

**MAPEANDO A SUPERFÍCIE DO NUCLEOSSOMO COM FINALIDADE  
TERAPÊUTICA**

**Brasília  
2017**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**MAPEANDO A SUPERFÍCIE DO NUCLEOSSOMO COM FINALIDADE  
TERAPÊUTICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**KAIAN AMORIM TELES**

**Brasília  
2017**

**KAIAN AMORIM TELES**

**MAPEANDO A SUPERFÍCIE DO NUCLEOSSOMO COM FINALIDADE  
TERAPÊUTICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

**Brasília  
2017**

**KAIAN AMORIM TELES**

**MAPEANDO A SUPERFÍCIE DO NUCLEOSSOMO COM FINALIDADE  
TERAPÊUTICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre

Aprovada em    de    de

Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas – UnB

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco – UCB

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves - UnB

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

Brasília-DF  
2017

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Guilherme Santos, que sempre me incentivou em buscar excelência no que fazemos. Por todas as conversas e conselhos regados de muito, muito café e me mostrar esse trabalho que eu amo.

A Bel, que foi quem me ensinou quase tudo necessário para fazer esse trabalho. Obrigado pela paciência e ensinamentos

A meus outros colegas do grupo cromatina, a Camyla, Wanessa, Vinícius, Paloma e todos os outros que passaram com a gente. Ainda temos muito chão pela frente.

A todos do Farmol, pelas ajudas nas dificuldades do dia a dia, especialmente para Mariella, por toda ajuda que me deu com as células. A Simone por todas as risadas. A Cíntia pelos sorrisos e bom humor. A Carol pela ajuda com o termociclador. A Fernandinha pela rede e pelo carinho. Aos colegas Henrique, Carolzinha, Sidney, Nara, Flora, Gleice, Érica, Bruna, Anna que me acompanharam durante todo esse tempo.

A toda equipe técnica do Farmol, Rilva e Luciano que sempre me ajudaram quando precisei.

A todos do ViroMol, especialmente a Vanessa pela ajuda com o FACS e aos professores Enrique e Gustavo Argañaraz que abriram as portas do laboratório para mim.

A todos os professores, Angélica Amorim, Francisco Neves, Djane Duarte, Marie Tagashi, Luiz Simeone, Fátima Borin, Michella Soares e Carine Roiter pelos ensinamentos e disponibilidade para ajudar.

As professoras Sônia Freitas e Amanda Souza pela ajuda com as análises de dicroísmo circular.

A professora Tatiana Borges pelo treinamento e ajuda com o FACS.

A minha namorada Bruna Bertulucci por todo suporte dado nesse projeto e me salvar mais vezes do que gostaria de admitir quando esquecia de comer. Além de estar sempre ao meu lado me ajudando e motivando. Eu te Amo.

A minha família e amigos que sempre me apoiaram e me deram forças para conseguir terminar.

Em especial aos meus pais, por todo amor e carinho. Sem vocês não teria conseguido.

Obrigado a todos que fizeram parte disso.

*"Experience is not what happens to  
you; it's what you do with what  
happens to you."  
Aldous Huxley*

## Sumário

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. O Nucleossomo</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Compactação da cromatina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3. O Patch ácido</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4. NBPs</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Nucleossomo como alvo terapêutico</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Finalidade terapêutica</b> .....	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivos Gerais</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Arranjo de DNA</b> .....	<b>21</b>
3.1.1 Transformação bacteriana .....	21
3.1.2. Extração plasmideal .....	22
3.1.3 Digestão plasmideal .....	23
3.1.4 Purificação de DNA de interesse .....	23
<b>3.2 Histonas</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3. Reconstituição do mononucleossomo</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4. Peptídeos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5. Dicroísmo circular</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6. Ensaio de Ligação</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7. Thermal shift</b> .....	<b>28</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Obtenção do arranjo de DNA Widom 601</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Reconstituição do mononucleossomo</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3. Peptídeos</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4. Dicroísmo Circular</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5. Ligação das NBMs com o nucleossomo</b> .....	<b>33</b>
<b>4.6. Thermal shift</b> .....	<b>33</b>
4.6.1 GMIP1 .....	36
4.6.2. Lana .....	37
4.6.3. Cauda da histona H4 .....	38
4.6.4. HMGN2 .....	40
<b>4.7. Mapa de sensibilidade</b> .....	<b>41</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>44</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

1,8-ANS	8-anilinaftaleno-1-ácido
Å	Angstrons
BAH	<i>Bromo-Associated Domain</i>
CENP-A	<i>Centrome Protein A</i>
CENP-C	<i>Centrome Protein C</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eNBMs	<i>Exogenous Nucleosome Biding Molecules</i>
GMIP1	<i>Genetic Modified Inducible Peptide 1</i>
GMIP1A	<i>Genetic Modified Inducible Peptide portion 1A</i>
GMIP1B	<i>Genetic Modified Inducible Peptide portion 1B</i>
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B
H3	Histona H3
H4	Histona H4
H4K16ac	Acetilação da Lisina 16 da Cauda da Histona H4
HAT	<i>Histona Acetil Transferase</i>
HDAC	<i>Histona deacetilase</i>
HMG2	<i>High Mobility Group Nucleosome biding protein 2</i>
HO	Octâmero de Histonas
IL-33	Interleucina 33
Kd	Constante de dissociação
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LANA	<i>LatencyAssociated Nuclear Antigen</i>
LB	Luria-Bertani
LH	<i>Linker Histona</i>
MNase	<i>Micrococcal Nuclease</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NBMs	Nucleosome Biding Molecules
NBPs	Nucleosome Biding Proteins
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
pb	Pares de base
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
PRC1	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
PTMs	Modificações pós traducionais
RCC1	<i>Regulator of Chromosome Condensation 1</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase</i>
SDS-PAGE	Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
Sir3	<i>Silent Information Regulator 3</i>
TAMRA	<i>tetranethylrhodamine</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
Tm	Temperatura de Melting
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral

## RESUMO

TELES, Kaian Amorim. Mapeando a superfície do nucleossomo com finalidade terapêutica. Brasília, 2016. Dissertação ( Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2016

A cromatina é uma estrutura fundamental para a fisiologia celular e pode ser regulada através de uma variedade de pequenas moléculas e proteínas que, em sua maioria, atuam em nível nucleossomal. A competição entre diferentes Proteínas Ligantes de Nucleossomo (NBPs) ajudam a definir o estado final da cromatina. Embora toda a superfície do nucleossomo seja alvo de diferentes NBPs, uma região conhecida como patch ácido é o alvo preferencial dessas moléculas. A fim de compreender como o impacto que NBPs tem sob o nucleossomo o ensaio de thermal shift foi feito para desvendar como diferentes NBPs afetam a estabilidade desse complexo. Foram utilizadas peptídeos baseados nas NBPs identificadas que se ligam aos nucleossomos conhecidos como Nucleosome Binding Molecules (NBMs). Foi observado que diferentes sítios de ligação que NBMs fazem com o patch ácido induzem diferentes desfechos na desnaturação do nucleossomo. Assim, foi possível criar um mapa das regiões vitais da superfície do nucleossomo responsável pela estabilidade do complexo utilizando os dados estruturais (PDB) do nucleossomo:NBPs, que futuramente pode ser utilizado para o desenho racional de fármacos.

**Palavras-Chave:** Nucleossomo, Thermal shift, NBPs.

## ABSTRACT

TELES, Kaian Amorim. Mapeando a superfície do nucleossomo com finalidade terapêutica. Brasília, 2016. Dissertação ( Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2016

The chromatin is a fundamental structure for the cell physiology. It can be regulated through a variety of small molecules and proteins, most of which acting at a nucleosomal level. The competition among Nucleosome Binding Proteins (NBPs) binding help to define the final chromatin architecture. Although the entire nucleosome surface has been explored by several NBPs, a region known as the acidic patch is at the preferable target. In order to understand how the NBPs impact the nucleosome, thermal shift assay was conducted to understand how different NBPs influence over the stability of the complex. We used peptides based on the structure of NBPs known as Nucleosome Binding Molecules (NBMs). We were able to identify binding sites that NBMs interact with the acidic patch and induce several denaturation outcomes of the nucleosome. Herein it was possible to create a map of the vital regions of the surface of the nucleosome responsible for the stability of the complex, using structural data (PDB) of the nucleosome:NBPs, that in the future can be used in rational drug design.

**Keywords:** Nucleosome, NBPs, Thermal shift.

## INTRODUÇÃO

O processo de regulação e manutenção do genôma é complexo e vai muito além da sequência de nucleotídeos que compoem o DNA. Já são conhecidas diversas proteínas que interagem com o DNA e causam alterações na expressão gênica da célula. Porém, torna-se importante ressaltar que o material genético de células eucarióticas apresentam-se na forma de cromatina. Esse complexo formado por DNA e proteínas tem o papel de empacotar todo o material genético dentro do núcleo, como também permitir ou bloquear o acesso da maquinária transcricional basal ao DNA.

### 1.1. O Nucleossomo

A cromatina é formada por unidades repetitivas de nucleossomos, que por sua vez são formadas por um octâmero de proteínas altamente básicas conhecidas como histonas. Estas se arranjam na forma de um tetrâmero (H3/H4) de dois heterodímeros (H2A/H2B). Esse complexo protéico em forma de disco se mantém unido quando 145-147 pares de base (pb) DNA faz 1,7 voltas em sua circunferência, fazendo diversas interações com os resíduos de arginina e lisina presentes no domínio globular das histonas com o arcabouço de fostato do DNA (Figura 1) (Luger *et al.*, 1997).

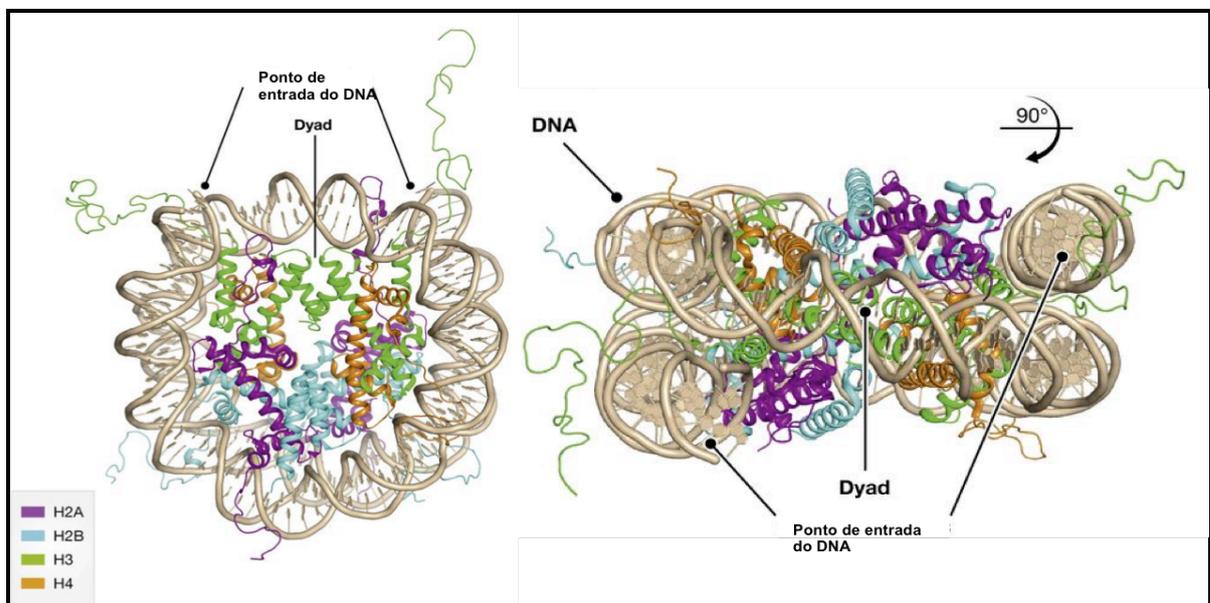


Figura 1. Estrutura cristalográfica do nucleossomo com suas proteínas destacadas. Adaptado de Speranzini *et al.*, 2016.

O nucleossomo é considerado a primeira barreira transcricional, sendo um elemento regulatório da expressão gênica (Bintu *et al.*, 2012). Tal característica resulta da

região N-terminal das histonas, conhecidas como caudas e apresentam papel fundamental na dinâmica de toda cromatina (Horn e Peterson, 2002). Essa região é alvo de diversas modificações pós-traducionais (PTM) que induzem diversos desfechos na dinâmica da cromatina, sendo, a mais bem caracterizada, a acetilação da lisina 16 da histona H4.

Essa PTM é feita pela enzima Histona Acetil Transferase (HAT), quando essa reação ocorre a cromatina encontra-se descompactada, visto que o processo de compactação envolve a cauda da histona H4 fazer contato o nucleossomo adjacente. Quando a acetilação ocorre a neutralização da carga positiva da lisina, enfreqüecendo essa interação. Por outro lado a enzima Histona Deacetilase (HDAC) realiza o processo inverso, promovendo a compactação (Marmorstein e Roth, 2001). A dinâmica que a cromatina apresenta tem efeitos significativos na fisiologia da célula. Por esse motivo, já foram exploradas diversas epi-drugs (fármacos que atuam em nível epigenético) para a regulação de variados distúrbios, câncer, até transtornos psiquiátricos (Monneret, 2007; Fuchikami *et al.*, 2016).

Existem outras formas em que o nucleossomo pode regular a expressão gênica, pois mesmo com a fibra na forma relaxada o nucleossomo é uma barreira para a maquinária transcricional basal. Sendo assim, torna-se necessário que ocorra uma regulação do posicionamento de nucleossomos como visto na Figura 2. Essa ação é mediada na maioria das vezes por proteínas com características ácidas, conhecidas como chaperonas (Laskey *et al.*, 1978).

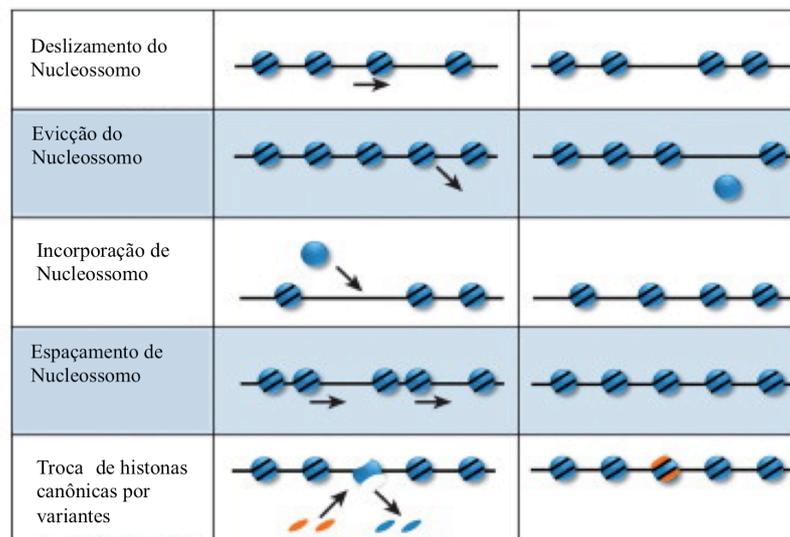


Figura 2. As diversas formas de reposicionamento de histonas e nucleossomos ao longo do DNA.  
Adaptado de Petty e Pillus, 2013

## 1.2 Compactação da cromatina

Em humanos a cromatina é capaz de organizar mais de 6 bilhões de pares de base

dentro de núcleo das células diplóides (Annunziato, 2008), em virtude da existência de diferentes níveis hierárquicos de compactação (Figura 3).

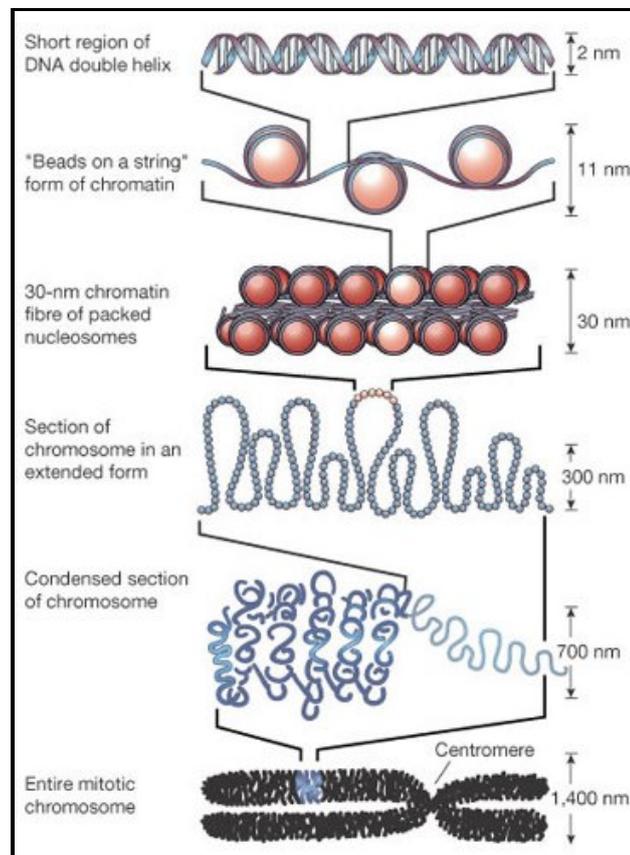


Figura 3: Compactação da cromatina em eucariotos. Níveis sucessivos de compactação são mostrados, partindo do DNA livre, passando pelas fibras de 10nm e 30 nm, até alcançar níveis máximos de compactação, representado pelo cromossomo. Retirado de Felsenfeld e Groudine, 2003.

Sua primeira forma de compactação é conhecida como eucromatina, ou colar de contas. A referida estrutura apresenta uma espessura de 10nm e é considerada a forma permissiva da cromatina, visto que existem regiões com DNA livre. Devido a interações internucleossomais, a cromatina pode se condensar mais, adotando a forma de heterocromatina, que por sua vez é conhecida como a forma silenciada da cromatina, pois todo seu DNA se encontra condensado, cuja estrutura tem 30nm de espessura (Bassett *et al.*, 2009).

Assim, a cromatina pode ser considerada a primeira barreira transcricional a ser superada pela maquinária transcricional da célula. A compreensão profunda das formas pelas quais a dinâmica da cromatina é afetada, apresenta-se fundamental para o conhecimento de diversos processos da fisiologia celular. As formas conhecidas da regulação da cromatina são (Barbera *et al.*, 2006; Makde *et al.*, 2010; Armache *et al.*, 2011):

- A presença de  $Mg^{2+}$  e outros íons divalentes que induzem a neutralização de cargas compactando a fibra.
- A linker histona (LH), uma histona não pertencente ao octâmetro que atua como um grampo na cromatina.
- A cauda da histona H4.
- NBPs (Nucleosome Biding Proteins), proteínas que se ligam à cromatina induzindo desfechos específicos.

### 1.3. O Patch ácido

O Patch ácido é uma pequena região na superfície do nucleossomo, composta somente por 8 aminoácidos com características ácidas, localizada entre as histonas H2A e H2B, formando um sulco com aproximadamente 368 angstroms de área, capaz de acomodar diferentes motivos protéicos (Figura 4) (Kalashnikova *et al.*, 2013). Essa região tem o importante papel de mediar o contato internucleossomal pois é no patch ácido que a cauda não acetilada da histona H4 faz contato com o nucleossomo adjacente (Luger *et al.*, 1997).

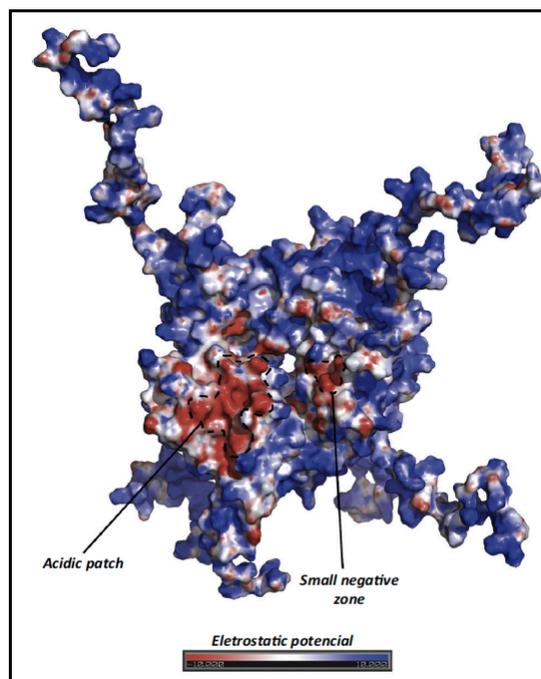


Figura 4. Potencial eletrostático da superfície do nucleossomo. Em azul potencial positivo e em vermelho potencial negativo, circulado em preto duas regiões negativas da superfície nucleossomal, o patch ácido e small negative zone. Adaptado de Silva., *et al* 2015.

Foram identificadas proteínas com atividade modeladora de nucleossomo e, interessante, quase todas interagem com o patch ácido. Tais proteínas conhecidas como NBPs (Nucleosome Biding Proteins) induzem diferentes desfechos na arquitetura da

cromatina (Silva *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que o reconhecimento molecular dessa NBP com o patch ácido apresenta uma "ancoragem" de argininas, visto que todas as estruturas cristalográficas disponíveis até hoje demonstraram esse fenômeno (Mcginty *et al.*, 2014).

#### 1.4. NBPs

Até o momento, foram identificadas por cristalografia, criomicroscopia, simulação computacional ou RMN 11 estruturas de NBPs interagindo com nucleossomo. A Figura 5 traz as interações de algumas dessas proteínas com o patch ácido:

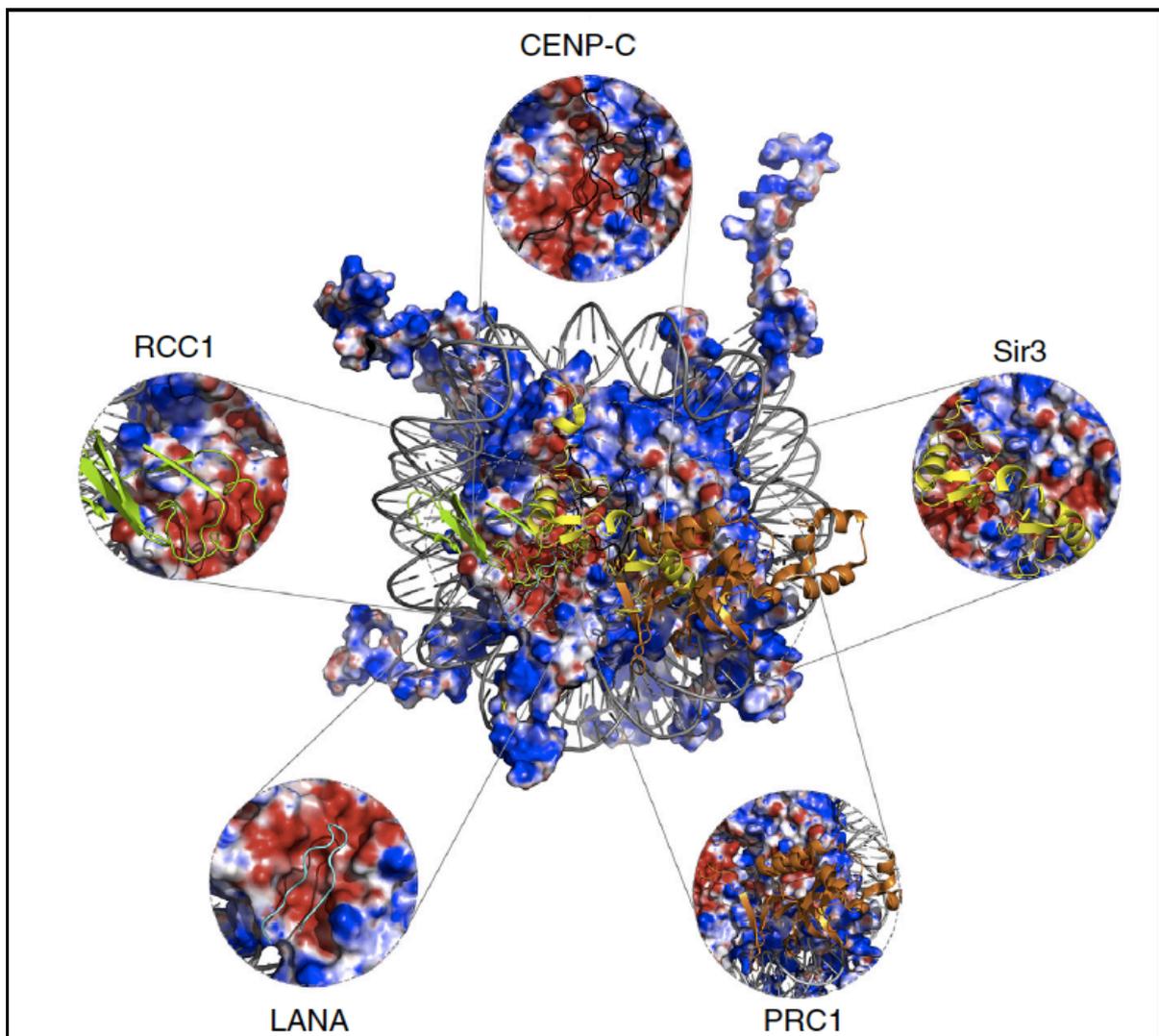


Figura 5. Superfície do nucleossomo em interação com diversas NBPs, todas proteínas fazem interações com o patch ácido. Adaptado de Cabral *et al.*, 2016

A primeira NBP identificada foi o Lana ou Latency-Associated Nuclear Antigen presente no Sarcoma de Kaposi Associado ao Herpes Virus (KSHV). Essa NBP é uma proteína com 1162 aminoácidos e contém três domínios, uma porção C-terminal, que interage com outras proteínas, um domínio central e a porção N-terminal que apresenta um sinal de

localização nuclear (NLS) (Piolot *et al.*, 2001). Demonstrou-se que a porção N-terminal interage com o patch ácido, sendo que essa região, composta por 23 aminoácidos foi co-cristalizada com o patch ácido em uma resolução de 2,9 Å (Barbera *et al.*, 2006).

Em 2007 Carrie e colaboradores identificaram que a interleucina 33 (IL-33) se ligava à cromatina, porém somente um ano depois e utilizando técnicas de modelagem molecular foi possível identificar que a IL-33 tem um modo de ligação semelhante ao do Lana (Roussel *et al.*, 2008).

A primeira proteína intacta identificada a fazer interação com o nucleossomo foi o Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1), essa proteína está envolvida nos processos mitose e transporte de macromoléculas. Sua estrutura terciária consiste de um domínio  $\beta$ -porpeller composto por sete folhas beta e uma porção N-terminal (Renault *et al.*, 1998). Diferentemente dos peptídeos anteriores que interagem exclusivamente com o patch ácido, essa proteína tem dois sítios de ligação, um que interage com o DNA nucleossomal e outro no patch ácido (Makde *et al.*, 2010).

Outra NBP identificada pertence a família de proteínas Sir (Silent Information Regulator), mais especificamente o Sir 3, porém de forma incompleta, somente o domínio BAH (Bromo-Associated Homology) foi co-cristalizado com o nucleossomo. Essa NBP faz diversas interações, não somente no patch ácido (Armache *et al.*, 2011).

O complexo SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) é o maior complexo de acetil transferase identificado até hoje, cujo papel está na ativação de genes envolvidos no estresse em fungos (Koutelou *et al.*, 2010). Tal complexo forma-se por 19 subunidades, sendo que a DUB (responsável por realizar a deubiquitinação da histona H2B) foi co-cristalizada com o nucleossomo (Henry *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2016).

As proteínas HMGN (High Mobility Group Nucleosome Biding Proteins) tem a capacidade de deslocar a histona H1 da cromatina, induzindo um estado relaxado da fibra e aumentando a atividade transcricional. Identificou-se uma sequência de peptídeos da proteína HMGN2, que interage com o DNA nucleossomal, a região globular das histonas, o patch ácido e a região da dyad do nucleossomo (Kato *et al.*, 2011). Constatou-se que um peptídeo dessa proteína tem capacidade de induzir apoptose de diferentes células tumorais e regular positivamente a expressão de genes antioncogênicos, porém seu mecanismo de ação ainda requer elucidação (Hu *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2014).

Em regiões centroméricas dos cromossomos existem histonas variantes, como a CENP-A (Centromere Protein A), que ocupa a posição da histona H3. Foi com um

nucleossomo não canônico que um peptídeo da proteína CENP-C (Centromere Protein C) foi co-cristalizado com o nucleossomo e tornou-se possível visualizar as interações desse peptídeo com a CENP-A e com o patch ácido (Kato *et al.*, 2013).

O Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) é um complexo de três proteínas que fazem interações com diversas regiões no nucleossomo, porém o patch ácido aparenta ser fundamental para a manutenção dessas interações (Mcginty *et al.*, 2014).

Recentemente, uma proteína do citomegalovírus humano, IE1 (Immediate Early 1) foi co-cristalizada com o nucleossomo. Essa proteína interage com a cromatina condensada durante a mitose bloqueando outras interações internucleossomais e dificultando a condensação (Fang *et al.*, 2016).

Diferentemente de todas outras NBPs identificadas anteriormente, foi observado por criomicroscopia que o remodelador de cromatina o Snf2 (switch/sucrose non-fermentable) não se liga ao nucleossomo na região do patch ácido. Esse NBP faz diversas interações com a histona H4 e DNA nucleossomal (Liu *et al.*, 2017).

Uma outra proteína viral foi identificada fazendo interações com o nucleossomo. A proteína GAG do prototipo foamy virus (PFV) se liga ao patch ácido de maneira semelhante ao Lana (Lesbats *et al.*, 2017).

### 1.5 Nucleossomo como alvo terapêutico

Dentre as formas conhecidas de regulação da arquitetura da cromatina, três têm o nucleossomo como componente chave nesse processo, sendo que dois desses (cauda da H4 e NBPs) apresentam o patch ácido como um dos fatores fundamentais na regulação. Assim sendo, em 2015 o professor Guilherme Santos propôs tratar a superfície do nucleossomo como um novo alvo terapêutico, dado seu papel central na regulação gênica (Silva *et al.*, 2015).

Em 2013, foi proposto um modelo no qual diferentes moléculas ligantes de nucleossomo e à cauda da histona H4 podem modular a estrutura da cromatina. No referido modelo, a ausência de NBPs promove a compactação da cromatina, visto que a cauda da histona H4 pode interagir no nucleossomo adjacente. Caso o patch ácido se encontre livre da cauda da histona H4, a conformação induzida é de relaxamento da fibra, já que a grande concentração de cargas nessa região induz a repulsão entre os nucleossomos. Nesse modelo o estado da cromatina depende da concentração de diferentes NBPs para induzir uma mudança

conformacional na estrutura da cromatina (Kalashnikova *et al.*, 2013).

Com base no modelo acima apresentado pelo grupo do professor Guilherme Santos (Silva *et al.*, 2015), o nucleossomo possui uma dinâmica de equilíbrio semelhante a de uma droga/receptor clássica (Figura 6), sendo o patch ácido o principal sítio de ligação de eNBMs (exogenous Nucleosome Biding Molecules). Tais moléculas e suas interações poderiam induzir quatro desfechos específicos:

- Condensação clássica: a cromatina apresentaria a condensação referente quando a cauda da histona H4 interage com o patch ácido do nucleossomo vizinho.
- Condensação específica: a cromatina estaria em sua forma condensada, porém diferente de quando ela se condensa devido à interação da cauda da histona H4.
- Relaxamento clássico: a cromatina estaria em sua forma relaxada, semelhante quando ocorre a acetilação da lisina 16 da cauda de histona H4 (H4K16ac) .
- Relaxamento específico: a cromatina se apresentaria na sua forma descondensada, porém com arquitetura diferente da H4K16ac.

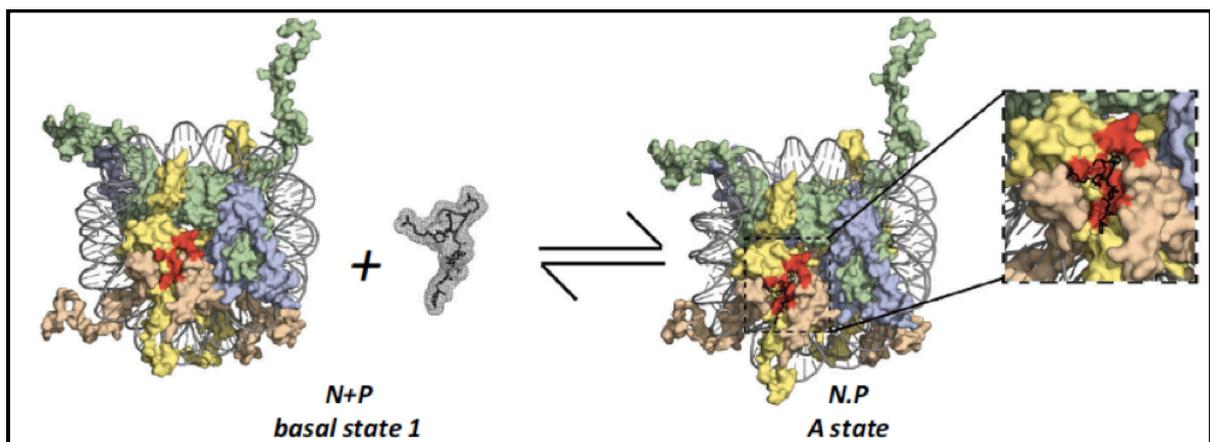


Figura 6. O nucleossomo e NBM lana e sua cinética de equilíbrio. Em verde a histona H3, azul H4, amarelo H2A, bege H2B, cinza o DNA e em vermelho o patch ácido. Retirado de Silva., *et al.* 2015

Na tentativa de identificar um composto capaz de deslocar o NBP Lana do patch ácido e desse modo inibir a ação de latência do KSVH, um grupo da Universidade Harvard construiu uma grande biblioteca de 350.000 pequenas moléculas. Entretanto, nenhuma desta moléculas foi capaz de deslocar o Lana. Conforme citado na conclusão dos autores, acredita-se que moléculas mais complexas, como peptídeos, seriam necessárias para promover este deslocamento (Beauchemin *et al.*, 2014).

Para a utilização de peptídeos como drogas, pensando ainda em uma molécula que

tenha acesso ao núcleo celular, faz-se necessário enfrentar alguns desafios, como por exemplo a penetração celular e degradação protéica. Já é conhecida uma classe de pequenos (máximo 30 aa) peptídeos com cargas positivas, *Cell penetrating peptides (CPP)*, que possuem as características de alta penetrabilidade celular (Bechara e Sagan, 2013). Tais peptídeos apresentam a capacidade de cruzar membranas celulares, possibilitando alcançar o núcleo celular e apresentam toxicidade baixa, alta seletividade e eficácia (Fosgerau e Hoffmann, 2015).

Os peptídeos NBMs (Nucleosome Biding Molecules) apresentam cargas positivas que interagem com o patch ácido, e seus tamanhos não ultrapassam 30 aminoácidos. Estas características coincidem com os CPPs, sugerindo assim que os NBMs também poderiam entrar diretamente na célula, sem exigir carreadores específicos

Em resumo, os peptídeos NBMs aparentam ser a melhor opção para ligantes da superfície do nucleossomo como estratégia terapêutica.

#### 1.6 Finalidade terapêutica

A compreensão de como um receptor farmacológico se comporta em presença de um ligante é de grande importância para definir seu mecanismo de ação além de explicar outros parâmetros farmacológicos, assim a prática de diversos estudos estruturais desses receptores são conduzidos frequentemente (Sridharan *et al.*, 2014).

O nucleossomo foi proposto como um novo alvo farmacológico (Silva *et al.*, 2015), e como ele se comporta na presença de diferentes ligantes ainda é desconhecido, além disso não se sabe quais os efeitos que diferentes ligantes podem causar no organismo. Portanto identificar sítios críticos para a estabilidade do nucleossomo e quais regiões desse complexo são mais afetadas por diferentes ligantes é de grande importância para compreender os desfeitos clínicos que serão observados no futuro quando diferentes NBMs serão testadas *in vivo*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

O objetivo principal do trabalho é entender como diferentes NBMs afetam a estrutura de nucleossomo. Baseado nas estruturas dos NBMs e suas formas de interação com o nucleossomos, objetivou-se criar um mapa de sensibilidade da superfície do nucleossomo.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Obter sequências de DNA widom 601 com 167pb;
- Reconstituir mononucleossomo *in vitro*;
- Verificar a ligação de diversos NBMs com o nucleossomo *in vitro*;
- Analisar a estabilidade térmica do Nucleossomo em presença de diferentes peptídeos NBMs.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Arranjo de DNA

Com o propósito de realizar ensaios bioquímicos e estruturais foi necessário a reconstituição do mononucleossomo, sendo indispensável a obtenção de DNA para reconstituir o complexo. Utilizou-se a sequência Widom601, DNA que contém alta afinidade para a formação do nucleossomo (Lowary e Widom, 1998), cuja sequência permite obter uma correta estequiometria de HOs ligadas ao DNA. Assim sendo, o plasmídeo pUC18 contendo a sequência 167.80, ou seja, 147pb + 20pb de linker DNA, repetido 80 vezes, foi digerido usando a enzima de restrição AVA I (New England Biolabs), assim por plasmídeo (Figura 7) digerido, obteve-se 80 fragmentos de DNA de interesse (Routh *et al.*, 2008).

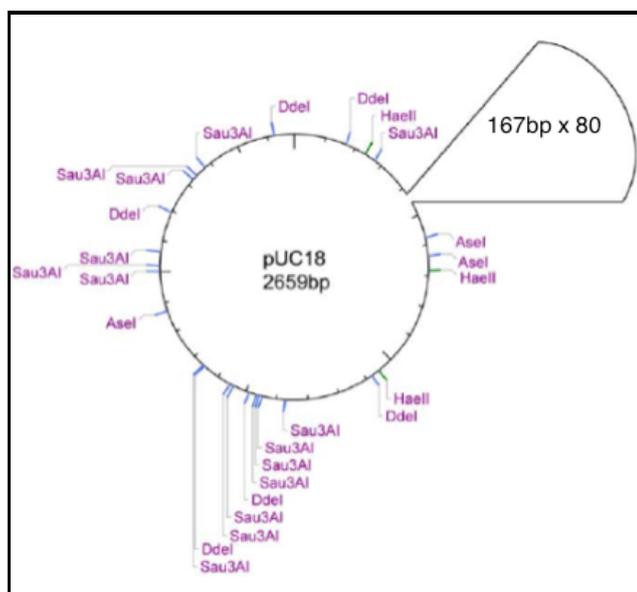


Figura 7. Esquema do plasmídeo pUC18 para obtenção do DNA widom 601. Retirado de Routh *et al.*, 2009

#### 3.1.1 Transformação bacteriana

O plasmídeo utilizado foi cedido pela pesquisadora Dra. Daniela Rhodes, do Laboratório de Biologia Molecular em Cambridge, Inglaterra. Para a transformação, foram utilizadas cepas DH5 $\alpha$  e a metodologia de choque térmico para inserção do plasmídeo na bactéria (Protocolo de Técnicas de Biologia Molecular do Laboratório de Farmacologia Molecular). Após esse procedimento, realizou-se a adição de uma colônia transformada em

100µL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e incubação a 37<sup>o</sup>C por 30 minutos, sob agitação constante, para replicação das bactérias. A seleção das bactérias transformadas (contém o gene de resistência a ampicilina) foi feita através do plaqueamento de 50µL do tubo da solução anterior em placa contendo meio LB. sólido com 0,1mg/mL de ampicilina por 12 horas a 37<sup>o</sup>C.

Uma colônia resistente a ampicilina foi coletada e inoculada em 5mL de meio de cultura LB contendo 60mg/mL de ampicilina (incubado a 37<sup>o</sup> sob agitação constante) por oito horas. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um erlenmeyer contendo 2L de meio LB com ampicilina (mesma concentração usada anteriormente) e incubou-se novamente a 37<sup>o</sup> sob agitação constante, por 12 horas.

### 3.1.2. Extração plasmideal

As bactérias foram palletadas por centrifugação e realizado o protocolo de max preparação plasmideal do Labortório de Farmacologia Molecular. Em síntese, o protoco consiste em:

1. Palletar as bactéria que foram obtidas na etapa anterior (3.1.1.);
2. Retirar sobrenadante e adicionar tampão osmótico (50mM glucose, 25mM tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) e resuspender o pellet e adicionar liozina;
3. Adicionar tampão de lise (0,2M NaOH e SDS 1%), homogenizar e incubar;
4. Adicionar tampão de neutralização (5M de acetato de potássio e ácido acético glacial 11,5%) homogenizar;
5. Centrifugar e filtrar sobrenadante em gaze e adicionar isopropanol;
6. Centrifugar e descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em de água destilada;
7. Adicionar acetato de amônio 5M e homogenizar;
8. Centrifugar e transfirir o sobrenadante para outro tubo, adicionar de etanol absoluto gelado incubar a temperatura ambiente;
9. Centrifugar e descartar o sobrenadante e resuspender o pellet em 4 água destilada e adicionar e adicionar RNase e inchar a 37<sup>o</sup>C por uma hora;
10. Adicionar PEG 30% + 1,5M de NaCl e incubar overnight na geladeira;
11. Centrifugar e ressuspender o pellet em 400uL de água miliQ;
12. Adicionar 1 volume de fenol pH 8.0 e agitar;
13. Centrifugar e retirar a primeira fase, adicionar meio volume de fenol e meio volume de clorofórmio.

14. Agitar, centrifugar e retirar a primeira fase;
15. Adicionar um volume de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1, agitar e centrifugar e retirar a primeira fase;
16. Adicionar 1/10 do volume de acetato de sódio pH 5.2 e um volume de isopropanols absoluto gelado e incubar a -20°C;
17. Centrifugar e lavar o pellet com etanol absoluto gelado;
18. Ressuspender o pellet em água MiliQ e quantificar por espectrofotometria.

### 3.1.3 Digestão plasmideal

A fim de obter a digestão do plasmídeo, foi utilizada a enzima de restrição AVA I (New England Biolabs). O construto do plasmídeo apresenta sítios de restrição a cada 167pb para essa enzima (na região de inserto do DNA widom601). Antes de realizar a digestão, foi necessário quantificar o plasmídeo extraído utilizando o equipamento nanovue (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, a quantia de 2g de plasmídeo foi utilizado para a digestão e 0,7 unidades de enzima para cada ug de DNA foram incubadas a 37°C overnight nas condições descritas pelo fabricante. Foi feito um gel de agarose 1% a fim de assegurar se a digestão ocorreu corretamente.

### 3.1.4 Purificação de DNA de interesse

Após a digestão obteve-se dois fragmentos de DNA, o esqueleto do plasmídeo com aproximadamente 2000pb e o DNA de interesse com 167pb, assim fez-se necessário a remoção de esqueleto plasmideal. Utilizou-se a técnica de precipitação com PEG 6000 (Polietilenglicol 6000) que facilita a precipitação de longos fragmentos de DNA (esqueleto) enquanto fragmentos menores continuam em solução. A solução de DNA digerida teve sua concentração ajustada para 100ng/mL, pois foi constatado que soluções diluídas de DNA facilitam precipitação do esqueleto do plasmídeo por PEG. Desse modo, uma solução de PEG 6000 e NaCl 2,5M foi adicionada à solução de DNA (4,5% de PEG) e incubada por 10 minutos a 4°C e, em seguida, foi centrifugada por 10 minutos a 4°C a 12,000 RPM. O sobrenadante foi separado com o uso de uma micropipeta e o pellet ressuscitado em água destilada. Um gel de agarose 1% foi corrido para averiguar se a purificação ocorreu. Caso ainda possuísse DNA do esqueleto do plasmídeo, 0,5% de PEG seria adicionado e o processo

repetido, até que o sobrenadante não apresentasse mais traços do esqueleto.

Após a averiguação de que o DNA estava sem mais contaminantes, realizou-se o protocolo de purificação de fenol/clorofórmo do Laboratório de Farmacologia Molecular, o DNA foi ressuspensionado em água Mili-Q e teve sua concentração determinada pelo nanovue, sendo, em seguida, ajustada sua concentração para 1 $\mu$ g/ $\mu$ L.

### 3.2 Histonas

As histonas utilizadas em todos os ensaios bioquímicos foram obtidas pelo professor Guilherme Santos no Laboratório de Biologia Molecular do MRC (*Medical Research Council*). As histonas foram purificadas de eritrócitos de galinhas, o protocolo seguido foi descrito por (Routh *et al.*, 2008). Em resumo o protocolo consistiu em:

1. Lavagem e separação de eritrócitos de galinha por centrifugação;
2. Lise dos eritrócitos com tampão de lise para a separação dos núcleos intactos;
3. Lise do núcleo e digestão com MNase (Micrococcal Nuclease) para formação de longos fragmentos de cromatina;
4. Purificação dos fragmentos de cromatina em coluna de Sepharose 4B-Cl;
5. Os fragmentos de cromatina foram concentrados e ressuspensionados em tampão 3M de NaCl. Assim o DNA dissocia do HO, porém as histonas não se dissociam entre si, mantendo o HO intacto,
6. Purificação com coluna de hidroxiapatita, removendo o DNA;
7. Purificação com coluna Superdex 200 para remoção de histonas livres;
8. Armazenamento do HO em glicerol 50% (agente crioprotetor) a -20°C

Apesar das histonas terem sido extraídas em 2011, sua integridade não foi alterada, como visto na Figura 8.

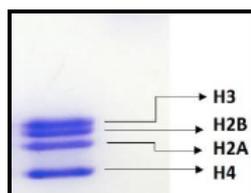


Figura 8. Gel de poliacrilamida 15% corado com cromassie blue para a confirmação da integridade das histonas utilizadas nos ensaios bioquímicos.

### 3.3. Reconstituição do mononucleossomo

Para reconstituição *in vitro* do mononucleossomo, foi utilizado o protocolo (Huynh *et al.*, 2005). Primeiramente, em tubos de centrífuga siliconizados de 1,5mL é adicionado 1 $\mu$ g de DNA widom 601 a 1 $\mu$ g/ $\mu$ L com 167pb, em seguida quantidades variantes de um tampão de reação (Tabela 1) contendo 2M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4 e 1,5mM EDTA. Em seguida o HO é adicionado em quantidades crescentes, a fim de determinar a quantidade ótima de HO para a reconstituição. Caso seja utilizado pouco HO, será formado pouco nucleossomo, deixando DNA livre em solução e caso muito HO seja utilizado, ocorrerá a complexação com o nucleossomo formando um precipitado.

Tabela 1. Exemplo de titulação de HO retirado de Silva, 2013

Amostra	Concentração ( $\mu$ g/ $\mu$ L)	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA 167	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HO	1-5	0	2	4	6	8	10	12	14
Tampão de reação	-	79	77	75	73	71	69	67	65

Com essa titulação é possível determinar a quantidade ideal de HO para obter a maior quantidade de nucleossomo possível, com um mínimo de DNA livre sem que ocorra a formação de precipitado. Em seguida, os tubos foram centrifugados utilizando uma centrífuga de bancada, Minispin. Posteriormente, o conteúdo dos tubos foram transferidos para tubos de vidro siliconizados e sua extremidade coberta com uma membrana de diálise com o cutoff de peso molecular (MWCO) de 3-7 kDa (*Snake Skin Pleated Dialysis Tubing* – Thermo Scientific) e centrifugados novamente para fazer com que a solução entrasse em contato com a membrana de diálise. Em seguida, foram transferidos para um saco de diálise feito da mesma membrana com 30mL da solução tampão já descrita. O saco de diálise foi transferido para um becker de 4L contendo 10mM TrisA-HCl pH 7.4 e 1mM EDTA, e deixados sob agitação lenta a 4°C para que a diálise ocorresse (Figura 9).

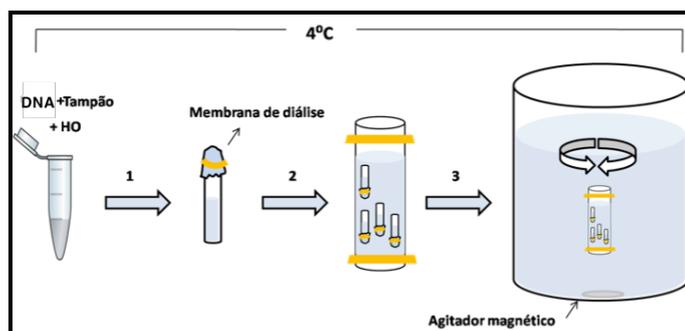


Figura 9. Esquema de reconstituição do mononucleossomo por diálise lenta de sal. Adaptado de Silva, 2013

As duas barreiras da diálise e a agitação moderada são essenciais para que ocorra uma diálise lenta, o que promove a ligação do octâmero de histonas, de forma organizada e preferencial aos sítios com forte posicionamento de nucleossomos do DNA 601. Após a total diálise, o sistema encontra-se em equilíbrio, com todos os ambientes com a mesma concentração de sal (aproximadamente 15mM de NaCl) (Figura 10). Cada tubo de diálise fornecia 80uL de mononucleossomos na concentração de 0,4μM.

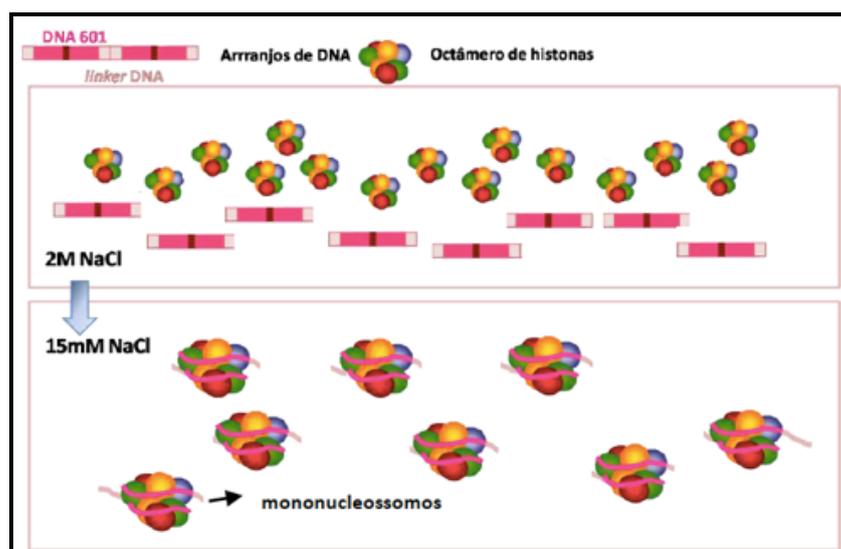


Figura 10. O processo da diálise lenta e reconstituição do mononucleossomo *in vitro*. Adaptado de Silva, 2013

Para verificar se a reconstituição ocorreu corretamente, foi feito um gel de acrilamida 6% não denaturante com 10% do volume de cada amostra e corrido em TBE 1X, (Tris, ácido bórico e EDTA) corado com brometo de etídeo e visualizado no fotodocumentador Amersham 600 Imager no modo transiluminação UV.

### 3.4. Peptídeos

Para os ensaios envolvendo NBMs, as sequências de aminoácidos co-cristalizada com o nucleossomo foram encomendadas das empresas PepMics e Fastbio LTDA, essas sequências de aminoácidos estão descritas na Tabela 2. Foram encomendados também peptídeos com marcação na região N-terminal do fluoróforo TAMRA (ex/em 546/579). Todos os peptídeos foram diluídos em água Mili-Q com sua concentração ajustada para 5mM. Aliquotas na concentração de 2,6mM foram feitas e estocadas a 4°C. O estoque a 5mM foi estocado a -20°C.

Tabela 2. Lista de peptídeos utilizados com suas características básicas.

Nome	Lana	Lana Fluorescente	H4 tail	H4 tail Fluorescente	GMIP1	GMIP1 Fluorescente	GMIP 1A	GMIP 1B	HGMN 2	HGMN 2 Fluorescente
Tamanho	2.2kDa	2.6kDa	2.2kDa	2.6kDa	2.2kDa	2.6kDa	0.700kDa	1.3kDa	2.7kDa	3.1kDa
Sequência	MAPPGMRLRSGR STGAPLTRGS	(TAMRA)MAPPG MRLRSGRSTGAPL TRGS	RGKGGKGLGKGG AKRHRKVLRL	(TAMRA)RGKGGK GLGKGGAKRHRK VLR	LSERSISGEGRRAA AKARTII	(TAMRA)LSERSIS GEGRRAAAKARTII	KARTII	LSERSISGEGRR	EPQRRSARLSAKP APPKPEPKPKK	(TAMRA)EPQRRS ARLSAKPAPPKPE PKPKK
Empresa	PepMics	PepMics	FASTBIO LTDA	FASTBIO LTDA	PePMics	PePMics	PePMics	PePMics	FASTBIO LTDA	FASTBIO LTDA
Ponto isoelétrico	12.48	12.48	12.32	12.32	11.54	11.54	10.61	10.22	11.12	11.12

### 3.5. Dicroísmo circular

A determinação da estrutura secundária das NBMs foram feitas no equipamento Jasco J-815 cd spectrophotometer utilizando cubeta de quartzo, 150uL das amostras de peptídeos nas concentrações de 100µM ou 200µM em 5mM de tris pH 7,4 a 25°C. O software Spectra manger foi programado para realizar três varreduras dos comprimentos de onda 260nm até 190nm e realizar a média das medições. A linha de base foi subtraída e a plataforma online CAPITO (<http://capito.nmr.leibniz-fli.de/>) foi utilizada para analisar os espectros obtidos .

### 3.6. Ensaio de Ligação

A fim de verificar a capacidade de ligação dos peptídeos NBM ao nucleossomo, foram utilizados NBMs com um fluoróforo (TAMRA), que apresenta um comprimento de onda (577nm). Utilizou-se o equipamento Amersham Imager 600. O ensaio foi feito da seguinte maneira;

1. 14uL de mononucleossomo incubado por 2 horas com 1uL do NBM na concentração final de 10 ou 1μM;
2. 5uL de tampão de corrida (20% glicerol, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1% *bromophenol blue*) adicionados à solução de nucleossomo/NBM;
3. Gel de poliacrilamida não denaturante 6% é corrido em tampão TBE 1x por 50 minutos;
4. Visualizado no fotodocumentador Amersham Imager 600 RBG no modo transiluminação com o laser verde selecionado;
5. O gel é corado com brometo de etídeo e revelado no foto documentador Amersham Imager no modo transiluminação UV;
6. As duas imagens são sobrepostas para verificar a colocação das bandas.

### 3.7. Thermal shift

Para essa análise, utilizou-se a metodologia desenvolvida por (Taguchi *et al.*, 2014). Resumidamente, foi utilizado MicroAmp® Fast Reaction Tubes da Applied Biosystems, onde 14,5uL de mononucleossomo foi incubado por 30 minutos com 1,5uL do NBM em diversas concentrações de interesse por 30 minutos, em seguida, 2uL de DTT (Ditiotreitol) (Sigma Aldrich) na concentração final de 1mM e 2uL de sonda Sypro Orange (ThermoFisher Scientific) na concentração final de 5X é adicionado e levados até o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Uma rampa de temperatura é feita, como visto na Figura 11. A raw data obtida é normalizada utilizando o software GraphPad Prism 6 e feita a primeira derivada das curvas de desnaturação para determinação do T<sub>m</sub>. Todas as análises foram repetidas no mínimo duas vezes em duplicata.

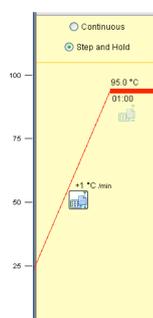


Figura 11. Rampa de desnaturação térmica feita para análise de termo estabilidade do mononucleossomo/NBM

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção do arranjo de DNA Widom 601

O plasmídeo foi transformado, extraído, purificado e digerido com sucesso (Figura 12).

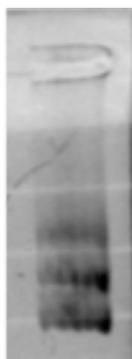


Figura 12. Plasmídeo pUC 18 com 3 isoformas distintas, visualizado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo

A seguir foi feita a purificação com PEG 6000 para isolar o esqueleto do plasmídeo do DNA de interesse, esse processo foi repetido até que fosse possível visualizar somente uma banda no gel de agarose 0,7% (Figura 13).

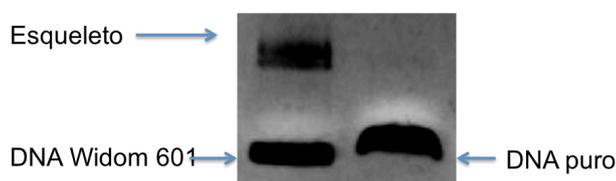


Figura 13. Purificação do DNA de interesse em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo.

### 4.2 Reconstituição do mononucleossomo

Para obtenção de mononucleossomos, foi utilizado o DNA 601 (descrito acima) e HO de eritrócitos de galinha. Para tanto, o DNA foi incubado com concentrações crescentes de HO. Na Figura 14 é possível observar que a banda de DNA livre diminui à medida que a quantidade de HO aumenta, bem como a formação do mononucleossomo. Assim, foi determinada a quantidade ideal de HO que deveria ser utilizada durante uma reconstituição.

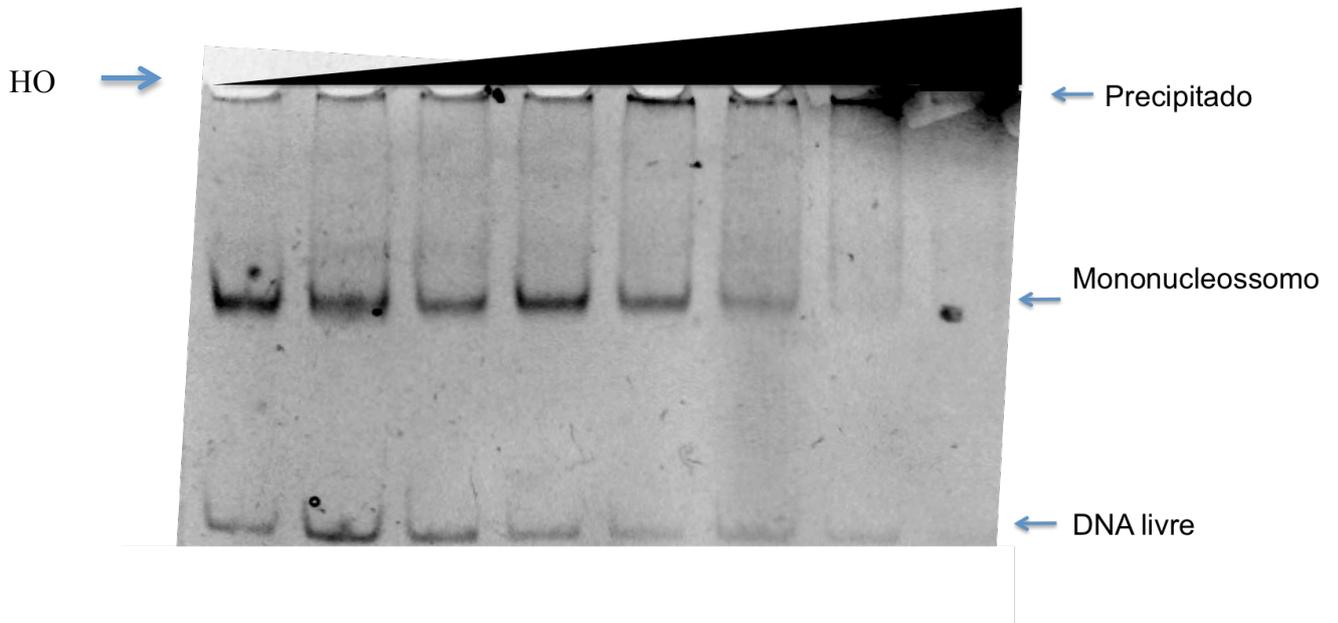


Figura 14. Reconstituição do mononucleossomo, visualizado em gel de acrilamida 6%, corado com brometo de etídeo

A reconstituição do mononucleossomo é um processo extremamente sensível, pequenas variações na técnica e materiais utilizados podem causar a má formação do complexo (Figura 15). Durante a reconstituição é importante ter controle exato das concentrações e pH das soluções utilizadas. Assim como, é crucial a utilização de materiais siliconizados, a fim de evitar a perda de HO durante o processo.

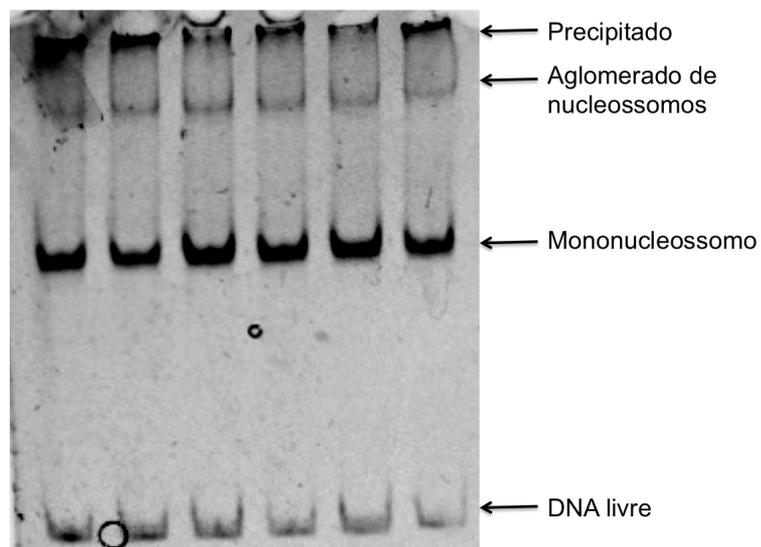


Figura 15. Reconstituição do mononucleossomo com excesso de HO, é possível ver a formação de precipitados que não conseguiram entrar no gel, bem como uma banda extra que acredita-se ser devido a um aglomerado de nucleossomos

### 4.3. Peptídeos

Os peptídeos utilizados foram baseados nas sequências de aminoácidos de diferentes NBPs das regiões que fazem contato com o nucleossomo. O peptídeo GMIP1 foi desenhado *in silico* pelo grupo do professor Guilherme Santos utilizando o software KVfinder baseando-se na estrutura do ligante de nucleossomo RCC1 (Oliveira *et al.*, 2014). Esse NBM tem dois sítios de ligação com o nucleossomo, um na região do patch ácido, outro faz contato com o DNA nucleossomal. No caso do GMIP1, as duas regiões que fazem contato com o nucleossomo foram unidas por uma ponte de três alaninas.

Todos os peptídeos utilizados foram analisados em gel de SDS para verificar se haviam contaminantes ou proteólise. Como é possível ver na Figura 16, os peptídeos não apresentam sinais de contaminação ou proteólise. Sendo assim, foi possível seguir para os ensaios bioquímicos. A variação de intensidade é devido ao fato de que o corante utilizado para visualização dos peptídeos (Coomassie blue) interage com aminoácidos que contêm anéis aromáticos (De St. Groth *et al.*, 1963), o Lana apresenta poucos aminoácidos desse tipo.

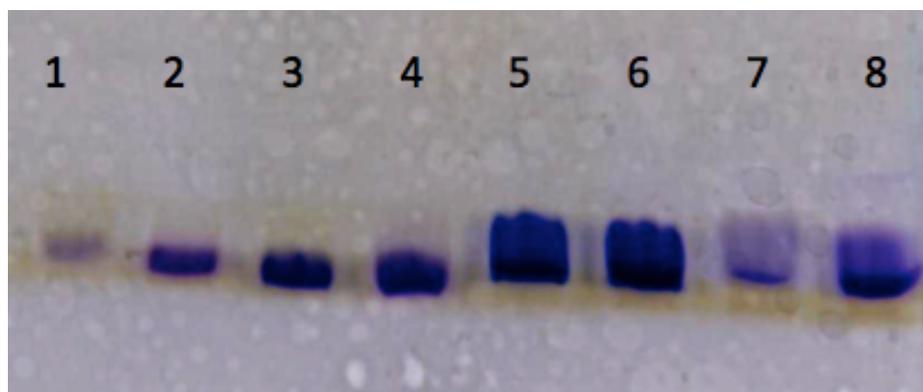


Figura 16. Gel de poliacrilamida 14% corado com coomassie blue. 1: lana, 2: lana fluorescente, 3: GMIP1, 4: GMIP1 fluorescente, 5: HMGN2, 6:HMGN2 fluorescente, 7: cauda da histona H4, 8: cauda da histona H4 fluorescente.

### 4.4. Dicroísmo Circular

Utilizando feixes de luz polarizados no sentido horário e anti-horário é possível identificar e quantificar moléculas opticamente ativas como proteínas. A partir dos espectros obtidos com a técnica de dicroísmo circular, é possível estimar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos, pois cada uma dessas estruturas apresenta um padrão de absorção

destinto na região do ultravioleta (UV).

Analisando as bandas dicróicas obtidas na análise de dicroísmo circular é temos picos negativos na região de 200nm e nas regiões entre 215 e 230nm, tais bandas dicróicas são características de estruturas random coil (Martin e Bayley, 2002)(Figura 17).

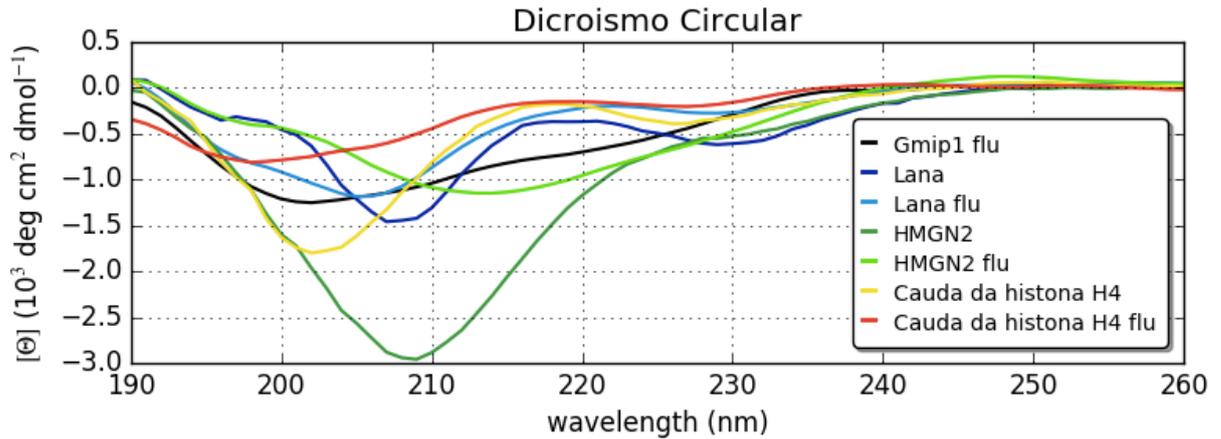


Figura 17. Dicroísmo circular das NBMs avaliadas em tris 5mM pH 7,4. A maioria das estruturas se encontram em random coil, e em menor quantidade  $\beta$ -sheet.

Além disso, é possível perceber que as estruturas secundárias, se mantêm em random coil, mesmo em uma solução não tamponada, como a água (Figura 18).

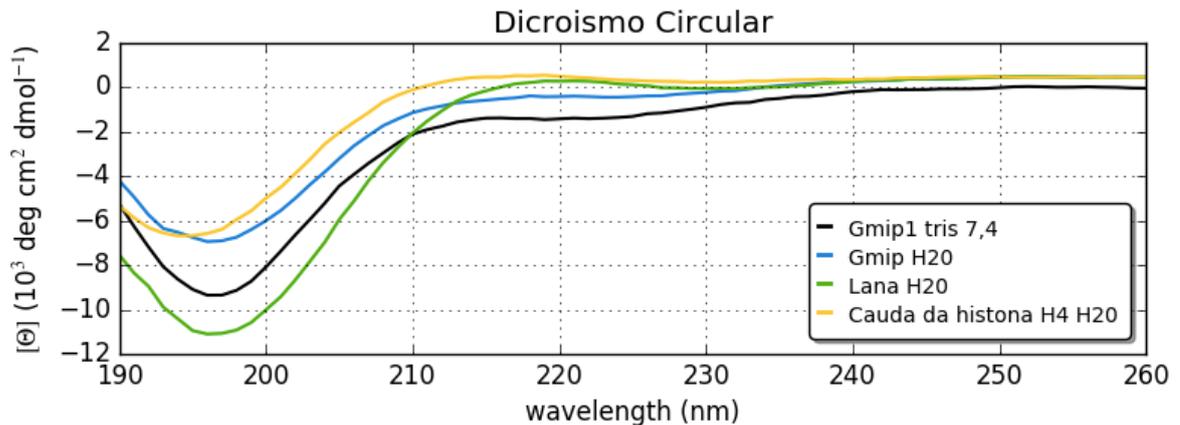


Figura 18. Dicroísmo circular das NBMs avaliadas em tris 5mM pH 7,4 e Água. A maioria das estruturas se encontra em random coil.

A presença de random coil nas NBMs é relevante para a ligação no nucleossomo, visto que todas as interações de moléculas com o patch ácido identificadas até hoje são na forma de random coil (Cabral *et al.*, 2016). Entretanto, existe um lado negativo, uma vez que peptídeos sem estruturas secundárias definidas estão mais propensos a degradação proteica

(Creighton, 1993).

#### 4.5. Ligação das NBMs com o nucleossomo

A confirmação de que as NBMs estavam de fato se ligando ao nucleossomo *in vitro* é essencial para o procedimento do trabalho. Foram testadas todas as NBMs marcadas com fluorescência, nesse sentido, o objetivo do presente ensaio é observar a colocalização das bandas no gel de acrilamida revelados de duas formas diferentes (Figura 19). Primeiramente, é observada a fluorescência referente ao nucleossomo, em seguida são observados os peptídeos a per se. Sendo assim, foi possível observar que um dos NBMs propostos para ser analisado, o GMIP1, não se ligou com o mononucleossomo no ensaio realizado, indo contra resultados anteriores do grupo que havia confirmado a ligação do GMIP1 com o nucleossomo, porém seus efeitos na regulação gênica já foram comprovados por RT-PCR (Silva, 2016).

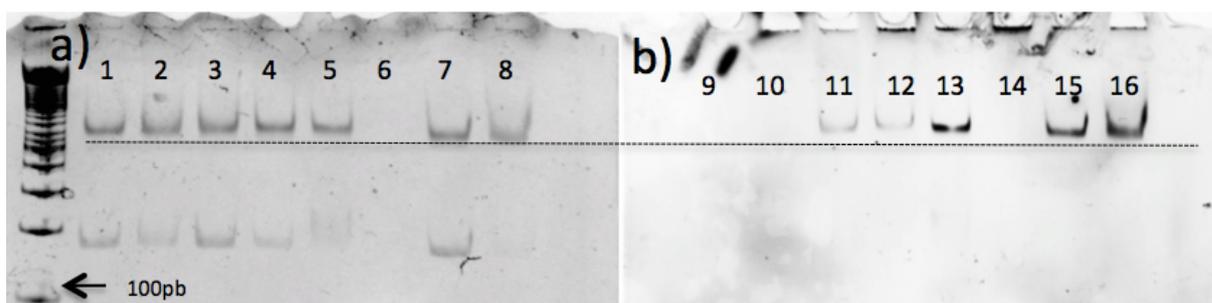


Figura 19. Ensaio de ligação do mononucleossomo com diferentes NBMs, gel a) revelado com brometo de etídeo, possibilitando visualizar o nucleossomo, gel b) revelado com laser verde, possibilitando visualizar o peptídeo. GMIP1: filas 1, 9 e 2, 10; Lana 3, 11 e 4, 12; H4 5, 13 e 6, 14; HMGN2 7, 15 e 8, 16 nas concentrações 1 e 10 $\mu$ M respectivamente.

É possível perceber, ainda, que a ligação da H4 em altas concentrações (10 $\mu$ M) causa o desmantelamento do complexo. Também nota-se que o Lana apresenta uma banda (fluorescência TAMRA) mais fraca que a dos outros NBMs analisados. Este resultado sugere que o Lana apresenta uma menor afinidade pelo nucleossomo. Dado que é reforçado pelas análises de thermal shift apresentadas a seguir.

#### 4.6. Thermal shift

A caracterização bioquímica e biofísica da relação proteína/proteína, proteína/fármaco ou proteína/ácido nucléico tem papel chave em estudos de biologia

estrutural (Grofthauge *et al.*, 2015). Existem diversas técnicas disponíveis para tais caracterizações, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massas, thermal shift e outros (Hofstadler e Sannes-Lowery, 2006; Sillerud e Larson, 2012). Com execução do thermal shift, as outras técnicas mencionadas são extremamente laboriosas e caras, e não permitem realizar análises em grande escala.

A fim de entender os efeitos dos NBMs sob a estrutura do mononucleossomo, o ensaio de thermal shift foi realizado. Essa análise já é amplamente utilizada para determinação de tampões ideais para proteínas, investigação de condições para cristalografia, otimização de condições para purificação e análise de diferentes ligantes para proteínas (Matulis *et al.*, 2005; Mezzasalma *et al.*, 2007; Grofthauge *et al.*, 2015).

Em 1991, essa técnica foi desenvolvida por Semisotnov e colaboradores e foi feita utilizando a sonda 8-anilinaftaleno-1-ácido (1,8-ANS). Em seguida, o método foi otimizado, possibilitando realizar análises em grande escala, modificando a sonda para a SYPRO Orange, que tem seu espectro de excitação/emissão dentro da faixa de quase todos equipamentos de qPCR, tornando essa técnica mais acessível, já que um equipamento de qPCR é ubíquo em quase todos laboratórios de biologia molecular atuais (Pantoliano *et al.*, 2001).

Nessa análise, um composto com baixa fluorescência (Sypro-Orange) em um ambiente polar, porém com alta fluorescência em ambiente apolar, é adicionado a uma solução com a proteína de interesse (Pantoliano *et al.*, 2001), em nosso trabalho o nucleossomo. A fluorescência é monitorada enquanto a solução é submetida a uma rampa de aquecimento. Quando as proteínas iniciam o processo de desnaturação, sítios hidrofóbicos são expostos, possibilitando que esse composto interaja e emita fluorescência. Desta forma, é possível determinar a que temperatura a proteína desnaturou, determinando assim a temperatura de melting ( $T_m$ ). A  $T_m$  é calculada a partir da primeira derivada da curva de fluorescência, determinando o ponto de inflexão da curva o que indica quando 50% das proteínas foram desnaturadas (Wetmur, 1991; Grofthauge *et al.*, 2015).

O perfil de desnaturação térmica do mononucleossomo foi determinado por Tagushi e colaboradores em 2014. Foi observado que a desnaturação do nucleossomo ocorre em duas etapas: primeiramente ocorre a evicção dos dímeros das histonas H2A/H2B, formando um tetrassomo, em seguida é possível observar um segundo pico referente a desnaturação completa do complexo com a evicção do tetrâmetro de H3/H4, como vistos na Figura 20.

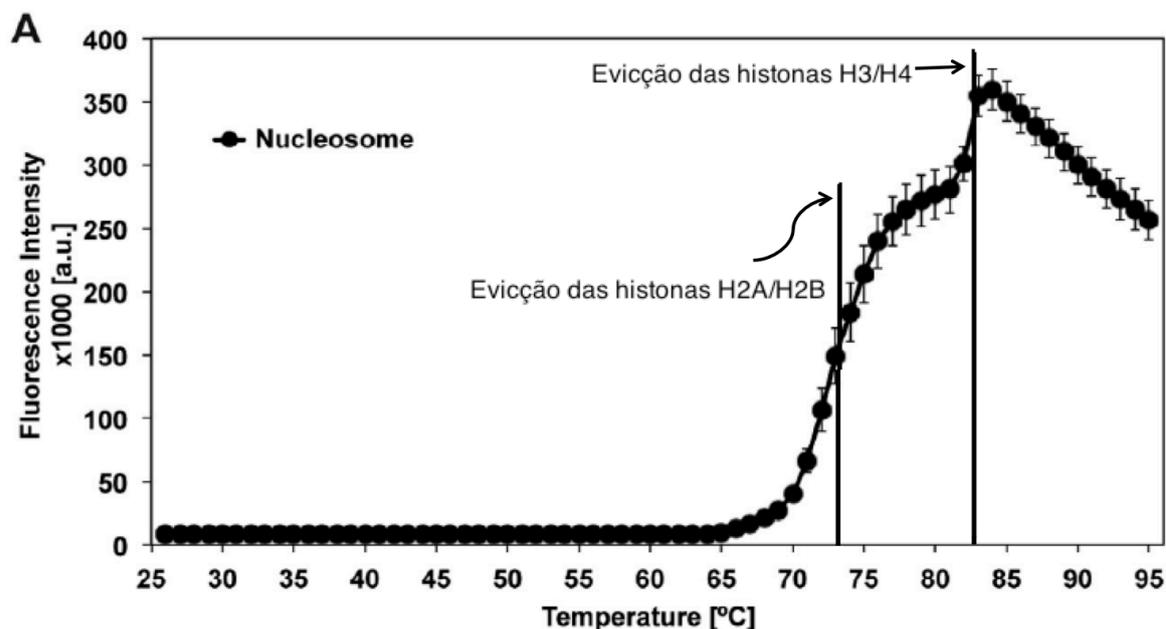


Figura 20. Ensaio de thermal shift do nucleossomo, o primeiro pico de fluorescência referente a evicção dos dímeros por volta de 73°C, o segundo pico de fluorescência referente a evicção dos tetrâmeros por volta de 83°C. Adaptado de Taguchi et al., 2014.

Nesse ensaio foram testados os NBMs: Lana, cauda da histona H4, HMGN2, GMIP1, GMIP1A e GMIP1B todos sem marcação fluorescente. Embora com o GMIP1 não foi possível verificar sua ligação com o mononucleossomo no ensaio de ligação, sua análise foi feita para reforçar a teoria de que essa NBM não estava se ligando ao nucleossomo, pois a marcação fluorescente TAMRA poderia estar interferindo na ligação do GMIP1 com o nucleossomo. Diferentes concentrações dessas NBMs foram testadas para verificar se obtinhamos uma curva dose resposta da alteração da estabilidade do mononucleossomo. Inicialmente todos os compostos foram testados nas concentrações de 5, 50, 100 e 200 $\mu$ M, porém a cauda da histona H4 apresentou uma capacidade de desestabilização do nucleossomo muito grande, assim sendo, concentrações nano molares foram feitas somente para esse composto. Foi verificado, ainda, que a formação do pico por volta de 70°C é relacionado a desnaturação de algum dos complexos de histonas e não do nucleossomo (Figura 21), visto que é possível a formação dos dímeros e tetrâmeros em concentrações de sal bem inferiores as necessárias para a formação do octâmero (Eickbush e Moudrianakis, 1978). Além disso, Tagushi e colaboradores demonstraram que as histonas livres não emitem picos de fluorescência nesta análise.

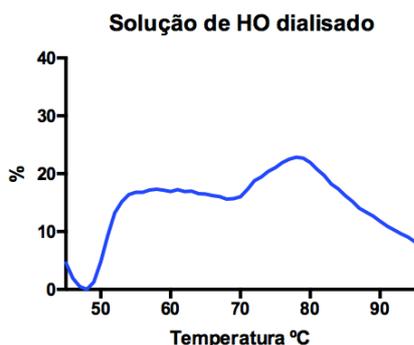
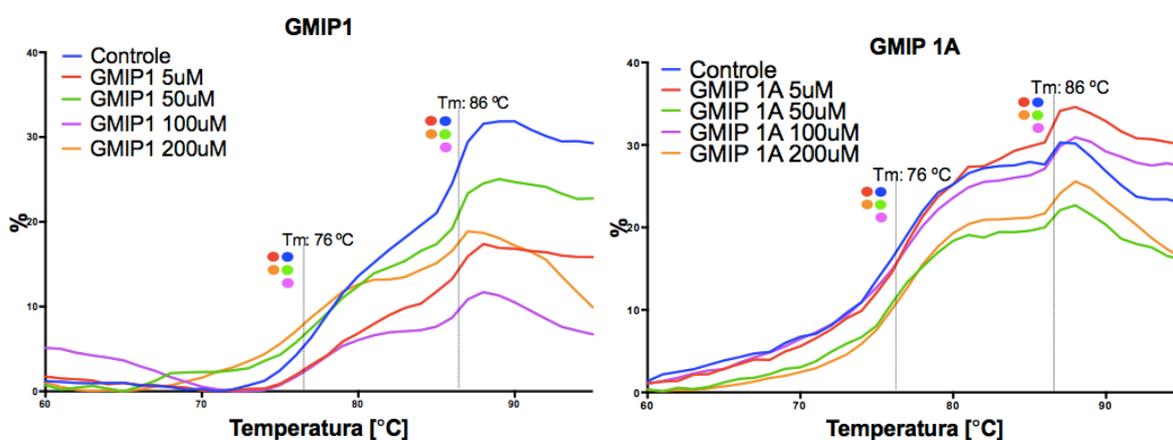


Figura 21. Ensaio de thermal shift de uma solução de HO dialisada, com a concentração final de sal de 15mM de NaCl, tris 10mM pH 7,4 e EDTA 1,5mM. Dois picos distintos são observados, provavelmente referentes a desnaturação dos complexos de dímeros e terâmeros de histonas.

#### 4.6.1 GMIP1

O ensaio de thermal shift é baseado na teoria de que um ligante pode alterar a estabilidade térmica de uma proteína (Krishna *et al.*, 2013). Baseada nessa teoria, a referida técnica já foi utilizada diversas vezes para screening de ligantes de proteínas (Pantoliano *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2004; Krishna *et al.*, 2013). Foram analisados o GMIP1 e as porções separadas do GMIP1, a região do GMIP1 que foi desenhada para fazer contato com o DNA nucleossomal, foi intitulada de GMIP1A e a porção que foi desenhada para interagir com o patch ácido de GMIP1B. A Figura 22 demonstra que não ocorreu alteração na termo estabilidade do nucleossomo nas concentrações testadas, corroborando com o resultado anterior do ensaio de ligação.



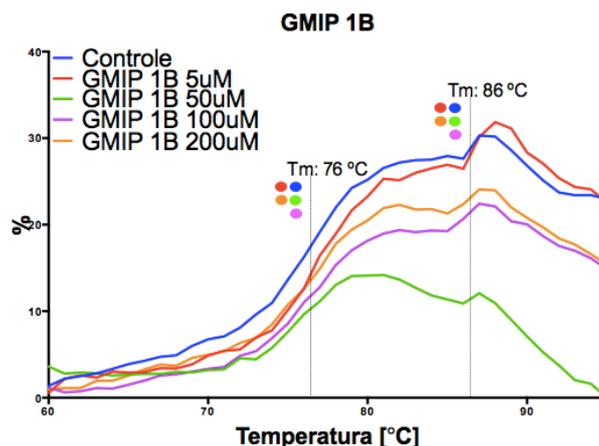


Figura 22. Ensaio de thermal shift a) GMIP1, b)GMIP1A, c)GMIP1B. Em todas as concentrações testadas não ocorreu alteração na  $T_m$ , sugerindo a não ligação dos peptídeos no nucleossomo.

#### 4.6.2. Lana

Esse NBM que se liga ao nucleossomo formando uma estrutura de hairpin apresentou uma curva dose resposta, alterando a estabilidade térmica do nucleossomo, ao contrário do GMIP1. Em baixas concentrações ( $5\mu\text{M}$ ), o NBM não apresentou efeito sob a estabilidade térmica do nucleossomo, porém com  $50\mu\text{M}$  ocorreu um deslocamento à esquerda no gráfico do segundo pico. Esse efeito é interessante, visto que o sítio de ligação do Lana é na região do patch ácido, que fica localizado entre as histonas H2A e H2B. O segundo pico do thermal shift do nucleossomo é referente a evicção do tetrâmero de H3/H4, portanto a ligação no patch ácido tem efeitos sob a estabilidade do complexo por inteiro, não ficando restrito somente as proteínas que a NBM interage. O Lana na concentração de  $100\mu\text{M}$  afeta a estrutura toda do complexo, causando a desnaturação em uma etapa e em temperaturas mais baixas. Assim é possível perceber que dependendo da concentração a estabilidade dos dímeros de H2A/H2B também é afetada. Na concentração máxima utilizada de  $200\mu\text{M}$  o lana destruiu o nucleossomo, sendo possível visualizar somente um pico a  $70^\circ\text{C}$  que acredita-se ser dos dímeros H2A/H2B, como visto na Figura 23.

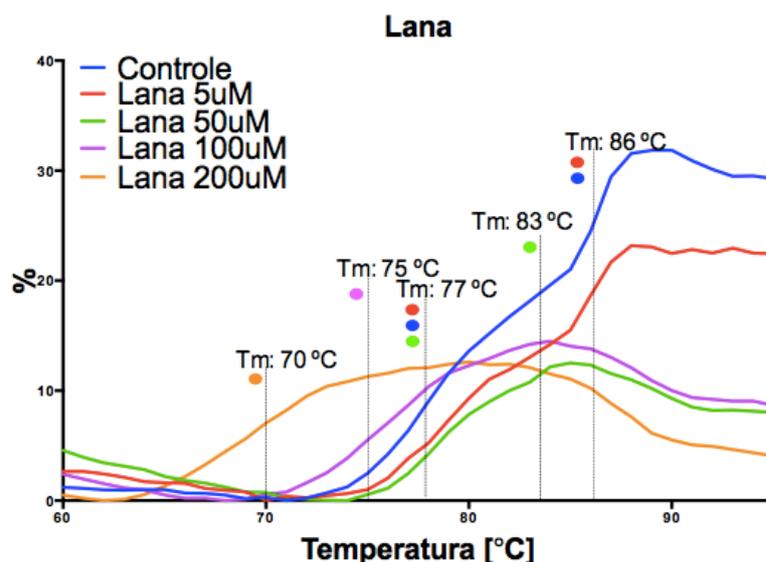


Figura 23. Ensaio de thermal shift com o Lana em diferentes concentrações. É possível observar uma curva dose resposta dessa NBM com o nucleossomo.

#### 4.6.3. Cauda da histona H4

A cauda da histonas H4 demonstrou uma capacidade de desestabilização do nucleossomo muito maior que qualquer outra NBM testada. Para conseguir observar o efeito do shift na estabilidade do nucleossomo, grandezas na ordem de nano molar foram testadas (Figura 24). Foi possível observar que o nucleossomo incubado com 200nM do peptídeo emite somente um pico de desnaturação em 80°C, indicando que está induzindo a estabilidade dos dímeros de H2A/H2B e desestabilizando os tetrâmeros, visto que as T<sub>m</sub>s desses complexos são 77°C e 85°C respectivamente. É interessante notar que com 5µM o nucleossomo tem seu pico em 70°C, o que caracteriza que o complexo já está desfeito. Assim é possível inferir que a cauda da histona H4 e o peptídeo Lana apresentam efeitos semelhantes sob o tetrâmero porém uma ação antagônica nos dímeros.

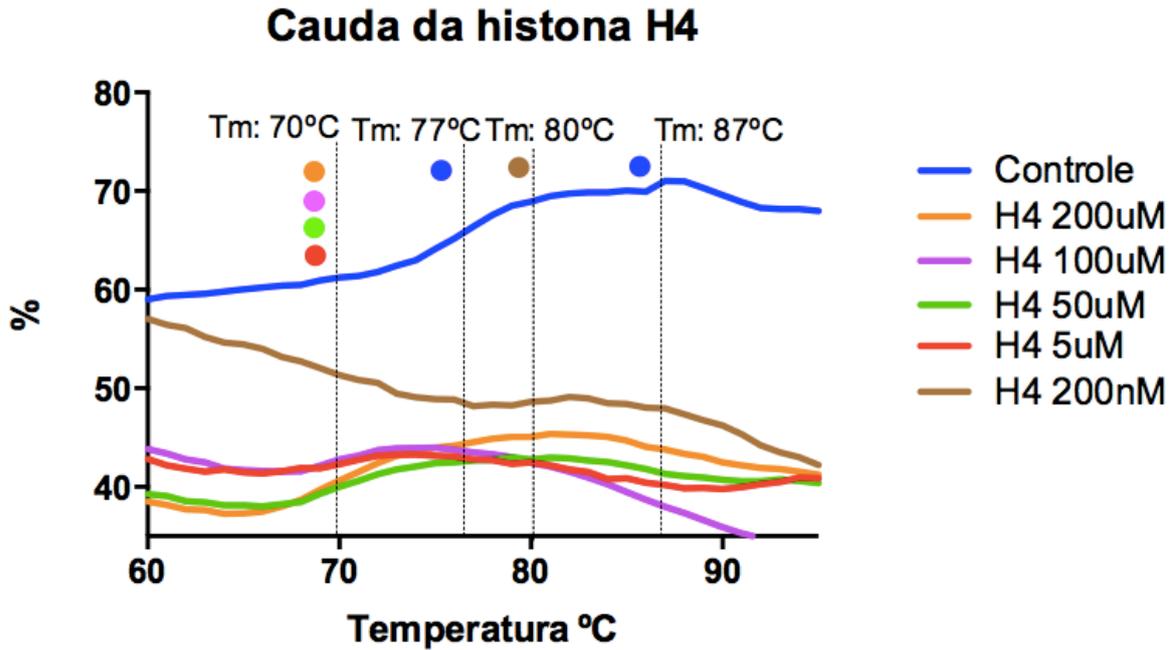


Figura 24. Ensaio de thermal shift com a cauda da histona H4 em diferentes concentrações.

Para confirmar que o pico a 70°C não é referente ao nucleossomo, foi feito um ensaio de estabilidade a temperatura ambiente (Figura 25) e foi demonstrado que pequenas variações na concentração da cauda da histona H4 induzem um shift para cima da banda do nucleossomo e, conseqüentemente, sua destruição, corroborando com os dados de que o pico a 70°C não é mais pertencente ao nucleossomo.

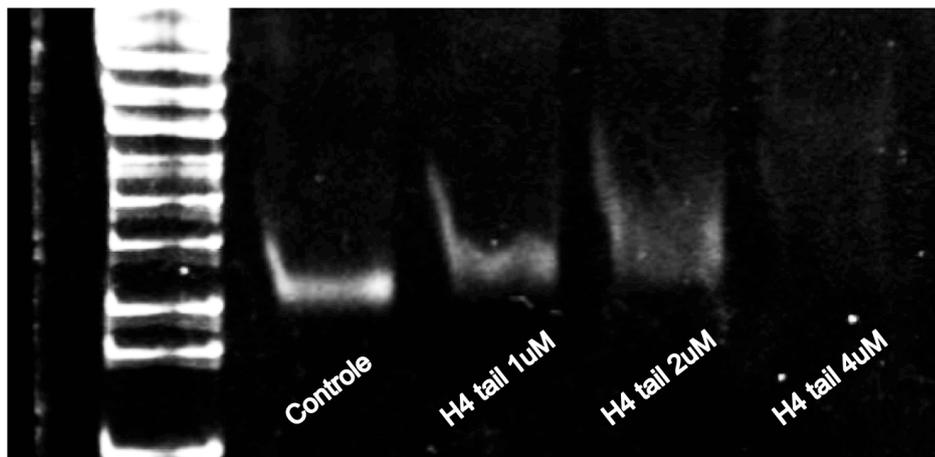


Figura 25: Ensaio de estabilidade do mononucleossomo com a cauda da histona H4. Pequenas variações na concentração da cauda da histona H4 causa um shift na banda do nucleossomo, indicando que o complexo está se aglomerando.

## 4.6.4. HMGN2

A ação do HMGN2 sobre o nucleossomo, diferentemente das outras NBMs avaliadas, afetou de forma simultânea a estabilidade térmica do complexo por inteiro, pois diferentemente do Lana, em que baixas concentrações induziu um shift para esquerda somente do segundo pico. O HMGN2 em baixas concentrações induziu um shift para esquerda dos dois picos de desnaturação do nucleossomo (Figura 26). Ao aumentar a concentração ocorre a formação de um pico por volta de 67°C, porém, diferentemente do que ocorria com outros NBMs, ainda existe um pico variando entre 80/81°C, indicando que o complexo não desfeito em uma única etapa e sugerindo que o tetrâmero teve sua estabilidade pouco afetada pelo NBM. É provável que o pico em 67°C é referente a desnaturação dos dímeros de H2A/H2B que foram deslocados pela NBM, uma vez que o tetrâmero se localiza no centro no nucleossomo, e sua evicção não é possível sem antes o deslocamento dos dímeros de H2A/H2B (Hamiche e Richard-Foy, 1998). Além disso, não foi possível observar uma concentração que o HMGN2 desfez o nucleossomo por completo, como é observado no caso do Lana e cauda da histona H4

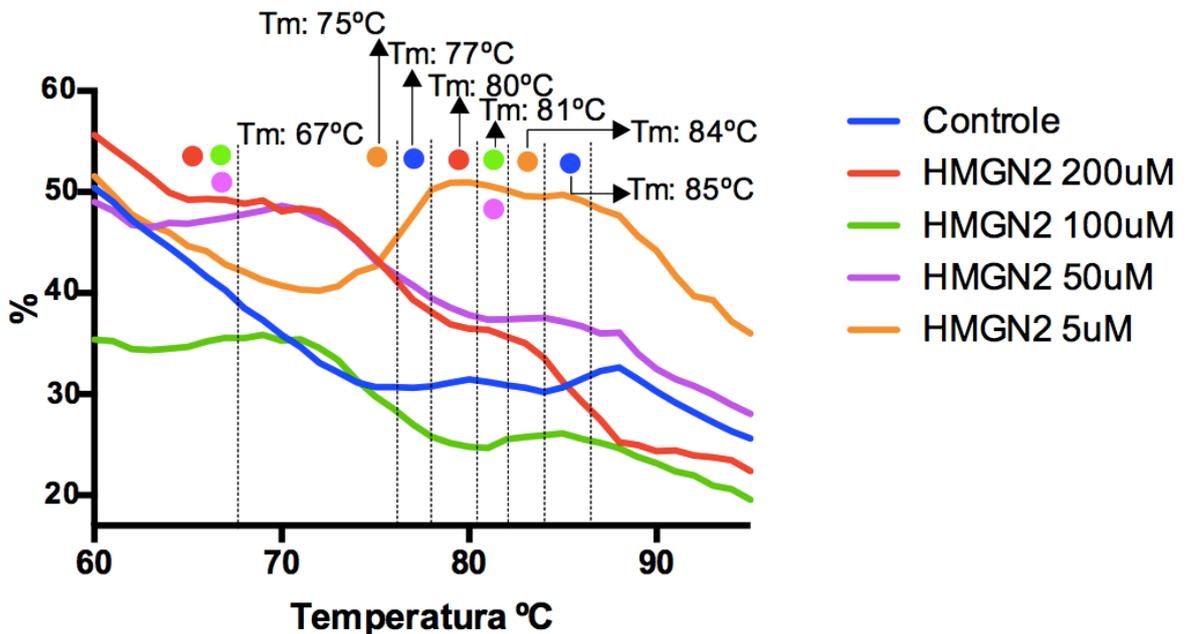


Figura 26: Ensaio de estabilidade do mononucleossomo com HMGN2. A formação de picos em 67°C sugere a evicção precoce dos dímeros de H2A/H2B e a desestabilização do tetrâmero.

#### 4.7. Mapa de sensibilidade

Utilizando os dados obtidos com o thermal shift do efeito das NBMs sob a estrutura do nucleossomo, foi feita uma classificação de como o nucleossomo é afetado pela NBM (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo da capacidade de desestabilização das NBMs avaliadas. Sua capacidade de desestabilização foi discriminada entre os complexos que formam o nucleossomo. \*: tem efeito primeiramente no pico de H3/H4; &: efeito inicial não determinado; \$: tem efeito em ambos os picos, porém fracamente no segundo. O X em preto indica efeito de desestabilização, em vermelho indica estabilização

NBM	Efeito sob o nucleossomo	H2A/H2B	H3/H4
Lana*	Forte	X	X
	Intermediário		
	Fraco		
H4&	Forte	X	X
	Intermediário		
	Fraco		
HMGN2\$	Forte	X	X
	Intermediário		
	Fraco		

A

Tabela 4 traz as interações que os NBMs fazem com as histonas H2A e H2B, facilitando o entendimento de como as NBMs interagem com o nucleossomo

Tabela 4: NBMs testadas e suas interações com o nucleossomo. Aminoácidos estão representados na sua abreviação por letra e os pertencentes ao patch ácido em negrito.

NBPs Aminoácidos	LANA	Cauda da H4	HMGN2
<b>H2A</b>			
Y50	M6, L8		
V54	M6, L8		
E56	R9	R19,R23	
Y57	M6, L8		
E61	R9	K16	R23, S24, R26
E64	S10	K16, R17, H18	R23, S24
D90	R9	K16	R26
E91			R22, R26
E92	R9	K16	R26
<b>H2B</b>			
Q44	S13, G15		
V45	R12		
E102		K16	
H106	R7		
E110	R7	K20, R23	
K113	G5		

A fim de se obter um entendimento a nível nucleossomal das regiões que os NBMs interagem na superfície do nucleossomo, o software pymol foi utilizado para visualizar o nucleossomo e destacar as regiões em que os NBMs interagem (Figura 27). Assim torna-se possível perceber como NBMs com diferentes efeitos sob a estabilidade térmica do nucleossomo tem sítios de ligações distintos. Além disso, pode-se observar que a região da ligação do Lana e do HMGN2 são bem distintas.

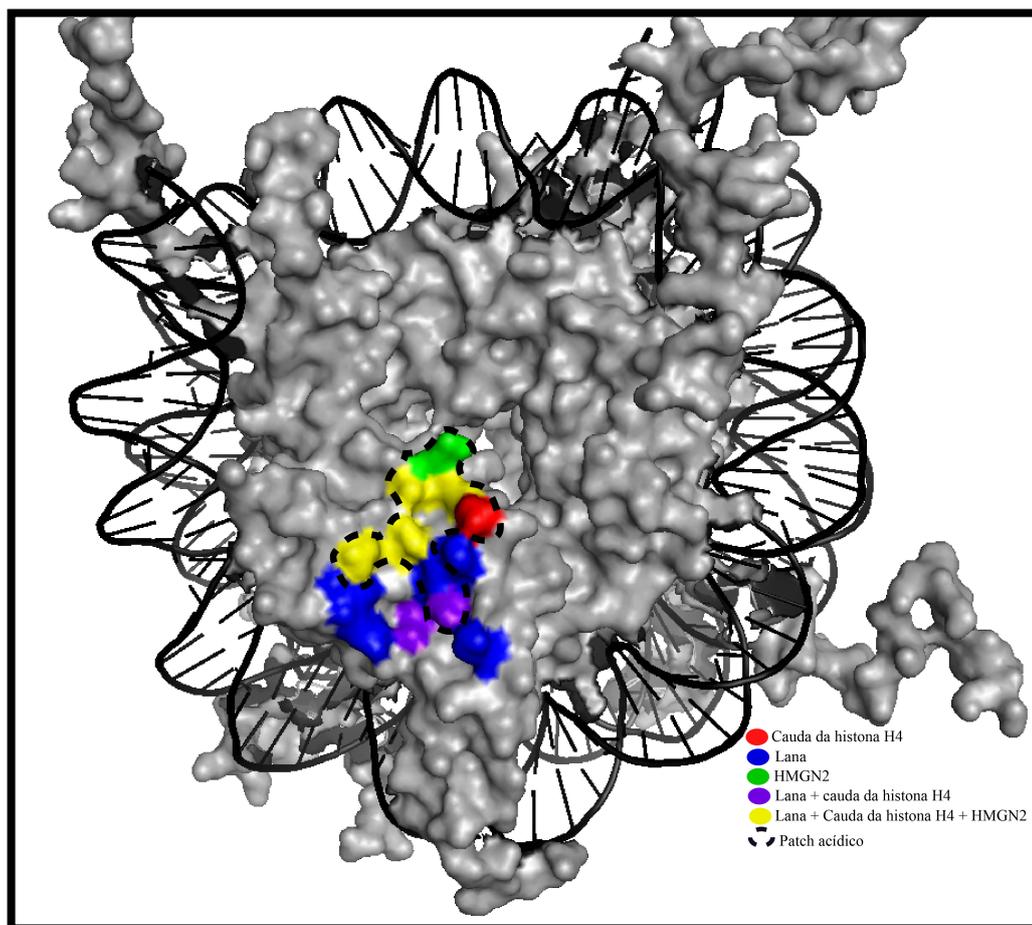


Figura 27: Mapa de interação das NBMs avaliadas com a superfície do nucleossomo (PDB 1KX5). Em preto o DNA nucleossomal, histonas em cinza, patch ácido destacado em linhas pretas, em vermelho as regiões de contato exclusivos da cauda da histona H4, em azul Lana e verde HMGN2. Cores secundárias são referente a pontos de contato em que as NBMs se sobrepõem. Roxo, pontos de interação que a cauda da histona H4 e Lana tem em comum e amarelo todas NBMs avaliadas.

Correlacionando os dados das tabelas 3 e 4 é possível identificar os aminoácidos do patch ácido que podem estar induzindo os efeitos de desestabilização do nucleossomo observados no patch ácido. O NBM HMGN2 não interage com o patch ácido da histona H2B além de ser o único NBM analisado a interagir com o resíduo E91 da histona H2A. Isso

sugere que a interação exclusiva com os resíduos do patch ácido da histona H2A e com o resíduo E91 são os responsáveis por induzir o perfil de desnaturação observado no thermal shift com esse NBM, deslocando o primeiro e segundo pico para esquerda.

A evicção dos dímeros de H2A/H2B são fundamentais para diversos processos fisiológicos, como na leitura do DNA pela RNA polimerase II (Kulaeva *et al.*, 2010). O efeito que O HMGN2 teve sob os dímeros sugerem atividade semelhante a realizada pela RNA polimerase II, removendo os dímeros e mantendo os tetrâmeros. É possível que essa enzima induza a remoção dessas histonas de forma semelhante.

A cauda da histona H4 interage exclusivamente com o patch ácido e somente não interage com o E91 do patch ácido. Sua afinidade superior aos outros NBMs avaliados pode-se dar pelo fato de fazer diversas pontes salinas, de hidrogênio e ligação de Vander-Waals, o grande número de interações afeta a entropia do sistema o que ajuda a definir a afinidade do ligante pelo receptor (Klebe e Bohm, 1997). Não foi obtido nenhum dado de thermal shift com concentrações em que não era possível detectar o shift nos picos, portanto não foi definido como a cauda da histona H4 afeta o nucleossomo inicialmente. Porém foi observado que a cauda da histona H4, diferentemente de todos outros NBMs analisados, induziu um efeito de estabilização dos dímeros. Foi observado que a única diferença de modo de interação da cauda da histona H4 e do Lana no patch ácido é a interação com o E102 da histona H2B, sugerindo que esse resíduo é responsável pelo efeito de estabilização dos dímeros. O efeito da cauda da histona H4 sob o tetrâmero aparentou ser semelhante ao do Lana, assim não foi possível isolar com precisão quais resíduos podem induzir o efeito observado nos tetrâmeros.

Para confirmar que os aminoácidos identificados são responsáveis pelo efeito visualizado no thermal shift seria necessário realizar screening de mutações por alanina, porém por motivos técnicos esse ensaio não foi possível ser realizado.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, objetivamos obter um mapa de sensibilidade da superfície do nucleossomo, desafiado com diferentes peptídeos NBMs descritos na literatura e um novo peptídeo desenhado *in silico*.

Observamos que o GMIP1, novo peptídeo, não apresentou ligação com o nucleossomo nas condições testadas. Além disso, GMIP1 não teve efeito sob a estabilidade do nucleossomo. Estes resultados sugerem que maiores concentrações de GMIP1 sobre o nucleossomo deverão ser analisadas. Entretanto, já foi descrito que este peptídeo possui efeito sobre a expressão de TNF- $\alpha$  em diferentes linhagens celulares (Silva, 2016). Demonstramos que os outros peptídeos testados aqui se ligam ao nucleossomo.

Utilizando a técnica de thermal shift foi possível identificar sítios críticos para a estabilidade do nucleossomo. Foi identificado que a interação dos peptídeos somente com os resíduos do patch ácido da H2A, possui pouco efeito sob o tetrâmero, como observado com o HMGN2. Todavia, os outros peptídeos NBMs avaliados interagem com a histona H2B e apresentam fortes efeitos sob o tetrâmero H3/H4. Além disso, resíduo E102 da histona H2B aparenta ter um efeito estabilizador nos dímeros.

Pelo thermal shift, demonstramos a existência de estruturas distintas do nucleossomo em presença dos diferentes peptídeos, ocasionadas pela saída de dímeros de H2A/H2B e/ou tetrameros de H3/H4.

Em síntese, os dados obtidos reforçam que o patch ácido é vital para a estabilidade do complexo e qualquer perturbação dos aminoácidos que compõem esta região pode ter um efeito impactante sobre o nucleossomo, ulteriormente sobre a cromatina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNUNZIATO, A. DNA packaging: nucleosomes and chromatin. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 26, 2008.

ARMACHE, K. J. et al. Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 977-82, Nov 18 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096199> >.

BARBERA, A. J. et al. The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 856-61, Feb 10 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469929> >.

BASSETT, A. et al. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. **Curr Opin Genet Dev**, v. 19, n. 2, p. 159-65, Apr 2009. ISSN 1879-0380 (Electronic) 0959-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346124> >.

BEAUCHEMIN, C. et al. Assay Development and High-Throughput Screening for Inhibitors of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus N-Terminal Latency-Associated Nuclear Antigen Binding to Nucleosomes. **J Biomol Screen**, v. 19, n. 6, p. 947-58, Jul 2014. ISSN 1552-454X (Electronic) 1087-0571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518064> >.

BECHARA, C.; SAGAN, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? **FEBS Letters**, v. 587, n. 12, p. 1693-1702, 2013. ISSN 00145793.

BINTU, L. et al. Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 738-49, Nov 09 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141536> >.

CABRAL, W. F.; MACHADO, A. H.; SANTOS, G. M. Exogenous nucleosome-binding molecules: a potential new class of therapeutic drugs. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 5, p. 707-11, May 2016. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854425> >.

CARRIERE, V. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 1, p. 282-7, Jan 02 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

CREIGHTON, T. E. **Proteins : structures and molecular properties**. 2º. New York: Freeman, 1993. ISBN 071677030X 9780716770305.

DE ST. GROTH, S. F.; WEBSTER, R. G.; DATYNER, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 71, p. 377-391, 1963. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006300263910928> >.

DODERO, V. I.; QUIROLO, Z. B.; SEQUEIRA, M. A. Biomolecular studies by circular dichroism. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 16, p. 61-73, Jan 01 2011. ISSN 1093-4715 (Electronic) 1093-4715 (Linking).

EICKBUSH, T. H.; MOUDRIANAKIS, E. N. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. **Biochemistry**, v. 17, n. 23, p. 4955-4964, 1978. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00616a016> >.

FANG, Q. et al. Human cytomegalovirus IE1 protein alters the higher-order chromatin structure by targeting the acidic patch of the nucleosome. **Elife**, v. 5, Jan 26 2016. ISSN 2050-084X (Electronic) 2050-084X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812545> >.

FELSENFELD, G.; GROUDINE, M. Controlling the double helix. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 448-453, 2003. ISSN 0028-0836.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644614003997> >.

FUCHIKAMI, M. et al. The potential use of histone deacetylase inhibitors in the treatment of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 320-4, Jan 04 2016. ISSN 1878-4216 (Electronic) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818247> >.

GROFTEHAUGE, M. K. et al. Protein-ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). **Acta Crystallographica Section D**, v. 71, n. 1, p. 36-44, 2015. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <https://doi.org/10.1107/S1399004714016617> >.

HAMICHE, A.; RICHARD-FOY, H. The switch in the helical handedness of the histone (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer within a nucleoprotein particle requires a reorientation of the H3-H3 interface. **J Biol Chem**, v. 273, n. 15, p. 9261-9, Apr 10 1998. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

HENRY, K. W. et al. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. **Genes & Development**, v. 17, n. 21, p. 2648-2663, November 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://genesdev.cshlp.org/content/17/21/2648.abstract> >.

HOFSTADLER, S. A.; SANNES-LOWERY, K. A. Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 7, p. 585-95, 2006. ISSN 1474-1776 (Print) 1474-1776 (Linking).

HORN, P. J.; PETERSON, C. L. Chromatin Higher Order Folding--Wrapping up Transcription. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1824-1827, 2002.

HU, A. et al. Nucleosome-binding protein HMGN2 exhibits antitumor activity in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 7, n. 1, p. 115-120, Jan 2014. ISSN 1792-1074 (Print) 1792-1074 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348831> >.

HUYNH, V. A.; ROBINSON, P. J.; RHODES, D. A method for the in vitro reconstitution of a defined "30 nm" chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. **J Mol Biol**, v. 345, n. 5, p. 957-68, Feb 4 2005. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15644197> >.

KALASHNIKOVA, A. A. et al. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. **J R Soc Interface**, v. 10, n. 82, p. 20121022, May 06 2013. ISSN 1742-5662 (Electronic) 1742-5662 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446052> >.

KATO, H. et al. A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1110-3, May 31 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23723239> >.

KATO, H. et al. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 30, p. 12283-8, Jul 26 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21730181> >.

KLEBE, G.; BOHM, H. J. Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 17, n. 1-3, p. 459-73, Jan-May 1997. ISSN 1079-9893 (Print) 1079-9893 (Linking).

KOUTELOU, E.; HIRSCH, C. L.; DENT, S. Y. R. Multiple faces of the SAGA complex. **Current opinion in**

- cell biology**, v. 22, n. 3, p. 374-382, 04/02 2010. ISSN 0955-0674 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900470/> >.
- KRISHNA, S. N. et al. A fluorescence-based thermal shift assay identifies inhibitors of mitogen activated protein kinase kinase 4. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81504, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24339940> >.
- KULAEVA, O. I.; HSIEH, F. K.; STUDITSKY, V. M. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 25, p. 11325-30, Jun 22 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534568> >.
- LASKEY, R. A. et al. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 416-420, 10/05/print 1978. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/275416a0> >.
- LESBATS, P. et al. Structural basis for spumavirus GAG tethering to chromatin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, May 10 2017. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490494> >.
- LIU, X. et al. Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure. **Nature**, v. 544, n. 7651, p. 440-445, Apr 27 2017. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424519> >.
- LO, M. C. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Anal Biochem**, v. 332, n. 1, p. 153-9, Sep 01 2004. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15301960> >.
- LOWARY, P. T.; WIDOM, J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. **J Mol Biol**, v. 276, n. 1, p. 19-42, Feb 13 1998. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).
- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-60, Sep 18 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).
- MAKDE, R. D. et al. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 562-6, Sep 30 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739938> >.
- MARMORSTEIN, R.; ROTH, S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, n. 2, p. 155-161, 4/1/ 2001. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X00001738> >.
- MARTIN, S. R.; BAYLEY, P. M. Absorption and circular dichroism spectroscopy. **Methods Mol Biol**, v. 173, p. 43-55, 2002. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking).
- MATULIS, D. et al. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. **Biochemistry**, v. 44, n. 13, p. 5258-66, Apr 05 2005. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).
- MCGINTY, R. K.; HENRICI, R. C.; TAN, S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 591-6, Oct 30 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355358> >.
- MEZZASALMA, T. M. et al. Enhancing recombinant protein quality and yield by protein stability profiling. **J**

**Biomol Screen**, v. 12, n. 3, p. 418-28, Apr 2007. ISSN 1087-0571 (Print)  
1087-0571 (Linking).

MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. 18, n. 4, p. 363-370, 2007. ISSN 0959-4973. Disponível em: < [http://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Fulltext/2007/04000/Histone\\_deacetylase\\_inhibitors\\_for\\_epigenetic.1.aspx](http://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Fulltext/2007/04000/Histone_deacetylase_inhibitors_for_epigenetic.1.aspx) >.

MORGAN, M. T. et al. Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. **Science**, v. 351, n. 6274, p. 725-728, 2016. ISSN 0036-8075  
1095-9203.

OLIVEIRA, S. H. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 197, 2014. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-15-197> >.

PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **J Biomol Screen**, v. 6, n. 6, p. 429-40, 2001. ISSN 1087-0571 (Print)  
1087-0571 (Linking).

PETTY, E.; PILLUS, L. Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 621-629, 2013. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.006> >.

PIOLOT, T. et al. Close but Distinct Regions of Human Herpesvirus 8 Latency-Associated Nuclear Antigen 1 Are Responsible for Nuclear Targeting and Binding to Human Mitotic Chromosomes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3948-3959, April 15, 2001. Disponível em: < <http://jvi.asm.org/content/75/8/3948.abstract> >.

RENAULT, L. et al. The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 97-101, Mar 05 1998. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking).

ROUSSEL, L. et al. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. **EMBO Rep**, v. 9, n. 10, p. 1006-12, Oct 2008. ISSN 1469-3178 (Electronic)  
1469-221X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688256> >.

ROUTH, A.; SANDIN, S.; RHODES, D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 8872-8877, 2008. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/105/26/8872.abstract> >.

SEMISOTNOV, G. V. et al. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. **Biopolymers**, v. 31, n. 1, p. 119-128, 1991. ISSN 1097-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bip.360310111> >.

SILLERUD, L. O.; LARSON, R. S. Advances in nuclear magnetic resonance for drug discovery. **Methods Mol Biol**, v. 910, p. 195-266, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)  
1064-3745 (Linking).

SILVA, I. T. G. **Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo**. 2013. 95 (Mestrado). Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília

\_\_\_\_\_. **Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados in silico sobre a cromatina**. 2016. 119 (Doutorado). Faculdade de medicina, Universidade de Brasília

SILVA, I. T. G.; DE OLIVEIRA, P. S.; SANTOS, G. M. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. **Trends Pharmacol Sci**, v. 36, n. 5, p. 263-9, May 2015. ISSN 1873-3735 (Electronic)  
0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835595> >.

SPERANZINI, V. et al. Touch, act and go: landing and operating on nucleosomes. **EMBO J**, v. 35, n. 4, p. 376-88, Feb 15 2016. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26787641> >.

SRIDHARAN, R. et al. Fluorescent approaches for understanding interactions of ligands with G protein coupled receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 1 Pt A, p. 15-33, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055822> >.

SU, L. et al. HMGN2, a new anti-tumor effector molecule of CD8(+) T cells. **Molecular Cancer**, v. 13, p. 178-178, 2014. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126642/> >.

TAGUCHI, H. et al. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. **Methods**, v. 70, n. 2-3, p. 119-26, Dec 2014. ISSN 1095-9130 (Electronic) 1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220913> >.

WETMUR, J. G. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 26, n. 3-4, p. 227-59, 1991. ISSN 1040-9238 (Print) 1040-9238 (Linking).