

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/07/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

NATÁLIA ELISA BERNARDES

**ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DO FUNGO *Neurospora crassa* E
PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE
PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE FUNGOS**

BOTUCATU – SP

2018

A decorative graphic in the bottom right corner of the page, featuring a blue and white polka-dot pattern overlaid on a white geometric pattern of intersecting lines.

Natália Elisa Bernardes

**ESTUDOS ESTRUTURAIS COM A IMPORTINA- α DO FUNGO *Neurospora crassa* E
PEPTÍDEOS DE SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR (NLS) DE
PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE FUNGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para Exame Geral de Defesa de Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas - estrutura e função.

Orientador: Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

BOTUCATU – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bernardes, Natália Elisa.

Estudos estruturais com a Importina- α do fungo *Neurospora crassa* e peptídeos de sequências de localização nuclear (NLS) de proteínas relacionadas ao metabolismo de fungos / Natália Elisa Bernardes. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Capes: 20901003

1. Cristalografia. 2. *Neurospora crassa*. 3. Peptídeos. 4. Proteínas.

Palavras-chave: Cristalografia; ITC; Importina- α ; NLS; *Neurospora crassa*.

Dedico essa tese aos meus pais, Lincoln e Maria

AGRADECIMENTOS

Essa tese é apenas uma parte de tudo o que foi produzido, aprendido e compartilhado durante a longa jornada da pós-graduação. E o trabalho apresentado aqui não seria possível sem o apoio estrutural, financeiro, pessoal e psicológico de pessoas e instituições. Esse é o espaço que tenho para homenageá-los.

Começo agradecendo ao Professor Marcos Fontes por ter sido o idealizador dessa pesquisa e por me permitir fazer parte de seu laboratório por tantos anos; à professora Maria Célia por participar e colaborar com a realização desse trabalho e à professora Nelly Panté pelo suporte durante o período de intercâmbio em seu laboratório.

Em seguida, agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Física e Biofísica que forneceram o apoio estrutural para que os experimentos fossem realizados; ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pelo suporte institucional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Curso Superior (CAPES) pelo suporte técnico e financeiro através do Processo nº 2014/10289-0

No âmbito pessoal, algumas pessoas contribuíram para que esse período fosse vivido intensamente: Agradeço imensamente aos meus pais, Lincoln e Maria, minhas irmãs Amália e Carolina, minha tia Márcia por sempre me incentivarem a ser uma mulher independente e persistente e me ajudarem a enfrentar os momentos mais difíceis oferecendo carinho e conforto; ao meu cunhado Rafael por trazer um novo ponto de vista a nossa família. Em especial, agradeço ao meu sobrinho recém-nascido João Lincoln, pois seu nascimento fez com que essa tese fosse escrita em um momento de muita alegria e esperança no futuro.

Agradeço aos amigos mais próximos: Cristiane, por estar sempre disposta a dividir as alegrias e angústias, mesmo estando longe; Luana pelas conversas tão variadas e prazerosas; Taíla, por fazer com que o dia-a-dia no departamento seja muito mais agradável; Letícia, por ter sido minha "roommate" por tantos anos; Andrea, por compartilhar a Impa e as aspirações na carreira; Carolina, por fazer de Vancouver uma cidade muito mais acolhedora.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e do Departamento de Física e Biofísica por compartilhar conhecimento e muitos momentos agradáveis e às alunas de iniciação científica Cíntia e Tainá por aceitarem a minha orientação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado David que está me ensinando que calma e gentileza podem mudar o mundo e que sempre me incentiva a melhorar, dizendo: "there is always room for improvement".

RESUMO

A comunicação entre o núcleo celular e o citoplasma acontece através de mecanismos de transporte que permitem a passagem de moléculas por poros presentes no envoltório nuclear. Na Via Clássica de Importação Nuclear, a proteína Importina- α (Imp α) atua na identificação das proteínas a serem transportadas ao núcleo a partir do reconhecimento de sequências de localização nuclear (NLS). Os primeiros estudos de caracterização estrutural da Imp α de *Neurospora crassa* (NcImp α) e a sua estrutura cristalográfica mostraram a presença de regiões que podem estar relacionadas a especificidades da proteína NcImp α no reconhecimento de NLSs de proteínas de fungos. Além disso, foram reconhecidos prováveis NLSs em proteínas reguladoras do metabolismo de carbono e nitrogênio em fungos. O objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar o modo de interação de NLSs de proteínas fúngicas com a NcImp α e verificar possíveis especificidades da proteína NcImp α no reconhecimento de NLSs. Os potenciais peptídeos NLS de proteínas dos fungos filamentosos *N. crassa* e *Aspergillus nidulans* foram submetidos a experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com a proteína NcImp α , para calcular a afinidade entre as moléculas. Dentre os peptídeos testados, as sequências correspondentes ao potenciais NLS dos fatores de transcrição PAC-3, NIT-2, FLB-3, VOSA e VEA, apresentaram elevada afinidade com a NcImp α , conforme indicado pelos valores de K_d obtidos. Quando submetidos a experimentos de importação nuclear, o peptídeo NIT2-NLS foi eficientemente transportado para o interior do núcleo celular. Foram realizados testes de cristalização para a elucidação da estrutura dos complexos Imp α /peptídeos NLS. O conjunto de dados do complexo NcImp α /NIT2NLS a 2,50 Å de resolução, permitiu a elucidação da estrutura onde foi possível observar a presença do peptídeo NIT2-NLS nos sítios principal e secundário de NcImp α . Já a estrutura do complexo MmImp α /PAC3-NLS mostrou o peptídeo se lihando com maior afinidade apenas ao sítio principal. A comparação das sequências dos peptídeos VEA-NLS e VE1-NLS mostrou que a substituição de um resíduo de lisina por uma leucina e uma lisina por uma arginina nas posições P1' e P2 é suficiente para reduzir drasticamente a afinidade do peptídeo VE1-NLS pela NcImp α . Por fim, se sugere que o peptídeo VOSA-NLS se liga a NcImp α em uma conformação muito semelhante ao peptídeo NIT2-NLS e as NLSs da proteína FLB3-NLS podem apresentar afinidade a apenas um dos sítios da proteína NcImp α .

ABSTRACT

*The communication between the cell nucleus and the cytoplasm happens through transport mechanisms that allow the passage of molecules through pores present in the nuclear envelope. In the classical nuclear import pathway, the protein Importin- α (Imp α) acts in the identification of the proteins to be transported to the nucleus from the recognition of nuclear localization sequences (NLS). The first structural characterization studies of *N. crassa* Imp α (NcImp α) and its crystallographic structure showed the presence of regions that may be related to protein specificities in the recognition of fungal NLSs. In addition, NLSs were recognized in proteins related to fungal metabolism. The objective of this work is to identify NLSs in fungal proteins and observe the specificities of the NcImp α protein. Potential NLS peptides of *N. crassa* were subjected to isothermal titration calorimetry (ITC) experiments with NcImp α to verify and calculate the affinity of the complexes. Among the peptides tested, the sequences corresponding to the potentials NLS of the transcription factors PAC-3, NIT-2, FLB-3, VOSA and VEA, showed high affinity with NcImp α , as indicated by the K_d values obtained. When subjected to functional experiments with HeLa cells, the peptide NIT2-NLS were efficiently transported into the cell nucleus. Crystallization tests were performed to elucidate the structure of the complexes Imp α /NLS peptides. A set of data from the NcImp α / NIT2NLS complex was collected, with 99.71% completeness at 2.50 resolution, from which the structure was elucidated. It was possible to observe the presence of NIT2NLS peptides in the major and minor binding sites of NcImp α . The structure of the MmImp α /PAC3-NLS complex was also elucidated in order to compare the interaction of the same peptide with different isoforms of the Imp α protein. The structure of the MmImp α /PAC3-NLS complex showed the peptide binding with higher affinity to the major binding site. Comparison of the sequences of the VEA-NLS and VE1-NLS peptides showed that the substitution of a lysine residue by a leucine and a lysine by an arginine at positions P1 'and P2 is sufficient to drastically reduce the affinity of the peptide VE1-NLS by NcImp α . Finally, it is suggested that the VOSA-NLS peptide binds to NcImp α in a conformation very similar to the peptide NIT2-NLS and the NLSs of the FLB3-NLS protein exhibits affinity to only one of the NcImp α protein sites.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ARM – *Armadillo*

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina do soro bovino

CAS - *Cellular apoptosis susceptibility protein*

cNLS – Sequência de localização nuclear clássica

CY3 – Cianina 3

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

EGTA - Ácido egtazico

EN – Envelope nuclear

FEN1 – Endonuclease 1 flap

FLB-3 – (*fluffy low brlC expression*)

GATA - Família de fatores de transcrição com domínios contendo zinco

GFP - Proteína verde fluorescente

GTP – Guanosina trifosfato

H1, H2 e H3 – Hélices 1, 2 ou 3 do motivo ARM

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

HeLa - Linhagem de células do tumor de Henrietta Lacks

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IBB – Domínio de ligação a Importina β (Importin- β binding)

Imp α – Importina- α

Imp β – Importina- β

IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*)

K_a – Constante de associação

Kap- α 1, Kap- α 2, Kap- α 3 – Carioferinas das famílias α 1, α 2 e α 3

K_d – Constante de dissociação

KNO₃ - Nitrato de potássio

LB - Luria Bertani (meio de cultura)

MDa - Mega daltons

MES - Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico

MmImp α – Importina- α de *Mus musculus*

N1N2 - Proteína ligada a histona

NcImp α - Importina- α de *Neurospora crassa*

NES - Sequência de exportação nuclear

NIT-2 – Membro 2 da família nitrilase

NLS – Sequência de localização nuclear

NMR - Ressonância magnética nuclear

NPC – Complexo poro nuclear

ORF - *open reading frame*

PAC-3 – Fator de transcrição pH responsivo

PB2 - polymerase basic protein 2

PBS - Tampão fosfato-salino

PDB - Banco de dados de proteínas/*protein data bank*

PEG - Polietilenoglicol

PFA - Paraformaldeído

PID - número de identificação da proteína

RanGTP – Guanosina trifostato complexada a proteína Ran

RNAse – Ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

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

SV40 – Antígeno T do vírus de símio 40

VD - Domínio *velvet*

VE-1 – Proteína Velvet A em *N. crassa*

VEA – proteína Velvet A em *A. nidulan*

VelB - Subunidade B do complexo *velvet*

VM - Meio Vogel

VOSA – Proteína da viabilidade dos esporos A

XPG - Proteína de reparo de DNA complementando células XP-G

XRCC1 - Proteína de reparo de DNA : X-Ray Repair Cross Complementing 1

yCBP80 – Complexo de proteína de ligação a CAP

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrado do Complexo Poro Nuclear (CPN).	19
Figura 2. Esquema simplificado da Via Clássica de Importação Nuclear.	21
Figura 3. Filogênia das Imp α	25
Figura 4. Estrutura cristalográfica da proteína Nclmp α	27
Figura 5. Etapas para identificação e caracterização de NLSs em proteínas.	32
Figura 6. Purificação das proteínas Nclmp α e Mmlmp α por cromatografia de afinidade.	41
Figura 7. Crescimento das cepas Δ nit-2 e localização da proteína NIT-2 em diferentes condições de nitrogênio.	43
Figura 8. Termogramas e isoterma resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica do complexo Nclmp α /NIT2-NLS.	45
Figura 9. Ensaio de importação nuclear em células Hela com os complexos BIMAX1-NLS-BSA e NIT2-NLS-BSA.	48
Figura 10. Ensaio de importação nuclear em células Hela com o complexo NIT2-NLS-BSA e o peptídeo BIMAX1.	50
Figura 11. Cristal do complexo Nclmp α /NIT2-NLS. Cristal obtido na condição: Bicine 0,2 mM, pH 8,5 e polietileno glicol 6000 20 % (p/v).	51
Figura 12. Estrutura cristalográfica da proteína Nclmp α complexada ao peptídeo NIT2-NLS.	53
Figura 13. Esquema representando as interações entre o peptídeo NIT2-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína Nclmp α	55
Figura 14. Modelo para o tráfico subcelular da proteína PACC de <i>A. nidulans</i> em resposta ao pH do ambiente.	60
Figura 15. Localização subcelular da proteína PAC-3	61
Figura 16. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos A) Nclmp α /PAC3-NLS e B) Mmlmp α /PAC3-NLS.	63
Figura 17. Cristais do complexo Nclmp α /PAC3-NLS	64
Figura 18. Cristais do complexo Mmlmp α /PAC3-NLS.	65

Figura 19. Mapa de densidade eletrônica nos sítios principal e secundário do complexo Mmlmp α /PAC3-NLS.	68
Figura 20. Estrutura cristalográfica do complexo Mmlmp α /PAC3-NLS.	69
Figura 21. Esquema representando as interações entre o peptídeo PAC3-NLS nos sítios principal (A) e secundário (B) da proteína Mmlmp α	72
Figura 22. Sobreposição de NLSs bipartidas que interagem com a proteína Imp α	74
Figura 23. Sobreposição dos peptídeos SV40-NLS, NIT2-NLS e PAC3-NLS que interagem com a proteína Imp α . As NLSs foram obtidas a partir das estruturas dos complexos Nclmp α /SV40-NLS (PDB ID: 4RXH) e Nclmp α /NIT2-NLS (PDB ID: 5VQ1).	75
Figura 24. Sobreposição da estrutura Nclmp α com as estruturas das proteínas Mmlmp α , Oslmp α e Hslmp α	77
Figura 25. Resíduos que dificultam a ligação de NLSs ao sítio secundário de Mmlmp α	79
Figura 26. Diagrama esquemático da função dos reguladores <i>velvet</i> no desenvolvimento de <i>A. nidulans</i>	82
Figura 27. Identificação dos domínios das proteínas da família velvet.	82
Figura 28. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) Nclmp α /FLB3a-NLS; B) Nclmp α /FLB3b-NLS.	85
Figura 29. Termogramas e isotermas resultantes das análises por calorimetria de titulação isotérmica dos complexos: A) Nclmp α /VEA-NLS; B) Nclmp α /VE1-NLS; C) Nclmp α /VOSA-NLS.	87
Figura 30. Ensaio de importação nuclear em células HeLa com os complexos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA.	90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências consenso das seis classes de NLSs Imp α - dependentes.....	29
Tabela 2. Fatores de transcrição relacionados ao crescimento de fungos filamentosos.	30
Tabela 3. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína NIT-2.....	44
Tabela 4. Constantes termodinâmicas obtidas pelas análises por ITC do complexo Nclmp α /NIT2-NLS. ...	46
Tabela 5. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura cristalográfica do complexo Nclmp α /NIT2-NLS.	52
Tabela 6. Valores de B-factor dos resíduos dos peptídeos NIT2-NLS ligados aos sítios principal e secundário da proteína Nclmp α	54
Tabela 7. Interação de NLSs monopartidos e NLS-like com a proteína Imp α	57
Tabela 8. Prováveis NLSs identificados na sequência da proteína PAC-3.....	62
Tabela 9. Constantes termodinâmicas obtidas a partir das medidas de ITC dos complexos Nclmp α /PAC3-NLS e Mmlmp α /PAC3-NLS.	63
Tabela 10. Estatísticas de coleta e refinamento da estrutura do complexo Mmlmp α /PAC3-NLS.	66
Tabela 11. Valores de <i>B-factor</i> dos resíduos do peptídeo PAC3-NLS ligado aos sítios principal e secundário da proteína Nclmp α	70
Tabela 12. Prováveis NLSs identificados na sequência das proteínas FLB3, VEA e VOSA	84
Tabela 13. Constantes termodinâmicas obtidas a partir dos experimentos de ITC dos complexos Nclmp α /FLB3a-NLS, Nclmp α /FLB3b-NLS, Nclmp α /VEA-NLS, Nclmp α /VOSA-NLS.	88
Tabela 14. Sugestão da ligação dos peptídeos VEA-NLS, VE1-NLS e VOSA-NLS aos sítios da proteína Imp α	91
Tabela 15. Sugestão da ligação dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS aos sítios da proteína Imp α	93

SUMÁRIO

Apresentação da Tese	17
1 Introdução: Função e especificidades da proteína Importina-α e NLSs no processo de importação nuclear.	18
1.1 Transporte intracelular de macromoléculas.....	18
1.2 A proteína Imp α	22
1.3 Isoformas e especificidades da Imp α em diferentes organismos.....	23
1.4 Importina- α do fungo <i>N. crassa</i>	26
1.5 Sequências de Localização Nuclear.....	28
1.6 Potenciais peptídeos NLSs presentes em proteínas relacionadas ao metabolismo de fungos filamentosos.....	29
2 Objetivos	31
3 Material e Métodos: Identificação e caracterização de NLSs	32
3.1 Clonagem das proteínas MmImp α e NcImp α recombinantes.....	34
3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	35
3.3 Predição e síntese de potenciais NLSs.....	36
3.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	36
3.5 Ensaio de Importação nuclear em células HeLa permeabilizadas com digitonina.....	37
3.6 Cristalização	38
3.7 Coleta e processamento de dados de difração de raios X.....	39
4 Produção das proteínas MmImpα e NcImpα recombinantes.....	40
4.1 Resultados.....	40
4.2 Conclusão.....	41
5 Transporte nucleocitoplasmático do fator de transcrição NIT-2 pela NcImpα.	42

5.1	Resultados.....	44
5.1.1	Identificação de potenciais NLSs na proteína NIT-2.	44
5.1.2	Afinidade da proteína Nclmp α pelo peptídeo NIT2-NLS	45
5.1.3	Transporte do peptídeo NIT2-NLS ao interior do núcleo de células HeLa permeabilizadas. 46	
5.1.4	Ensaio de competição entre os peptídeos NIT2-NLS-BSA e BIMAX1-NLS-BSA.	48
5.1.5	Estrutura cristalográfica do complexo Nclmp α /NIT2-NLS.	50
5.2	Discussão.....	56
5.3	Conclusão.....	58
6	Importação nuclear do fator de transcrição PAC-3.	59
6.1	Resultados.....	61
6.1.1	Identificação de potenciais sequências NLS na proteína PAC-3.	61
6.1.2	Afinidade do peptídeo PAC3-NLS com as proteínas Nclmp α e Mmlmp α	62
6.1.3	Estrutura cristalográfica do complexo Imp α /PAC3-NLS	64
6.2	Discussão.....	72
6.2.1	A proteína PAC-3 é transportada para o núcleo celular a partir do reconhecimento de uma NLS bipartida não-clássica.	72
6.2.2	Diferenças entre as estruturas Nclmp α e Mmlmp α	74
6.3	Conclusão.....	79
7	Potenciais NLSs dos fatores de transcrição FLB-3, VEA e VOSA.....	80
7.1	Resultados.....	83
7.1.1	Identificação de potenciais peptídeos NLSs nas sequências das proteínas FLB-3, VEA e VOSA. 83	
7.1.2	Afinidade dos peptídeos FLB3a-NLS, FLB3b-NLS, VE1-NLS, VEA-NLS e VOSA-NLS com a proteína Nclmp α	84
7.1.3	Ensaio de Importação nuclear com os peptídeos FLB3a-NLS-BSA e FLB3b-NLS-BSA.....	88

7.2	Discussão.....	90
7.2.1	A substituição de uma lisina por uma leucina no peptídeo VE1-NLS impede a ligação a Nclmp α	90
7.2.2	O peptídeo VOSA-NLS deve se ligar a proteína Imp α em uma conformação monopartida similar a NIT2-NLS.	91
7.2.3	As sequências NLSs encontradas na proteína FLB-3 interagem com apenas um dos sítios da proteína Nclmp α	92
7.3	Conclusão.....	93
8	Conclusões finais.....	94
9	Referências Bibliográficas	95
	APÊNDICE A	105
	Nuclear Import Assay Tutorial.....	105
	APÊNDICE B	110
	APÊNDICE C.....	127
	APÊNDICE D.....	150

Apresentação da Tese

Essa Tese foi dividida em 9 capítulos. Os capítulos 5, 6, 7 e 8 descrevem os resultados obtidos e contam com uma introdução sobre cada fator de transcrição analisado e com alguns resultados já disponíveis na literatura. O conteúdo da tese está distribuído da seguinte forma:

Capítulo 1: Introdução do mecanismo e das moléculas que participam do transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas, destacando as especificidades da proteína Imp α nesse processo.

Capítulo 2: Objetivos desse trabalho

Capítulo 3: Material e métodos, com a descrição de todas as técnicas utilizadas para a obtenção dos resultados apresentados nos capítulos posteriores.

Capítulo 4: Descrição da obtenção das proteínas Imp α recombinantes.

Capítulo 5: Descrição da interação do NLS do fator de transcrição NIT2 com a proteína Imp α de *Neurospora crassa*. No início deste capítulo há uma breve introdução com as funções desse fator de transcrição e alguns resultados preliminares descritos na literatura.

Capítulo 6: Nesse capítulo são apresentados os resultados e conclusões obtidas a partir das análises da interação do fator de transcrição PAC-3 com a Imp α . O capítulo se inicia com uma breve introdução do fator de transcrição PAC-3 e resultados preliminares descritos na literatura.

Capítulo 7: Análises da interação dos fatores de transcrição VEA, VOSA, FLB-3 com NcImp α . A introdução desse capítulo descreve as funções desses fatores de transcrição nos fungos *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*.

Capítulo 8: Conclusões gerais a partir de todos os resultados obtidos.

Capítulo 9: Referências bibliográficas.

8 Conclusões finais

Os fatores de transcrição NIT-2, PAC-3, FLB-3, VEA e VOSA apresentam NLSs com afinidade significativa a proteína NcImp α . Dentre estas, as NLSs de NIT-2, FLB-3, VEA e VOSA são NLSs monopartidas, enquanto a NLS de PAC-3 é bipartida.

A estrutura do complexo NcImp α /NIT2-NLS além de mostrar que o peptídeo se liga de forma clássica, também indicou que o sítio secundário da proteína é importante no reconhecimento de NLSs, diferente do sugerido em outros estudos com Imp α da família α 1. Também foi demonstrado que a presença de resíduos de glutamina nas NLSs não interfere na ligação das sequências com a Imp α .

A estrutura do complexo MmImp α /PAC3-NLS comprovou que a NLS se liga de forma bipartida tanto a proteína NcImp α quanto MmImp α . Nessa estrutura, a ligação de um resíduo de glutamina na posição P5 demonstra que essa NLS não é compatível com o consenso das NLSs clássicas, o que contribui para a amplificação desse conceito.

Por fim, a comparação das sequências dos peptídeos VEA-NLS e VE1-NLS mostrou que a substituição de um resíduo de lisina por uma leucina na posição P2 é suficiente para reduzir drasticamente a afinidade do peptídeo VE1-NLS pela NcImp α .

O peptídeo VOSA-NLS deve se ligar a NcImp α em uma conformação muito semelhante ao peptídeo NIT2-NLS, porém interagindo com apenas um dos sítios de NcImp α assim como as NLSs da proteína FLB3-NLS.

9 Referências Bibliográficas

ADAM, S. A.; MARR, R. S.; GERACE, L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. **J Cell Biol**, v. 111, n. 3, p. 807-16, Sep 1990. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391365>>.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 1, p. 35-54, Mar 1998. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529886>>.

AHMED, Y. L. et al. The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF-kappaB. **PLoS biology**, v. 11, n. 12, p. e1001750, Dec 2013. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391470>>.

ANDRADE, M. A. et al. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. **J Mol Biol**, v. 309, n. 1, p. 1-18, May 25 2001. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491282>>.

ARAUJO-BAZAN, L. et al. Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 6-7, p. 506-15, Jun-Jul 2009. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318129>>.

BARROS, A. C. et al. 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. **J Mol Biol**, v. 428, n. 10 Pt A, p. 2120-31, May 22 2016. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812207>>.

BAYRAM, O. et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1504-6, Jun 13 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556559>>.

BAYRAM, O. et al. *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 2, p. 127-38, Feb 2008. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631397>>.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 27, n. 11, p. 499-506, Nov 15 1941. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16588492>>.

BERNARDES, N. E. et al. Structure of Importin-alpha from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128687, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091498>>.

BERNARDES, N. E. et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin-alpha from *Neurospora crassa*. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**, v. 70, n. Pt 4, p. 501-4, Apr 2014. ISSN 2053-230X (Electronic) 2053-230X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699749> >.

BERNARDES, N. E. et al. Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by Importin-alpha. **Biochem J**, Oct 20 2017. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054975> >.

BERTUZZI, M. et al. The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004413, Oct 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329394> >.

BONI, A. C. et al. *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor. **Fungal biology**, v. 122, n. 6, p. 570-582, Jun 2018. ISSN 1878-6146 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29801802> >.

BREEUWER, M.; GOLDFARB, D. S. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. **Cell**, v. 60, n. 6, p. 999-1008, Mar 23 1990. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690602> >.

CALVO, A. M. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 7, p. 1053-61, Jul 2008. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457967> >.

CHANG, C. W. et al. Crystal structure of rice importin-alpha and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. **Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 5074-88, Dec 2012. ISSN 1532-298X (Electronic) 1040-4651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250448> >.

CHANG, C. W. et al. The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin-alpha. **Plant Signal Behav**, v. 8, n. 10, Oct 2013. ISSN 1559-2324 (Electronic) 1559-2316 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270630> >.

CHANG, C. W. et al. Structural basis of interaction of bipartite nuclear localization signal from *Agrobacterium* VirD2 with rice importin-alpha. **Molecular plant**, v. 7, n. 6, p. 1061-4, Jun 2014. ISSN 1752-9867 (Electronic) 1674-2052 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503158> >.

CHEN, M. H. et al. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10599-606, Mar 18 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611084> >.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. **Nature**, v. 399, n. 6733, p. 230-7, May 20 1999. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353245> >.

CHRISTIE, M. et al. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. **J Mol Biol**, v. 428, n. 10 Pt A, p. 2060-90, May 22 2016. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523678> >.

CONTI, E.; IZAURRALDE, E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 310-9, Jun 2001. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343901> >.

CONTI, E.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. **Structure**, v. 8, n. 3, p. 329-38, Mar 15 2000. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745017> >.

CONTI, E. et al. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 193-204, Jul 24 1998. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695948> >.

COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 647-71, 2007. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506639> >.

CUTRESS, M. L. et al. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 7, p. 957-68, Apr 1 2008. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319300> >.

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. Timeline: Neurospora: a model of model microbes. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988765> >.

DIAS SM, WILSON KF, ROJAS KS, AMBROSIO AL, CERIONE RA. The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. **Nat Struct Mol Biol**. 2009;16:930–937.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? **Trends Biochem Sci**, v. 16, n. 12, p. 478-81, Dec 1991. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664152> >.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 4, p. 486-501, Apr 2010. ISSN 1399-0047 (Electronic) 0907-4449 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383002> >.

FANARA, P. et al. Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21218-23, Jul 14 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806202> >.

FONTES, M. R. et al. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27981-7, Jul 25 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695505> >.

FONTES, M. R.; TEH, T.; KOBE, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. **J Mol Biol**, v. 297, n. 5, p. 1183-94, Apr 14 2000. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764582> >.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-68, Apr 24 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712197> >.

GERALDO, M. T. et al. Bending-Twisting Motions and Main Interactions in Nucleoplasmin Nuclear Import. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157162, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27258022> >.

GOLDFARB, D. S. et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 505-14, Sep 2004. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350979> >.

GONCALVES, R. D. et al. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 11, p. M111 007963, Nov 2011. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21768394> >.

GORLICH, D. et al. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. **Curr Biol**, v. 5, n. 4, p. 383-92, Apr 01 1995. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627554> >.

GORLICH, D.; KUTAY, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 607-60, 1999. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611974> >.

GORLICH, D.; MATTAJ, I. W. Nucleocytoplasmic transport. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1513-8, Mar 15 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599106> >.

GORLICH, D. et al. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell**, v. 79, n. 5, p. 767-78, Dec 02 1994. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001116> >.

HAMAMOTO, T.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action of leptomycin B on *Schizosaccharomyces pombe*. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 38, n. 11, p. 1573-80, Nov 1985. ISSN 0021-8820 (Print) 0021-8820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4077736> >.

HICKS, G. R.; RAIKHEL, N. V. Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 3, p. 734-8, Jan 31 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7846044> >.

HODEL, M. R.; CORBETT, A. H.; HODEL, A. E. Dissection of a nuclear localization signal. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1317-25, Jan 12 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038364> >.

HU, J. et al. Novel importin-alpha family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 33113-22, Oct 22 2010. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699224> >.

KATO, N.; BROOKS, W.; CALVO, A. M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 6, p. 1178-86, Dec 2003. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665453> >.

KELLEY, J. B. et al. Karyopherin alpha7 (KPNA7), a divergent member of the importin alpha family of nuclear import receptors. **BMC Cell Biol**, v. 11, p. 63, Aug 11 2010. ISSN 1471-2121 (Electronic) 1471-2121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701745> >.

KEMINER, O.; PETERS, R. Permeability of single nuclear pores. **Biophys J**, v. 77, n. 1, p. 217-28, Jul 1999. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388751> >.

KIM, H. et al. The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 37, n. 1, p. 72-80, Oct 2002. ISSN 1087-1845 (Print) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223191> >.

KIRBY, T. W. et al. Nuclear Localization of the DNA Repair Scaffold XRCC1: Uncovering the Functional Role of a Bipartite NLS. **Scientific reports**, v. 5, p. 13405, Aug 25 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26304019> >.

KLOCKO, A. D. et al. *Neurospora* importin alpha is required for normal heterochromatic formation and DNA methylation. **PLoS genetics**, v. 11, n. 3, p. e1005083, Mar 2015. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793375> >.

KNUDSEN, N. O. et al. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 6, p. 682-9, Jun 04 2009. ISSN 1568-7864 (Print) 1568-7856 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376751> >.

KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 4, p. 388-97, Apr 1999. ISSN 1072-8368 (Print) 1072-8368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201409> >.

KOHLER, M. et al. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. **FEBS Lett**, v. 417, n. 1, p. 104-8, Nov 3 1997. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395085> >.

KOHLER, M. et al. Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 7782-91, Nov 1999. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523667> >.

KOSUGI, S. et al. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. **Chem Biol**, v. 15, n. 9, p. 940-9, Sep 22 2008. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804031> >.

KOSUGI, S. et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 478-85, Jan 02 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001369> >.

KOSUGI, S. et al. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 25, p. 10171-6, Jun 23 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520826> >.

KWON, N. J. et al. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 5, p. 1203-19, Sep 2010. ISSN 1365-2958 (Electronic) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624219> >.

KWON, N. J. et al. The putative guanine nucleotide exchange factor RicA mediates upstream signaling for growth and development in *Aspergillus*. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 11, p. 1399-412, Nov 2012. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002107> >.

LADBURY, J. E. Application of isothermal titration calorimetry in the biological sciences: things are heating up! **Biotechniques**, v. 37, n. 6, p. 885-7, Dec 2004. ISSN 0736-6205 (Print) 0736-6205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15597533> >.

LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chem Biol**, v. 3, n. 10, p. 791-801, Oct 1996. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939696> >.

LANGE, A. et al. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5101-5, Feb 23 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170104> >.

LASKOWSKI, R. A.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J Mol Biol**, v. 231, n. 4, p. 1049-67, Jun 20 1993. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515464> >.

LAURILA, E. et al. KPNA7, a nuclear transport receptor, promotes malignant properties of pancreatic cancer cells in vitro. **Exp Cell Res**, v. 322, n. 1, p. 159-67, Mar 10 2014. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275456> >.

LIN, J. R.; HU, J. SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76864, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204689> >.

LOTT, K. et al. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin alpha1. **J Biol Chem**, v. 286, n. 32, p. 28160-9, Aug 12 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690087> >.

MARFORI, M. et al. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin-alpha. **Traffic**, v. 13, n. 4, p. 532-48, Apr 2012. ISSN 1600-0854 (Electronic) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248489> >.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 1, p. 17-32, Mar 1997. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106362> >.

MASON, D. A.; FLEMING, R. J.; GOLDFARB, D. S. Drosophila melanogaster importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. **Genetics**, v. 161, n. 1, p. 157-70, May 2002. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019231> >.

MEHDI, A. M. et al. A probabilistic model of nuclear import of proteins. **Bioinformatics**, v. 27, n. 9, p. 1239-46, May 01 2011. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372083> >.

MINGOT, J. M. et al. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 5, p. 1688-99, Mar 2001. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238906> >.

NAKADA, R.; HIRANO, H.; MATSUURA, Y. Structural basis for the regulation of nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) by phosphorylation of the nuclear localization signal. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 484, n. 1, p. 113-117, Feb 26 2017. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104399> >.

NARDOZZI, J. et al. Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin alpha5. **J Mol Biol**, v. 402, n. 1, p. 83-100, Sep 10 2010. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643137> >.

NI, M.; YU, J. H. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e970, Oct 03 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912349> >.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol**, v. 276, p. 307-26, 1997. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27754618> >.

PAN, H.; FENG, B.; MARZLUF, G. A. Two distinct protein-protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. **Molecular microbiology**, v. 26, n. 4, p. 721-9, Nov 1997. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427402> >.

PEIFER, M.; BERG, S.; REYNOLDS, A. B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 789-91, Mar 11 1994. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907279> >.

PERKINS, D. D.; DAVIS, R. H. *Neurospora* at the millennium. **Fungal Genet Biol**, v. 31, n. 3, p. 153-67, Dec 2000. ISSN 1087-1845 (Print) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273678> >.

PUMROY, R. A. et al. Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin alpha isoforms 3 and 7. **Structure**, v. 23, n. 2, p. 374-84, Feb 03 2015. ISSN 1878-4186 (Electronic) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599645> >.

SANKHALA, R. S. et al. Three-dimensional context rather than NLS amino acid sequence determines importin alpha subtype specificity for RCC1. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 979, Oct 17 2017. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29042532> >.

SCHEDLICH, L. J. et al. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. **J Biol Chem**, v. 275, n. 31, p. 23462-70, Aug 04 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811646> >.

SMITH, H. M.; HICKS, G. R.; RAIKHEL, N. V. Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. **Plant Physiol**, v. 114, n. 2, p. 411-7, Jun 1997. ISSN 0032-0889 (Print) 0032-0889 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9193081> >.

SMITH, K. M. et al. Structural Basis for Importin-alpha Binding of the Human Immunodeficiency Virus Tat. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1650, May 10 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490747> >.

SOROKIN, A. V.; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 72, n. 13, p. 1439-57, Dec 2007. ISSN 0006-2979 (Print) 0006-2979 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282135> >.

STEWART, M. Structural basis for the nuclear protein import cycle. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 701-4, Nov 2006. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052178> >.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 195-208, Mar 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287812> >.

STINNETT, S. M. et al. Aspergillus nidulans VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 242-55, Jan 2007. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163983> >.

TAKEDA, A. A. et al. Structural basis of importin-alpha-mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80. **J Mol Biol**, v. 412, n. 2, p. 226-34, Sep 16 2011. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806995> >.

TAKEDA, A. A. et al. Biophysical characterization of the recombinant importin-alpha from Neurospora crassa. **Protein Pept Lett**, v. 20, n. 1, p. 8-16, Jan 2013. ISSN 1875-5305 (Electronic) 0929-8665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789101> >.

TARENDEAU, F. et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 3, p. 229-33, Mar 2007. ISSN 1545-9993 (Print) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310249> >.

TEJOMURTULA, J. et al. Role of importin alpha8, a new member of the importin alpha family of nuclear transport proteins, in early embryonic development in cattle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 2, p. 333-42, Aug 2009. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420384> >.

TILBURN, J. et al. The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 779-90, Feb 15 1995. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882981> >.

TZFIRA, T. et al. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 187-219, 2000. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018128> >.

VIRGILIO, S. et al. Molecular Components of the Neurospora crassa pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161659, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27557053> >.

WIRTHMUELLER, L. et al. Probing formation of cargo/importin-alpha transport complexes in plant cells using a pathogen effector. **Plant J**, v. 81, n. 1, p. 40-52, Jan 2015. ISSN 1365-313X (Electronic) 0960-7412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25284001> >.

WU, W. et al. Synergy of two low-affinity NLSs determines the high avidity of influenza A virus nucleoprotein NP for human importin alpha isoforms. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11381, Sep 12 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28900157> >.

WU, W. W.; SUN, Y. H.; PANTE, N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. **Virology**, v. 4, p. 49, Jun 04 2007. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547769> >.

XU, W. et al. Ebola virus VP24 targets a unique NLS binding site on karyopherin alpha 5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 2, p. 187-200, Aug 13 2014. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121748> >.

YASHIRODA, Y.; YOSHIDA, M. Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 9, p. 741-8, May 2003. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678777> >.

YASUHARA, N. et al. Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-alpha. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 72-9, Jan 2007. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7159997> >.