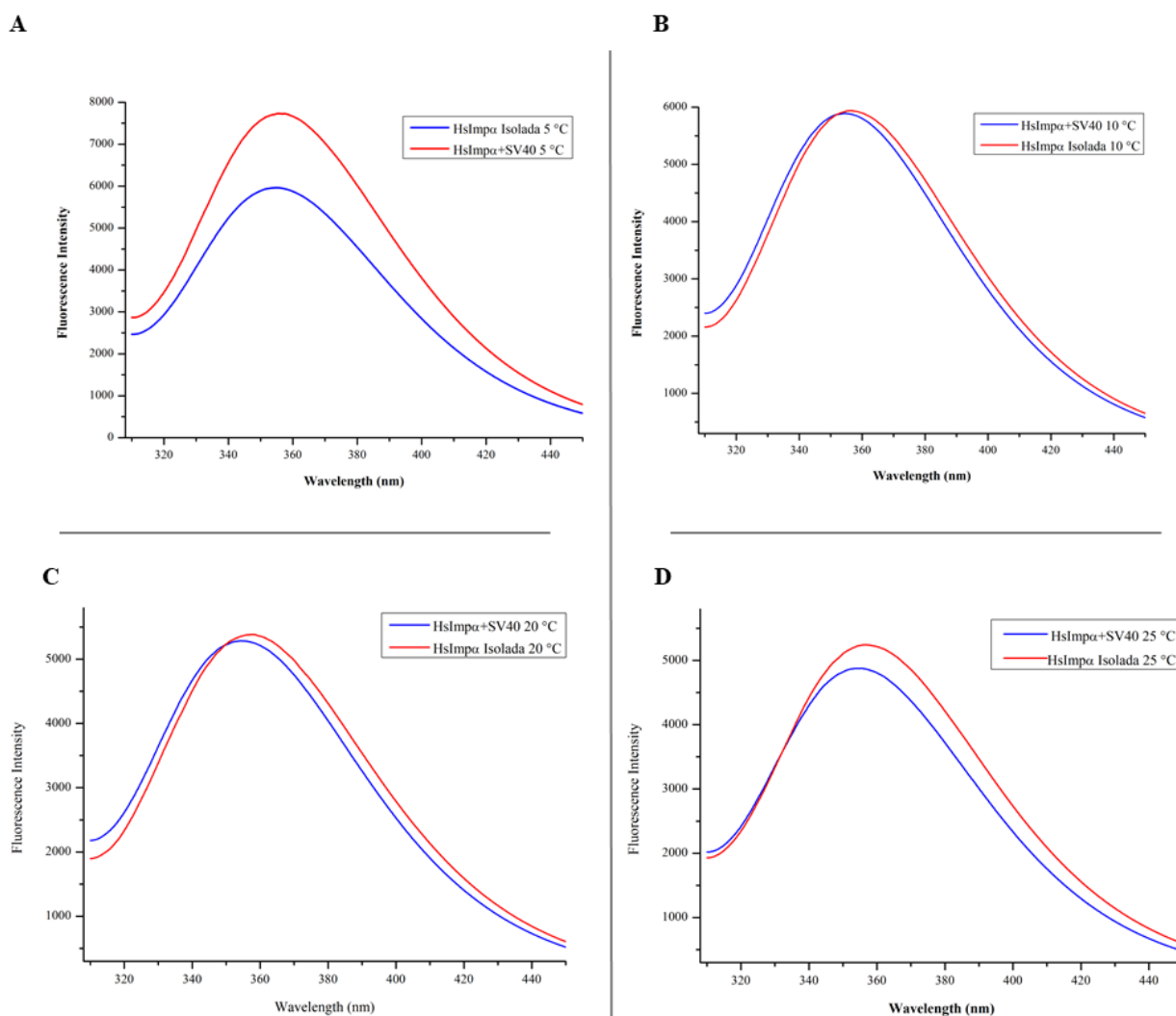


Figura 11 – Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /SV40-NLS em rampa de temperatura. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.

Com a suposição de que houve a ligação do complexo a 5 °C e permaneceu ligado com o aumento da temperatura, imaginava-se que este comportamento poderia estar ocorrendo devido à HsImp α sofrer alteração em sua estrutura quando submetida ao aumento da temperatura, como já observado com o DLS do complexo (Tabela 8) e, portanto, foi realizada a análise submetendo diferentes amostras às temperaturas de 5, 10, 20 e 25 °C (Figura 12 - Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /SV40-NLS, quando analisadas separadamente. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C; As medidas foram realizadas titulando-se o peptídeo na proteína, portanto foi necessário a normalização da intensidade de fluorescência para não ocorrer erros de concentração entre a proteína isolada e complexada

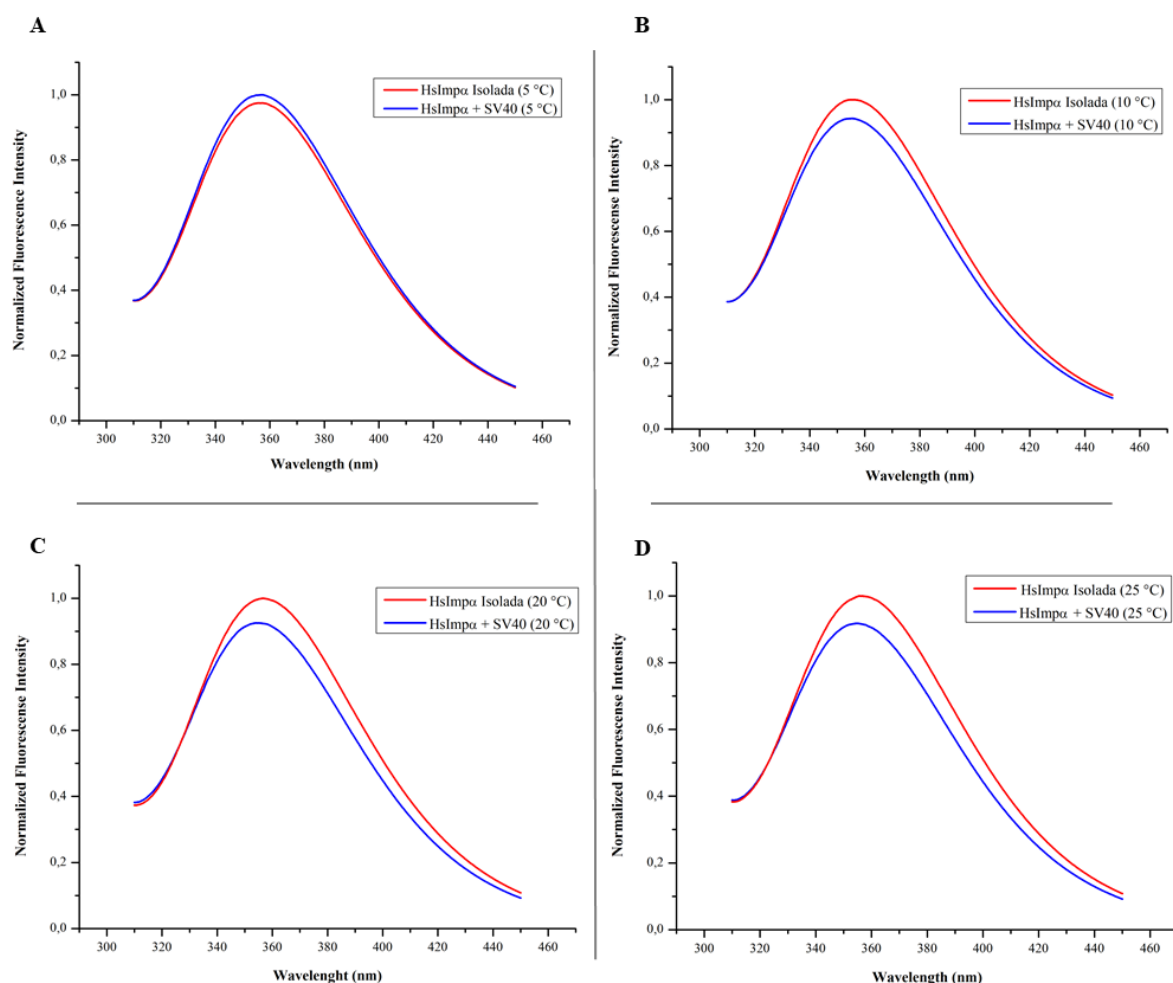


Figura 12 - Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImp α /SV40-NLS, quando analisadas separadamente. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.

Assim, a análise dos espectros da Figura 12 sugerem que a HsImp α possui baixa afinidade à SV40-NLS, pois não há diferença estatística entre as intensidades de fluorescência emitida em nenhuma temperatura. Sabe-se que há interação devido ao deslocamento do pico para a esquerda, indicando uma mudança quanto a hidrofobicidade dos triptofanos.

As mesmas análises comparativas foram realizadas com a proteína isolada e complexada com o peptídeo XPG1-NLS (Figura 13). Diferente da SV40-NLS, a XPG1-NLS apresentou grandes diferenças estatísticas da interação com a HsImp α , indicando que há uma maior afinidade entre estas duas proteínas.

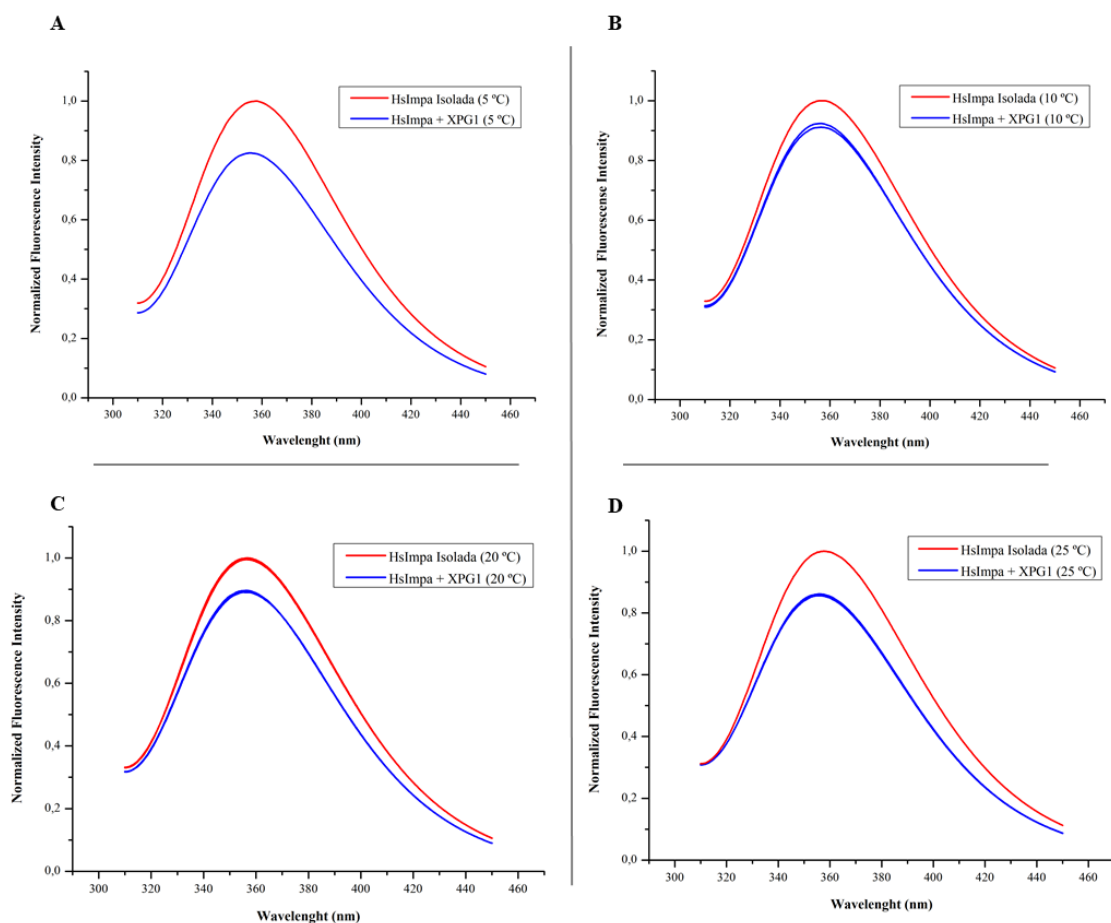


Figura 13 - Comparação entre os espectros de fluorescência da proteína isolada e HsImpα/XPG1-NLS. A) Medidas realizadas a 5 °C; B) Medidas realizadas a 10 °C; C) Medidas realizadas a 20 °C; D) Medidas realizadas a 25 °C.

Nas temperaturas analisadas, a intensidade de fluorescência da HsImpα isolada é maior do que quando há a interação com XPG1-NLS, indicando que os triptofanos estão mais voltados ao solvente, ou seja, os sítios de interação estão aptos a se ligar ao peptídeo NLS.

Nas condições descritas acima, sem o emprego da rampa de temperatura, fica bastante evidente que a oligomerização da proteína só ocorre quando submetida à elevação da temperatura, visto que não há diferença na intensidade de fluorescência (Figura 14) tanto com a proteína isolada quanto com a formação dos complexos com os peptídeos NLSs XPG1 e SV40.

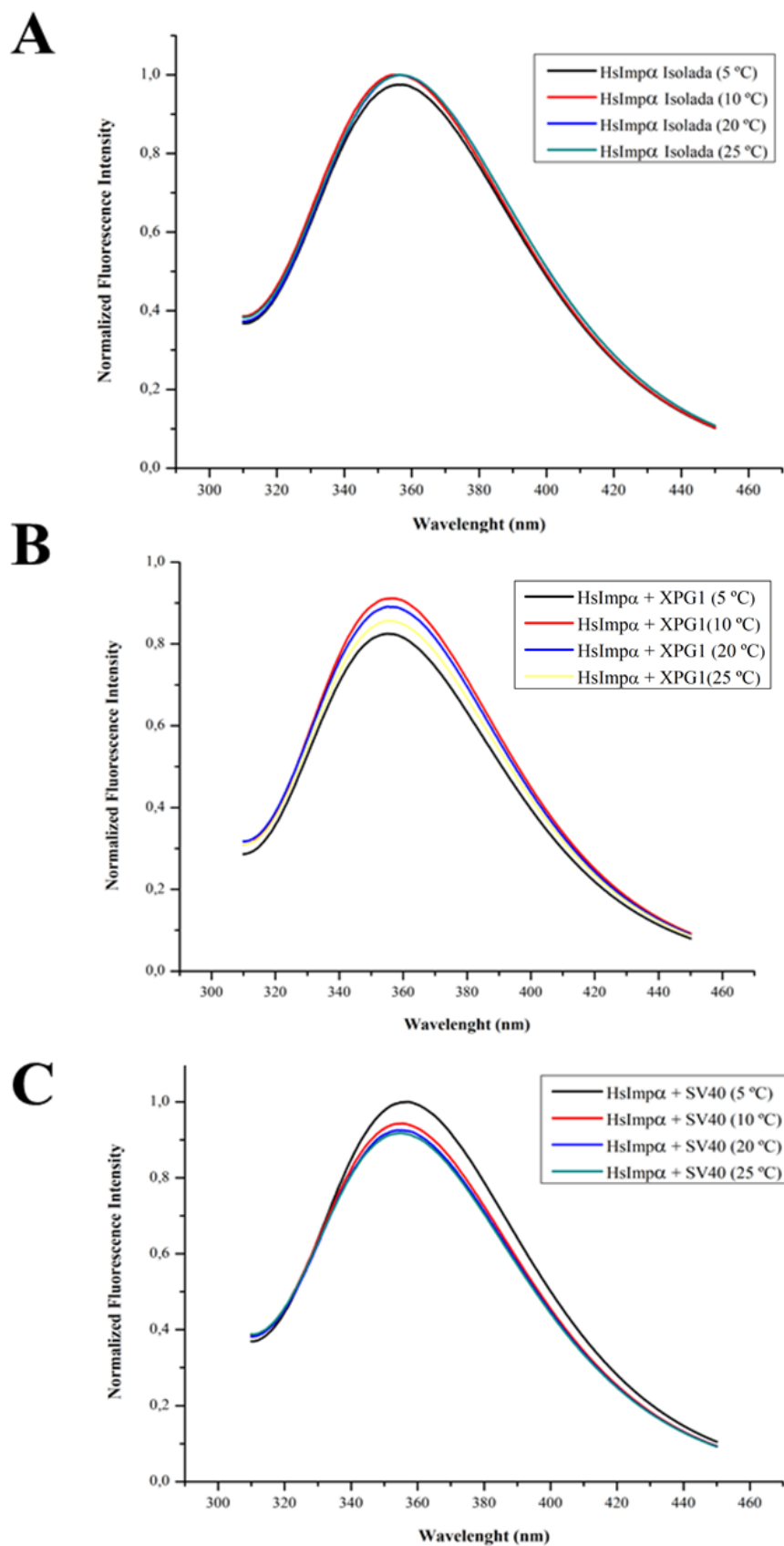


Figura 14- Comparação dos espectros obtidos pela Espectroscopia de Fluorescência. A) HsImpα Isolada; B) HsImpα/XPG1-NLS; C) HsImpα/SV40-NLS

4.5 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)

Os dados calorimétricos dos complexos formados entre a HsImp α e os peptídeos NLS SV40, XPG1 e PAC-3 foram obtidos por meio da técnica de ITC. Com base nos termogramas obtidos, extraiu-se os valores da estequiometria (n), da entalpia (ΔH), da entropia (ΔS) e da constante de dissociação (K_d), dispostos na (Tabela 10).

Tabela 10- Dados Calorimétricos dos complexos HsImp α /SV40-NLS e HsImp α / XPG1-NLS

Complexo	n	K_d (μM)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)
HsImp α /SV40-NLS	0,942	93,46 $\pm$ 75,73	-32,14 $\pm$ 46,82	-91,2
HsImp α /SV40-NLS	0,94*	95,23 $\pm$ 8,16	-32,26 $\pm$ 1,89	-92,9
HsImp α /XPG1-NLS	1,29 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,20	-8,67 $\pm$ 1,85	-2,37

Estequiometria (n); entalpia (ΔH); entropia (ΔS); constante de dissociação (K_d)

*Valor fixado

Para o complexo HsImp α /SV40-NLS utilizou-se a mesma proporção de proteína: peptídeo (1:8) encontrado em experimentos previamente realizados com a MmImp α em nosso laboratório (Barros et al., 2018). Durante a análise dos termogramas (Figura 15A), para que houvesse menores parâmetros livres e um menor erro associado a estes, o valor n = 0,94 (valor próximo ao real obtido n = 0,945) foi fixado e com isso, pode-se observar, que a afinidade do complexo é bastante baixa, assim como já mostrava a espectroscopia de fluorescência (Figura 12).

Assim como o complexo HsImp α /SV40-NLS, para complexo HsImp α /XPG1-NLS foi utilizada a mesma proporção (1:8) encontrado em experimentos previamente realizados com a MmImp α (Barros et al., 2016). Os termogramas obtidos (Figura 15B) permitiram a extração dos parâmetros calorimétricos, sendo que a estequiometria, n = 1,29, indica que há a ligação de uma molécula de peptídeo para uma de proteína, ou seja, por ser um peptídeo bipartido, possivelmente está havendo interação nos dois sítios de maneira simultânea. Entretanto, são necessários resultados estruturais como a elucidação da estrutura do complexo para a confirmação desta hipótese.

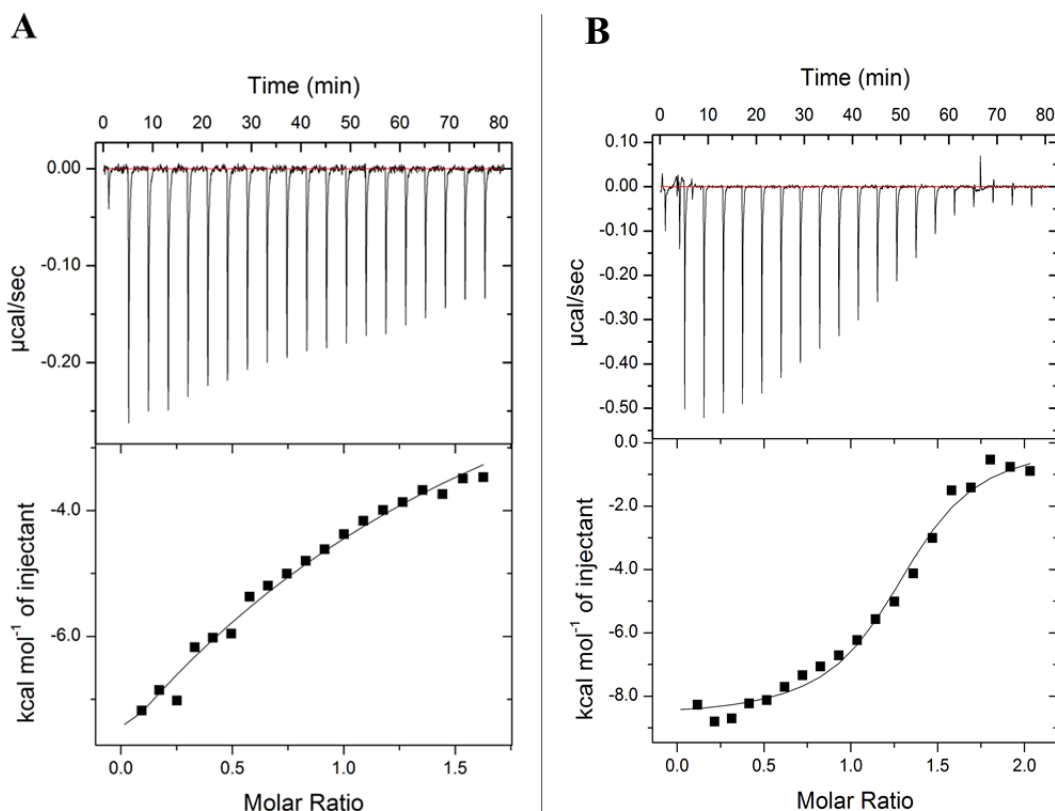


Figura 15 - Termogramas referentes aos complexos A) HsImp α /SV40-NLS e B) HsImp α /XPG1-NLS, realizados a 20 °C.

Diversos estudos utilizam a Imp α de um organismo para a análise da interação com peptídeo de outro organismo (Natalia E Bernardes et al., 2014; Natália E Bernardes et al., 2020a; Cortes et al., 1994; Kobe, 1999; Takeda et al., 2013). Dessa forma, a mesma análise foi proposta para a HsImp α com o peptídeo NLS do fator de transcrição PAC-3 do fungo *Neurospora crassa*, sendo a interação do complexo analisada pelo ITC. Em um primeiro experimento, acreditava-se que o peptídeo tivesse uma alta afinidade com a proteína (Tabela 11), entretanto, não houve medidas reprodutíveis, impossibilitando a precisão da análise da interação. Foram efetuadas mudanças nos parâmetros do experimento (temperatura, rotação e concentração) para que, talvez, fosse possível a reprodução deste, porém, a cada novo termograma eram obtidas diferentes constantes calorimétricas, e apesar de favoráveis à ligação, eram diferentes (Figura 16)

Tabela 11 - Dados Calorimétricos do complexo HsImp α / PAC-3 realizado a 20 °C

Complexo	n	K _d (µM)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)
HsImp α /PAC-3-NLS	0,593	0.54 $\pm$ 0,08	-18,27 $\pm$ 0,35	-33,7

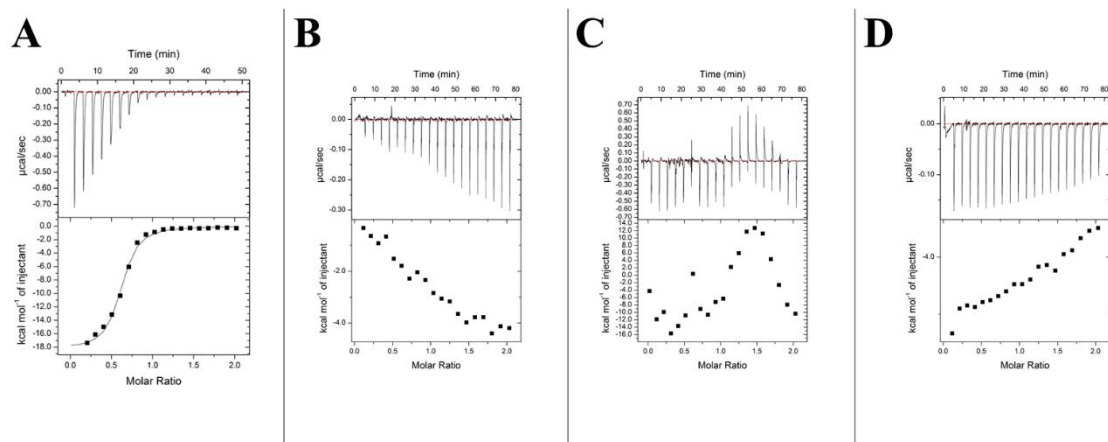


Figura 16 - Termogramas referentes ao complexo HsImpα/PAC-3-NLS A) e B) realizados com a PAC-3-NLS à 300 μM, C) e D) 600 μM.

4.6 Cristalização de Proteínas

De maneira a aprofundar os conhecimentos na possível interação entre os complexos HsImpα/SV40-NLS e HsImpα/PAC-3-NLS, foram feitos experimentos de cristalização com os mesmos, entretanto, não foram observados cristais nas condições utilizadas. Já para o complexo HsImpα/XPG1 e a HsImpα isolada (Figura 17), resultaram em alguns cristais, porém não muito viáveis para serem coletados e submetidos à difração de raios X, impossibilitando a elucidação das estruturas.

Os cristais da proteína isolada, foram obtidos com as condições de cristalização do kit JCSG HT-96 (Molecular Dimension) que continham 20% PEG 6000 e 100mM de Bicina (Figura 17A) e, 20% PEG3350 e 200 mM formato de amônio (Figura 17B). E os cristais do complexo HsImpα/XPG1-NLS foram obtidos com as soluções de cristalização 22% PEG 6000 e 100 mM Citrato de Sódio pH 5,5 (Figura 17C) e, 20% PEG 600 e 100 mM Citrato de sódio pH5,5 (Figura 17D).

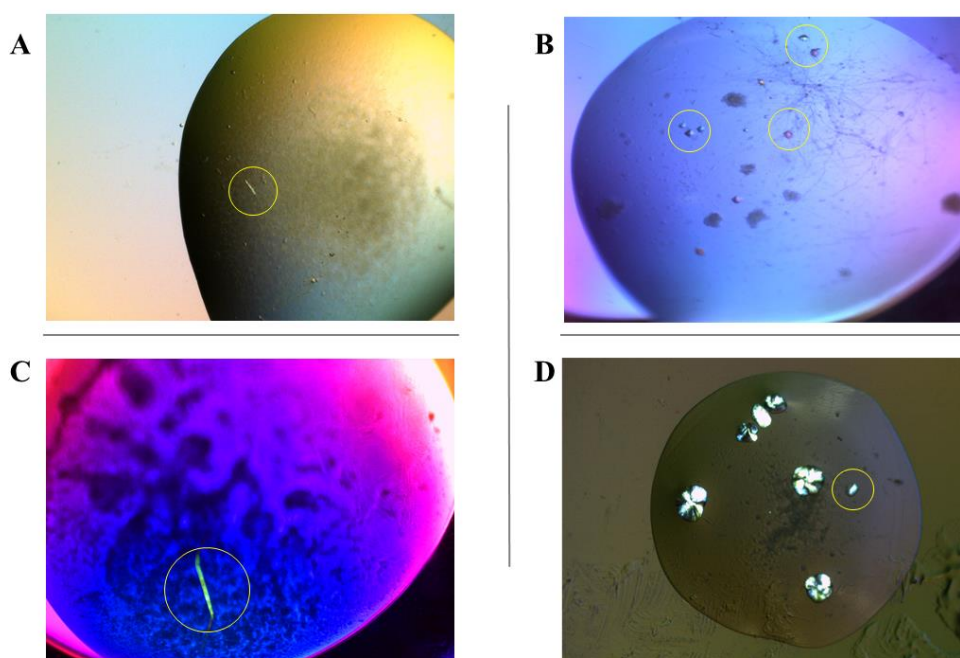


Figura 17 - Cristais obtidos pelas técnicas sitting-drop da HsImp α isolada (A e B) e hanging drop do complexo HsImp/XPG1-NLS (C e D)

5. DISCUSSÃO

5.1 A Produção da Importina- α de *Homo sapiens*

A isoforma $\alpha 1$ da HsImp α já foi expressa e purificada em dois grupos de pesquisa (Boivin & Hart, 2011; Dias et al., 2010), porém, neste trabalho, empregou-se diferentes metodologias para a expressão e purificação. Após a transformação bacteriana, foram realizados os testes de indução, no qual, para ambas as linhagens, a melhor concentração foi a de 100 mM durante quatro horas, devido ao gel de eletroforese apresentar bandas mais marcantes para esses parâmetros.

Há protocolos para a purificação da HsImp α já caracterizados que utilizam gradiente salino contendo 500 mM de Imidazol (Boivin & Hart, 2011; Dias et al., 2010). Estes protocolos foram testados, porém a amostra da HsImp α apresentou bastante precipitação durante a eluição, estando a amostra turva e com “flocos”, que mesmo após a filtração com filtro de 0,22 μm , continuaram presentes.

Desta maneira, para melhorar a solubilidade e estabilidade da proteína, foram escolhidos tampões de lavagem e eluição com menor concentração salina. Como pôde ser analisado, na Figura 5, o pico 1, apresentou indícios de que a proteína estava saindo em baixas concentrações salinas e os picos 2 e 3 apresentaram impurezas, possivelmente resíduos da expressão, que

possuíam diferentes tamanhos moleculares, mostrando que a quantidade de sal para a eluição era alta. Contudo, o emprego da cromatografia de exclusão molecular, não se apresentou satisfatória, pois não houve separação das moléculas, com a presença de picos superpostos no cromatograma (Figura 6), e a quantidade de proteínas totais presente, em cada pico, era baixa. Este fato não possibilitou a verificação da presença da proteína nas amostras dos picos pela técnica de SDS-PAGE 12%.

Devido ao fato de a proteína ser obtida em condições salinas com concentrações baixas, similarmente com o protocolo para purificação da MmImp α , (a HsImp α possui 99,2% de similaridade com a MmImp α) e já utilizado por diversos grupos de pesquisa (Natália et al., 2017; Kobe, 1999; Marfori et al., 2012; Matsuura & Stewart, 2004; Trazel et al., 1999) este foi escolhido. Nesta etapa, a proteína se mostrou mais estável, sem apresentar precipitações, e com maior grau de pureza, o que permitiu a análise de sua estrutura.

5.2 Análise da estrutura da HsImp α mostra que ela possui características similares à outras Imp α

Para a análise da estrutura secundária da HsImp α , foi empregada a técnica de Dicroísmo Circular, na qual, comparativamente a curva de desnaturação da MmImp α , a HsImp α apresentou melhor estabilidade estrutural até os 30 °C, e, após, observa-se que há o desenovelamento aparentemente brusco, visto que a curva da Figura 8B não é tão suave quanto ao da Figura 8D. O processamento do espectro de CD indica que a HsImp α apresenta, predominantemente, hélices-alfa, assim como já caracterizado em outras Imp α , como a MmImp α (Tabela 6) (Kobe, 1999) e NcImp α (Takeda et al., 2013) e ScImp α (Conti et al., 1998).

Como a proteína estava devidamente enovelada, o emprego da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico permitiu o estudo do estado oligomérico da proteína, a partir do cálculo do raio hidrodinâmico (R_h – raio hidrodinâmico de uma esfera hipotética) em diferentes temperaturas, no qual é considerado uma molécula globular, como a Ovoalbumina (44 kDa e $R_h \sim 2,98$ nm) (Stetefeld et al., 2016).

A ScImp α truncada foi descrita como um homodímero, devido à ausência do domínio auto inibitório ou de NLSs, realizando as interações do homodímero pela região dos dois sítios de ligação (Conti et al., 1998) particularmente pelas regiões do quinto e sexto motivos *armadillos*, em que a presença dos resíduos Tyr283 e Arg321, interrompem a ligação

asparagina-triptofano, que auxiliam a ligação das NLS aos sítios de ligação. Nestas regiões a MmImp α e a HsImp α possui uma Fenilalanina na posição correspondente à Tyr283 e uma lisina correspondente à Arg321, o que pode influenciar na ausência da ligação homodimérica nas estruturas já obtidas destas proteínas (Teh et al., 1999; Trowitzsch et al., 2015). A baixa estabilidade das Imp α N-terminalmente truncadas, quando não complexadas com NLSs também já foi descrita em outros organismos, como a NcImp α (Takeda et al., 2013) e até mesmo com a HsImp α , sendo sugerido que a ligação dimérica funcione como o sítio auto inibitório, não permitindo a ligação de outras moléculas (Miyatake et al., 2015). Assim, a instabilidade das Imp α truncadas estaria, possivelmente, ligada à ausência do domínio IBB, pois, *in vivo*, a ligação de outras proteínas só é possível quando à Imp β afasta-o, deixando os sítios de ligação da Imp α “livres” para ligação com outras proteínas. Baseando-se nestas evidências e que o aumento gradual da temperatura desestabiliza a estrutura, como observado no CD (Figura 8), a tendência da Imp α truncada seria se estabilizar, possivelmente com a ligação com outras moléculas ou com ela mesma.

Visto que o raio hidrodinâmico das partículas é diretamente proporcional a temperatura, segundo a lei de Stokes-Einstein para a difusão de partículas¹, pequenas variações são esperadas. Porém, as variações no raio da HsImp α e MmImp α , quando submetidas a rampa de temperatura são significativas, visto que há o aumento de, aproximadamente, 1 nm, o que pode ser um indicativo de oligomerização, pelo menos parcial das amostras de Imp α .

Dessa maneira, o aumento do R_h observado no DLS das proteínas HsImp α (Tabela 5) e MmImp α (Tabela 6) pode sinalizar que ocorre a associação entre dois monômeros das proteínas, formando homodímeros. A suposição de oligomerização da Imp α pela análise por DLS está em concordância com dados obtidos com estudos com a NcImp α , que apresentou o valor do raio hidrodinâmico de 4,1 nm (Takeda et al., 2013), bem como na comparação com os dados de DLS da MmImp α (Tabela 6), que é muito bem caracterizada em termos estruturais, apesar da ausência de maiores informações do R_h à 20 °C.

Ainda que todas as análises feitas por meio do espalhamento de luz dinâmico apontem para a oligomerização da proteína, a Imp α não é uma molécula globular, ou seja, a estimativa

¹ Relação de Stoke-Einstein para difusão de partículas: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$

de massa molecular não pode ser obtida diretamente a partir do R_h . Maiores evidências quanto à dimerização da amostra de Imp α , só seria possível quando vista em solução com a técnica de espalhamento de raios X à baixo ângulo (SAXS). Porém, não possuímos este equipamento em nosso laboratório e, devido a pandemia da COVID-19, a parceria com outros laboratórios se tornou inviável.

Resultados interessantes, no qual foi explorado o processo de oligomerização da proteína, foram obtidos com o emprego da espectroscopia de fluorescência, também em rampa de temperatura. Em razão da presença de triptofanos nas regiões dos sítios de ligação da Imp α com os NLSs, foi utilizado o comprimento de onda de excitação desses aminoácidos (295 nm), sendo que quanto maior a exposição dos triptofanos, maior a intensidade de fluorescência emitida. Assim, a diminuição da intensidade de fluorescência observada com o aumento da temperatura na Figura 9, indica a diminuição da exposição dos triptofanos ao solvente, isto é, houve ocupação dos sítios de ligação da proteína, uma vez que é bastante significativa a diferença na intensidade de fluorescência de 5 °C para as demais temperaturas.

Uma segunda medida foi realizada, sem o emprego da rampa de temperatura (Figura 14), medindo uma amostra da HsImp α para cada temperatura e, diferentemente do que se esperava, não houve oligomerização da amostra quando submetida às temperaturas mais elevadas (20 e 25 °C), indicando que a Imp α oligomeriza para estabilização da estrutura quando há aumento de temperatura.

5.3 Estudos da interação da HsImp α com peptídeos NLSs

A estrutura das Imp α tem formato alongado, não globular e contorcido, e experimentos de dinâmica molecular (Pumroy et al., 2014), demonstraram que não há mudanças na estrutura terciária relevantes. Por outro lado, alguns estudos indicam que regiões próximas aos sítios de interação podem apresentar diferentes níveis de flexibilidade, podendo aumentar ou diminuir a afinidade com NLSs. (Nardozzi et al., 2010; Pumroy et al., 2014; Tarendeau et al., 2007).

Considerando que há homodimerização da Imp α truncada, como visto pela técnica de DLS, acredita-se que a maleabilidade das regiões próximas aos sítios de ligação, permite que as NLSs acessem os sítios de ligação, desfazendo o dímero, dando estabilidade a proteínas, assim como já pressuposto para Imp α de outros organismos (Conti & Kuriyan, 2000; Takeda et al., 2013). Assim, foi levantada a hipótese de que, quando a Imp α fosse complexada a um NLS, seria possível ver diminuição em seu raio hidrodinâmico em relação à proteína isolada.

Entretanto, quando analisados os complexos HsImp α /SV40-NLS e MmImp α /SV40-NLS pela técnica de DLS, a variação do R_h foi próxima ao observado com a proteína isolada, indicando que a proteína pode ainda estar dimerizando, mesmo na presença da NLS complexada a ela.

Apesar dos dados com erros inerentes à técnica de DLS e a dificuldade de se estimar o estado oligomérico a partir do R_h de uma proteína não globular, como a Imp α , eles se encontram em concordância com a espectroscopia de fluorescência realizada com complexo HsImp α /SV40-NLS, visto que a variação do ambiente dos triptofanos não é significativa (Figura 11) quando há o aumento gradual da temperatura. Isto é, com a amostra majoritariamente monomérica (5 °C), como apontado pelo DLS, a HsImp α se liga ao peptídeo SV40-NLS, ocorrendo a queda na intensidade de fluorescência (Figura 11), devido à mudança de ambiente dos triptofanos próximos aos sítios de ligação, que fazem interações com os resíduos do peptídeo. Nas demais temperaturas observadas (10, 20 e 25 °C), a amostra, não apresenta queda significativa na intensidade de fluorescência, sugerindo que a ligação do complexo ocorre em 5 °C e permanece ligada nas demais temperaturas, uma vez que em relação à amostra da proteína não complexada também não se observa a variação da intensidade de fluorescência.

Outro fator interessante quanto ao complexo HsImp α /SV40-NLS está atrelado à baixa afinidade do complexo, sendo que, quando analisado os espectros da espectroscopia de fluorescência obtidos com as amostras medidas separadamente, não há variação significativa do ambiente dos triptofanos (Figura 10), porém, há um pequeno deslocamento do pico (que representa a máxima emissão) para a esquerda, indicando que houve pequena variação quanto a hidrofobicidade dos triptofanos da amostra.

A baixa afinidade do complexo HsImp α /SV40-NLS é evidenciada por meio da técnica de ITC, sendo o K_d alto. Com os parâmetros livres, observa-se um grande erro no K_d (Tabela 10), sendo o valor do erro muito próximo ao valor obtido. Diante disso a fixação da estequiometria foi necessária para melhorar a estimativa do erro e se obter melhores resultados para os parâmetros. Em comparação com outras importinas, como a MmImp α (Barros et al., 2018) a HsImp α tenderia a ter uma maior afinidade, visto que o vírus que contém a sequência NLS utilizada infecta humanos e macacos, entretanto, a MmImp α apresenta melhor afinidade, ligando-se aos dois sítios ($K_d \sim 1.8 \mu\text{M}$ e $23 \mu\text{M}$, nos sítios primário e secundário, respectivamente), apesar de baixa ao sítio secundário. No caso da HsImp α acredita-se que ela se ligue apenas a um sítio da proteína, dado que a análise dos dados de ITC mostra apenas

interação de uma molécula de peptídeo para uma de proteína. Uma melhor compreensão desta ligação poderia ocorrer com a elucidação da estrutura por meio da cristalização do complexo, mas não foi possível sua cristalização, bem como a obtenção de cristais viáveis dos demais complexos ou da proteína nativa, apesar de muitas tentativas.

Um estudo estrutural e calorimétrico realizado com a proteína do Xeroderma Pigmentoso tipo G (XPG) humano (Barros et al., 2016) testou duas possíveis regiões de NLS, bipartidas (XPG1 e XPG2) da porção C-terminal (importante para a atividade de reparo por excisão de nucleotídeos) da XPG. Este estudo foi realizado utilizando a MmImp α , entretanto a análise da interação entre proteínas de diferentes organismos pode acarretar em divergências quanto a especificidade entre elas (Pumroy et al., 2014; Pumroy & Cingolani, 2015). Assim, a análise da interação do complexo HsImp α /XPG1-NLS comparativamente a interação do complexo MmImp α /XPG1-NLS foi realizada com o intuito de observar as diferenças entre elas.

Supunha-se que, por serem do mesmo organismo, a afinidade do complexo HsImp α /XPG1-NLS seria maior que a observada no complexo MmImp α /XPG1-NLS, porém, após a análise da triplicata realizada com o complexo HsImp α /XPG1-NLS, ela é menor, porém da mesma ordem de grandeza do sítio primário da MmImp α ($0.45 \pm 0.05 \mu\text{M}$). A ligação com a MmImp α ocorre em ambos os sítios da proteína com a mesma sequência de aminoácidos, sendo a afinidade com o sítio secundário ($3.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$) muito menor do que com o primário ($0.45 \pm 0.05 \mu\text{M}$) (Barros et al., 2016). No caso da HsImp α não foi possível a análise do ITC como dois sítios independentes, pois o erro associado ao parâmetro era extremamente alto. Como a estequiometria é próxima de 1, acredita-se que haja a ligação de uma molécula de peptídeo para uma de HsImp α , como já visto em outros estudos (Bernardes et al., 2020). Porém não é possível saber ao certo, se ela se liga em ambos como um peptídeo bipartido, ou em apenas um sítio de forma monopartida, ligando uma única região NLS. Se for realmente confirmado que a XPG1 NLS se liga à HsImp α como uma sequência bipartida, o K_d obtido ($1,13 \pm 0,20 \mu\text{M}$) é compatível com os dados do complexo MmImp α /XPG1-NLS, no qual obteve-se um valor maior para o sítio principal e menor para o secundário. Nota-se pela literatura que geralmente NLSs bipartidos têm K_d s menores que NLS monopartidos de alta afinidade. Tais dúvidas seriam sanadas com a elucidação do complexo HsImp α /XPG1-NLS, em que seria possível observar os tipos de ligação que ocorrem entre os aminoácidos da proteína e do peptídeo, possibilitando o melhor entendimento de como se dá esta ligação, bem como uma melhor análise comparativa com o complexo MmImp α /XPG1-NLS.

Apesar de não se saber ao certo como se dá a ligação do complexo HsImp α /XPG1-NLS, sabe-se que a ligação é bastante favorecida, sendo o ΔH e o ΔS negativos (Tabela 10), indicando a energia livre de Gibbs também negativa, assim como o sítio primário da MmImp α ($\Delta H = -3.2 \pm 0.3$ kcal/mol e $\Delta S = -5.3 \pm 0.3$ cal/mol/deg), mas diferente do secundário ($\Delta H = 3.8 \pm 0.3$ kcal/mol e $\Delta S = 11.1 \pm 0.1$ cal/mol/deg), o que demonstra espontaneidade na ligação e que ela pode ocorrer em qualquer temperatura, desde que haja o enovelamento e estabilidade da proteína. Este argumento é evidenciado com a espectroscopia de fluorescência do complexo HsImp/XPG1-NLS, a qual mostra que, de forma significativa, há a diminuição da exposição dos triptofanos em todas as temperaturas analisadas, mesmo que, nas temperaturas mais elevadas, a significância estatística cai bastante.

Diferente dos demais peptídeos, a escolha da PAC-3-NLS foi feita para a comparação da afinidade da HsImp α com peptídeos de outros organismos. A princípio foi realizada uma única medida com o ITC (Figura 16a), utilizando a amostra purificada pela primeira vez, com os protocolos ainda em fases de ajustes. Quando comparado à outros trabalhos com a MmImp α ($K_d \sim 0,44$ μ M) (Bernardes et al., 2020) e a NcImp α ($K_d \sim 0.39$ μ M) (Bernardes et al., 2015), a afinidade do complexo HsImp α /PAC-3-NLS é mais baixa, mas ainda assim, forte (Tabela 11). Porém para melhores resultados, o ideal seria a repetição em triplicata ou duplicata desse experimento. Quando realizada uma nova medida (Figura 16), com uma nova amostra, com protocolos mais bem definidos, nas mesmas condições da anterior, o resultado obtido foi de um padrão de ligação exotérmica, gerando dúvidas quanto a primeira medida. Assim, com a alteração de alguns parâmetros, como a concentração do peptídeo NLS, também foi observado que a ligação não apresenta um padrão, ocorrendo diferentes termogramas para o mesmo complexo (Figura 16 C/D), não sendo possível extrair os parâmetros calorimétricos. Estes valores tornam a análise da interação do complexo inconclusiva, uma vez que podem ter sido ocasionados por instabilidades na estrutura da proteína, como já observado pelo DLS. Isto é, a possível oligomerização parcial da HsImp α quando na presença de uma NLS de baixa afinidade (Tabela 8) como a SV40-NLS, pode não ser capaz de monomerizar a HsImp α .

6. CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi realizada a expressão e purificação da variante $\alpha 1$ da Importina- α de *Homo sapiens* no país, tendo papel fundamental para avanços nos estudos estruturais comparativos com as Imp α de outros organismos. Os experimentos realizados para avaliação da estrutura HsImp α , como o DLS e a espectroscopia de fluorescência, sugerem que há possível dimerização da Imp α quando submetida ao aumento da temperatura e não complexada à NLSs e que esta pode alterar, significativamente, a interação entre as Imp α e os peptídeos NLS. As análises calorimétricas comparativas entre Imp α de diferentes organismos reforçam que são de fundamental importância o estudo da especificidade do transporte proteico, visto que os complexos HsImp α /XPG1-NLS e HsImp α /SV40-NLS apresentam afinidades diferentes quando comparados aos complexos formados com a MmImp α , mesmo com a alta similaridade existentes entre as variantes. Os dados de ITC e fluorescência do complexo HsImp α /XPG1-NLS indicaram uma afinidade relevante, sendo possível uma interação de maneira bipartida, diferente com o observado para a MmImp α . Experimentos de cristalização do complexo HsImp α /XPG1-NLS estão em andamento, podem elucidar este fato. Assim, este trabalho tem suma importância na análise da interação de Imp α e NLS de diferentes organismos, que podem ser determinantes para futuros estudos farmacológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., & Morán, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6(4), 383–390. <https://doi.org/10.1093/protein/6.4.383>
- Barros, A. C. D., Takeda, A. A. S., Dreyer, T. R., Velazquez-Campoy, A., Kobe, B., & Fontes, M. R. M. (2016). Structural and Calorimetric Studies Demonstrate that Xeroderma Pigmentosum Type G (XPG) Can Be Imported to the Nucleus by a Classical Nuclear Import Pathway via a Monopartite NLS Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2120–2131. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.019>
- Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., & Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306(5700), 1387–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1104808>
- Bernardes, Natalia E., Takeda, A. A. S., Dreyer, T. R., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2015). Structure of Importin- α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. *Plos One*, 10(6), e0128687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128687>
- Bernardes, Natália E, Fukuda, C. A., da Silva, T. D., de Oliveira, H. C., de Barros, A. C., Dreyer, T. R., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2020a). Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58316-9>
- Bernardes, Natália E, Fukuda, C. A., da Silva, T. D., de Oliveira, H. C., de Barros, A. C., Dreyer, T. R., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2020b). Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58316-9>
- Bernardes, Natália E, Takeda, A. A. S., Dreyer, T. R., Cupertino, F. B., Virgilio, S., Pante, N., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2017). Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin- α . *Biochemical Journal*, 474(24), 4091–4104. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170654>
- Bernardes, Natalia E, Takeda, A. A. S., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin- from *Neurospora crassa*. *Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications*, 70(4), 501–504. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14005068>
- Boivin, S., & Hart, D. J. (2011). Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin α isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10439–10448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182964>
- Bui, K. H., Von Appen, A., Diguilio, A. L., Ori, A., Sparks, L., Mackmull, M. T., Bock, T., Hagen, W., Andrés-Pons, A., Glavy, J. S., & Beck, M. (2013). XIntegrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold. *Cell*, 155(6), 1233–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.055>
- Chang, C.-W., Couñago, R. L. M., Williams, S. J., Bodén, M., & Kobe, B. (2012). Crystal

- Structure of Rice Importin- and Structural Basis of Its Interaction with Plant-Specific Nuclear Localization Signals. *The Plant Cell*, 24(12), 5074–5088. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104422>
- Christie, M., Chang, C. W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2016a). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2060–2090. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>
- Christie, M., Chang, C. W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2016b). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2060–2090. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>
- Conti, E., & Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure*, 8(3), 329–338. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00107-6)
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., & Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*, 94(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81419-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81419-1)
- Cortes, P., Ye, Z. S., & Baltimore, D. (1994). RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7633–7637. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7633>
- Cutress, M. L., Whitaker, H. C., Mills, I. G., Stewart, M., & Neal, D. E. (2008). Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *Journal of Cell Science*, 121(7), 957–968. <https://doi.org/10.1242/jcs.022103>
- De Barros, A. C., Takeda, A. A. S., Chang, C. W., Kobe, B., & Fontes, M. R. M. (2012). Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(7), 743–750. <https://doi.org/10.1107/S0907444912010281>
- de Barros, A. C., Takeda, A. A. S., Dreyer, T. R., Velazquez-Campoy, A., Kobe, B., & Fontes, M. R. M. (2018). DNA mismatch repair proteins MLH1 and PMS2 can be imported to the nucleus by a classical nuclear import pathway. *Biochimie*, 146, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.013>
- Dias, S. M. G., Wilson, K. F., Rojas, K. S., Ambrosio, A. L. B., & Cerione, R. A. (2010). The molecular basis for the regulation of the CBC by the importins. *Nature Structural Biology*, 16(9), 930–937. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1649>
- Dingwall, C., & Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus? *TIBS*, 16(December), 478–481. file:///C:/Users/Cíntia/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Dingwall, Laskey - 1991 - Nuclear targeting sequences- a consensus.pdf
- Fagerlund, R., Kinnunen, L., Köhler, M., Julkunen, I., & Melén, K. (2005). NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15942–15951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500814200>
- Fanara, P., Hodel, M. R., Corbett, A. H., & Hodel, A. E. (2000). Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin α interaction through fluorescence depolarization: Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 275(28), 21218–21223. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002217200>
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R. I., & Kobe, B. (2003). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27981–27987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303275200>
- Fontes, M. R. M., Teh, T., & Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *Journal of Molecular Biology*, 297(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3642>
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D. A., & Kobe, B. (2003). Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α . *Biochemical Journal*, 375(2), 339–349. <https://doi.org/10.1042/bj20030510>
- Frey, S., Rees, R., Schünemann, J., Ng, S. C., Fünfgeld, K., Huyton, T., & Görlich, D. (2018). Surface Properties Determining Passage Rates of Proteins through Nuclear Pores. *Cell*, 174(1), 202–217.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.045>
- Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* file:///C:/Users/Cíntia/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Görlich, Kutay - 1999 - Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm.pdf
- Görlich, D., & Mattaj, I. W. (1996). Protein kinesin. *Science*, 271(5255), 1477. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1477>
- Grossman, E., Medalia, O., & Zwergner, M. (2012). Functional architecture of the nuclear pore complex. *Annual Review of Biophysics*, 41(1), 557–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102328>
- Hu, J., Wang, F., Yuan, Y., Zhu, X., Wang, Y., Zhang, Y., Kou, Z., Wang, S., & Gao, S. (2010). Novel importin- α family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33113–33122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.117044>
- Knudsen, N. Ø., Andersen, S. D., Lützen, A., Nielsen, F. C., & Rasmussen, L. J. (2009). Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. *DNA Repair*, 8(6), 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.03.005>
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nature Structural Biology*, 6(4), 388–397. <https://doi.org/10.1038/7625>
- Köhler, M. (1999). *logy Nuclear Protein Transport Pathways*. 290–294. file:///C:/Users/Cíntia/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Köhler - 1999 - logy Nuclear Protein Transport Pathways.pdf
- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., & Hartmann, E. (1999). Evidence for Distinct Substrate Specificities of Importin α Family Members in Nuclear Protein Import. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7782–7791. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7782>
- Kutay, U., Ralf Bischoff, F., Kostka, S., Kraft, R., & Görlich, D. (1997). Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, 90(6), 1061–1071. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80372-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80372-4)
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007).

- Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101–5105.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>
- Laurila, E., Vuorinen, E., Savinainen, K., Rauhala, H., & Kallioniemi, A. (2014). KPNA7, a nuclear transport receptor, promotes malignant properties of pancreatic cancer cells in vitro. *Experimental Cell Research*, 322(1), 159–167.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.014>
- Lin, D. H., Stuwe, T., Schilbach, S., Rundlet, E. J., Perriches, T., Mobbs, G., Fan, Y., Thierbach, K., Huber, F. M., Collins, L. N., Davenport, A. M., Jeon, Y. E., & Hoelz, A. (2016). Architecture of the symmetric core of the nuclear pore. *Science*, 352(6283).
<https://doi.org/10.1126/science.aaf1015>
- Lindsay, M. E., Plafker, K., Smith, A. E., Clurman, B. E., & Macara, I. G. (2002). Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- α : β -mediated nuclear protein import. *Cell*, 110(3), 349–360. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00836-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00836-X)
- Marfori, M., Lonhienne, T. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2012). Structural Basis of High-Affinity Nuclear Localization Signal Interactions with Importin- α . *Traffic*, 13(4), 532–548. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x>
- Mason, D. A., Stage, D. E., & Goldfarb, D. S. (2009). Evolution of the metazoan-specific importin α gene family. *Journal of Molecular Evolution*, 68(4), 351–365.
<https://doi.org/10.1007/s00239-009-9215-8>
- Matsuura, Y., & Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature*, 432(7019), 872–877. <https://doi.org/10.1038/nature03144>
- Mattaj, I. W., & Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 265–306.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.265>
- Miles, A. J. (2005). Spectral magnitude effects on the analyses of secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, 14(2), 368–374.
<https://doi.org/10.1110/ps.041019905>
- Miyamoto, Y., Imamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T., & Yoneda, Y. (1997). Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26375–26381. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26375>
- Miyamoto, Y., Yamada, K., & Yoneda, Y. (2016). Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *Journal of Biochemistry*, 160(2), 69–75.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvw036>
- Miyatake, H., Sanjoh, A., Unzai, S., Matsuda, G., Tatsumi, Y., Miyamoto, Y., Dohmae, N., & Aida, Y. (2015). Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization. *PLoS ONE*, 10(2), 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115995>
- Nardozzi, J., Wenta, N., Yasuhara, N., Vinkemeier, U., & Cingolani, G. (2010). Molecular Basis for the Recognition of Phosphorylated STAT1 by Importin α 5. *Journal of Molecular Biology*, 402(1), 83–100. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.013>
- Oka, M., & Yoneda, Y. (2018). Importin α : Functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 94(7), 259–274. <https://doi.org/10.2183/pjab.94.018>

- Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochemical Journal*, 466(1), 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>
- Pumroy, R. A., Ke, S., Hart, D., Zachariae, U., & Cingolani, G. (2014). Molecular Determinants for nuclear import of Influenza A PB2 by importin- α isoforms 3 and 7. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.015>.Molecular
- Pumroy, R. A., Nardozzi, J. D., Hart, D. J., Root, M. J., & Cingolani, G. (2012). Nucleoporin Nup50 stabilizes closed conformation of armadillo repeat 10 in importin α 5. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 2022–2031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315838>
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jarnik, M., Engel, A., & Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *Journal of Cell Biology*, 110(4), 883–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.883>
- Sorokin, A. V., Kim, E. ., & Ovchinnikov, L. . (2010). The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Virologica Sinica*, 25(2), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s12250-010-3099-z>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Stewart, M. (2006). Structural basis for the nuclear protein import cycle. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 701–704. <https://doi.org/10.1042/bst0340701>
- Stewart, Murray. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 195–208. <https://doi.org/10.1038/nrm2114>
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D., & Aebi, U. (2003). Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: Implications for nucleocytoplasmic transport. *Journal of Molecular Biology*, 328(1), 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00266-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00266-3)
- Suntharalingam, M., & Wente, S. R. (2003). Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Developmental Cell*, 4(6), 775–789. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00162-X)
- Tachibana, T., Hieda, M., Miyamoto, Y., Kose, S., Imamoto, N., & Yoneda, Y. (2000). Recycling of importin α from the nucleus is suppressed by loss of RCC1 function in living mammalian cells. *Cell Structure and Function*, 25(2), 115–123. <https://doi.org/10.1247/csf.25.115>
- Takeda, A. a S., Freitas, F. Z., Magro, A. J., Bernardes, N. E., Fernandes, C. a H., Gonçalves, R. D., Bertolini, M. C., & Fontes, M. R. M. (2013). Biophysical characterization of the recombinant importin- α from *Neurospora crassa*. *Protein and Peptide Letters*, 20(1), 8–16. <https://doi.org/10.2174/092986613804096829>
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P. J., Bougault, C. M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R. W. H., Daigle, N., Ellenberg, J., Cusack, S., Simorre, J. P., & Hart, D. J. (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(3), 229–233. <https://doi.org/10.1038/nsmb1212>
- Teh, T., Tiganis, T., & Kobe, B. (1999). Crystallization of importin α , the nuclear-import

- receptor. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(2), 561–563. <https://doi.org/10.1107/S0907444998012943>
- Tejomurtula, J., Lee, K.-B., Tripurani, S. K., Smith, G. W., & Yao, J. (2009). Role of Importin Alpha8, a New Member of the Importin Alpha Family of Nuclear Transport Proteins, in Early Embryonic Development in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 81(2), 333–342. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077396>
- Timney, B. L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J. M., Kim, S. J., Russel, D., Wente, S. R., Sali, A., & Rout, M. P. (2016). Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology*, 215(1), 57–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601004>
- Trazel, T., Tiganis, T., & Kobe, B. (1999). Crystallization of importin α , the nuclear-import receptor. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(2), 561–563. <https://doi.org/10.1107/S0907444998012943>
- Trowitzsch, S., Viola, C., Scheer, E., Conic, S., Chavant, V., Fournier, M., Papai, G., Ebong, I. O., Schaffitzel, C., Zou, J., Haffke, M., Rappsilber, J., Robinson, C. V., Schultz, P., Tora, L., & Berger, I. (2015). Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed submodules. *Nature Communications*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms7011>
- Weis, K., Mattaj, I. W., & Lamond, A. I. (1995). Identification of hSRP1 α as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science*, 268(5213), 1049–1053. <https://doi.org/10.1126/science.7754385>
- Wirthmueller, L., Roth, C., Fabro, G., Caillaud, M. C., Rallapalli, G., Asai, S., Sklenar, J., Jones, A. M. E., Wiermer, M., Jones, J. D. G., & Banfield, M. J. (2015). Probing formation of cargo/importin- α transport complexes in plant cells using a pathogen effector. *Plant Journal*, 81(1), 40–52. <https://doi.org/10.1111/tpj.12691>
- Xu, W., Edwards, M. R., Borek, D. M., Feagins, A. R., Mittal, A., Pappu, R. V., Leung, D. W., Basler, C. F., & Amarasinghe, G. K. (2015). *NIH Public Access*. 16(2), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.008.Ebola>
- Yutaka Ogawa, Miyamoto, Y., Asally, M., Oka, M., Yasuda, Y., & Yoneda, Y. (2009). Mutant SOD1 and Attenuates Mutant SOD1-induced Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4524–4530. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>