

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Manuela Swerts Batista Leite

**ESTRUTURA DA CROMATINA: AÇÃO DE
DETERGENTES E BUSCA POR PEPTÍDEO IDEAL
LIGANTE DO *PATCH* ACÍDICO**

BRASÍLIA
2013

Manuela Swerts Batista Leite

**ESTRUTURA DA CROMATINA: AÇÃO DE
DETERGENTES E BUSCA POR PEPTÍDEO IDEAL
LIGANTE DO *PATCH* ACÍDICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

BRASÍLIA
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1010078.

L533e Leite, Manuela Swerts Batista.
Estrutura da cromatina : ação de detergentes e busca por peptídeo ideal ligante do patch ácido / Manuela Swerts Batista Leite. -- 2013.
xii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Guilherme Martins Santos.

1. Cromatina. 2. Estrutura molecular. 3. Farmacologia.
I. Santos, Guilherme Martins. II. Título.

CDU 576.315.42

Manuela Swerts Batista Leite

**ESTRUTURA DA CROMATINA: AÇÃO DE DETERGENTES E BUSCA
POR PEPTÍDEO IDEAL LIGANTE DO *PATCH* ACÍDICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 15 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos (presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Werner Treptow
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Não seria capaz de definir se o mais decisivo para meu amadurecimento científico foi o intenso provimento de **informações**, as dedicadas **elucidações** sobre como interpretá-las ou a transmissão da convicção de que para superar os desafios da ciência basta nunca prescindir de intenso **exercício intelectual**. Por este conjunto de eventos, que me proporcionou uma formação de **qualidade** em clima de **incentivo** e alegria, agradeço ao querido professor e orientador **Guilherme Santos**.

Pela **parceria**, cumplicidade, amizade e diversão que me foram proporcionadas ao longo destes quase dois anos de intensa convivência: à **Bel** (Isabel Torres).

Por permitirem que eu pudesse usufruir de seu **conhecimento** e pela boa vontade com que me receberam em seu espaço, fazendo com que me sentisse em “casa”: aos pesquisadores **Ana Carolina** Migliorini Figueira, do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) e **Paulo Sergio** Lopes de Oliveira, do Laboratório de Bioinformática (LBI), ambos pertencentes ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas, SP).

Pelas belas **imagens** de microscopia eletrônica: à **Ingrid** e ao **Felipe**, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e ao Dr. **Rodrigo** Portugal, do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do CNPEM (Campinas, SP).

Pela generosa transmissão de conhecimentos, sempre acompanhada de disposição e alegria e, ainda, por me **inspirarem** profissionalmente: aos professores

Angélica Amato, **Francisco** de Assis Rocha Neves, **Guilherme** Santos e **Marie** Togashi.

Por tornarem as horas no laboratório muito mais **aprazíveis**: aos **colegas do FarMol**, principalmente à **Isabella**, **Mariella** e **Pedro**, que suportaram as colonizações cotidianas de bancada e contribuíram (muito!) para meu desenvolvimento científico.

Pela **ajuda** constante e irrestrita: ao colega **Martin** Fonkoua.

Pelo apoio **incrível** e determinante para que eu pudesse ter desenvolvido, longe de casa, um trabalho agradável: aos **colegas do LEC e do LBI**. Agradeço especialmente ao **Felipe** Ferraz, pelo tempo dedicado a sanar minhas dúvidas inquietas em relação à biologia computacional.

Pelos trabalhos que **começamos** a desenvolver juntos e que (espero) continuaremos a executar no futuro: aos colegas **Nicole** e **Kaian**.

Pelos ensinamentos, **auxílios** técnicos e conversas descontraídas: à **Rilva** Soares e à **Cristina** Simeoni.

Pela **contrapartida** e pelas doses cotidianas de afeto e irresponsabilidade: aos meus **amigos**.

E pelo **conforto emocional**, sem o qual tudo teria sido muito mais difícil, quiçá impraticável: ao **Alfredo**, à **Leila**, à **Laura** e ao **Cairê**.

Obrigada.

RESUMO

Em eucariotos, o DNA é organizado na forma de cromatina, cuja estrutura é formada por complexos nucleoproteicos chamados nucleossomos. Na porção proteica dos nucleossomos, há uma região superficial denominada *patch* ácido, que é alvo de interação de diversas proteínas, tanto oriundas de agentes infecciosos quanto endógenas. O *patch* ácido participa do mecanismo de compactação da cromatina, processo que dita desfechos de importantes eventos celulares por restringir o acesso de fatores de transcrição e outras proteínas reguladoras ao DNA. Desequilíbrios em modificações estruturais da cromatina são cada vez mais relacionados a doenças. Os objetivos deste trabalho foram: (i) buscar condições de maior estabilidade das longas fibras de cromatina visando futuros estudos estruturais, usando agentes desidratantes (detergentes); (ii) busca por um peptídeo ideal, ligante do *patch* ácido. Utilizando longas fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*, verificamos distintas ações de detergentes sobre as fibras. A presença de Triton X-100 possibilitou uma melhor reconstituição e formação de diferentes arranjos de nucleossomo *in vitro*. Além disto, o Triton X-100 mostrou-se como um desestabilizador térmico das longas fibras de cromatina. O CHAPS, por sua vez, não afetou a estabilidade das fibras reconstituídas *in vitro*. Concluímos que o CHAPS pode ser um bom candidato para uso em futuros estudos estruturais.

Palavras-chave: cromatina, estrutura da cromatina, fibras de cromatina.

ABSTRACT

In eukaryotic cells, DNA is organized in the form of chromatin, which is formed by nucleoprotein complexes called nucleosomes. In the surface of the protein portion of the nucleosomes, there is a region known as acidic patch, which is the site of interaction of several proteins, both derived from infectious agents as endogenous. The acidic patch also participates in the mechanism of chromatin compaction, a process that dictates important outcomes of cellular events by restricting access of transcription factors and other regulatory proteins to DNA. Unbalances in chromatin structural modifications have been increasingly linked to diseases. The objectives of this study were: (i) find conditions under which long chromatin fibers gain stability, aiming future structural studies, using dehydrating agents (detergents); (ii) search for an ideal peptide, ligand of the acidic patch. Using long chromatin fibers reconstituted *in vitro*, we found distinct actions of detergents on the fibers. Triton X-100 led to an improved reconstitution and formation of different nucleosome arrays *in vitro*. Furthermore, Triton X-100 was a thermal destabilizing agent of the long chromatin fibers. CHAPS, in turn, did not affect the stability of the reconstituted fibers *in vitro*. We concluded that CHAPS might be a good candidate to be used in future structural studies.

Key words: chromatin, chromatin structure, chromatin fibers.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Å	ângstrons
BAH	<i>bromo-associated domain</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C-terminal	carbóxi-terminal
CBM	chromatin binding motif
CENP	<i>centromere protein</i>
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
crDNA	DNA competidor
DAnCER	<i>Disease-Annotated Chromatin Epigenetics Resource</i>
DLS	espalhamento dinâmico de luz
DM	Dinâmica Molecular
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	mistura de nucleotídeos
EDTA	etileno bis(oxietilenonitrilo) do ácido tetracético
FASTA	<i>Fast-All</i>
HAT	acetiltransferase de histona
HDAC	deacetilase de histona
HMGN	<i>high mobility group nucleosome-binding</i>
HO	octâmero de histonas
IL-33	interleucina 33

K	Kelvin
kDa	kilo Dalton
KSHV	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi
LANA	antígeno nuclear associado à latência
LH	<i>linker</i> histona
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
M	molar
mA	miliampère
MgCl ₂	cloreto de magnésio
µg	micrograma
µL	microlitro
N-terminal	amino-terminal
NaCl	cloreto de sódio
NBD	domínio de ligação ao nucleossomo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEB	New England Biolab
NCP	partícula central do nucleossomo
nm	nanômetros
ns	nanossegundos
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reação da polimerase em cadeia
PDB	Protein Data Bank

PEG	polietilenoglicol
ps	picossegundos
PTM	modificação pós-traducional
RCC1	proteína reguladora da condensação cromossômica
RMN	ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA Pol II	Polimerase do ácido ribonucleico II
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Sir	proteínas silenciadoras da transcrição
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	tampão Tris-EDTA
TEA	trietanolamina
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
V	volts
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
YAMBER3	<i>Yet Another Model Building and Energy Refinement force field 3</i>
YASARA	<i>Yet Another Scientific Artificial Reality Application</i>

Código de letras dos aminoácidos

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
X	Aminoácido qualquer
Y	Tirosina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Estrutura da Cromatina	1
Partícula Central do Nucleossomo	1
Posicionamento de Nucleossomos	4
<i>Linker</i> Histona	4
Modificações pós-traducionais das histonas – epigenética	7
O <i>patch</i> ácido	8
Compactação da Cromatina	10
Fibra de cromatina compactada (fibra de 30 nm)	13
OBJETIVOS GERAIS	16

PARTE I – Efeito dos detergentes Triton X-100 e CHAPS sobre a fibra de cromatina

INTRODUÇÃO	18
Macromoléculas em Solução – o papel da água	18
Detergentes	21
Triton X-100 e CHAPS	22
OBJETIVO ESPECÍFICO	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
Obtenção e purificação do DNA	24
Obtenção de arranjos de DNA	24
Transformação e seleção bacterianas	25
Purificação do DNA plasmidial	26
Digestão do DNA plasmidial	27
Purificação do arranjo de DNA	27
Obtenção e purificação das histonas	28
Amplificação do DNA competidor por PCR	29
Reconstituição da Cromatina in vitro	30
Titulação do Octâmero de histonas (obtenção da fibra de 10 nm)	31
Titulação da linker histona (obtenção da fibra de 30 nm)	34

Ensaio de Desnaturação Térmica	36
Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	37
Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	37
RESULTADOS	39
Triton X-100	39
Triton X-100 antecipa ponto de saturação da fibra de cromatina reconstituída in vitro	39
Triton X-100 diminui termoestabilidade da fibra de 10nm	40
Fibra de cromatina de 10 nm é mais bem formada em presença de Triton X-100	41
Triton X-100 não afeta fibra de 30 nm	42
Triton X-100 aumenta proporção de partículas de raio pequeno e de agregados de fibras de 10 nm	43
Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) revela ação desmanteladora do Triton X-100 sobre as fibras de cromatina	44
CHAPS	46
CHAPS não altera a estabilidade da fibra de 10nm frente ao aumento de temperatura	46
CHAPS não altera estabilidade da fibra de cromatina de 10 nm após período de 35 dias	47
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	56

PARTE II – Busca por peptídeo ideal ligante do *patch* ácido

DECLARAÇÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

PREFÁCIO

Em núcleos de células eucarióticas, o DNA genômico é organizado sob a forma de cromatina, cuja estrutura, desde o final do século XX, tem sido vista como fator importante para o controle de processos celulares como a transcrição e a manutenção do genoma.

A cromatina é formada, basicamente, por DNA e proteínas (histonas), organizados em unidades repetitivas chamadas nucleossomos. As ligações entre as histonas e o DNA são altamente dependentes de moléculas de água, que as estabilizam (DAVEY et al., 2002).

A estrutura da sequência de nucleossomos, ou fibra de cromatina, é regulada temporal e espacialmente de acordo com o contexto celular. Alterações na interação entre nucleossomos levam a mudanças estruturais da fibra de cromatina (Figura 1).

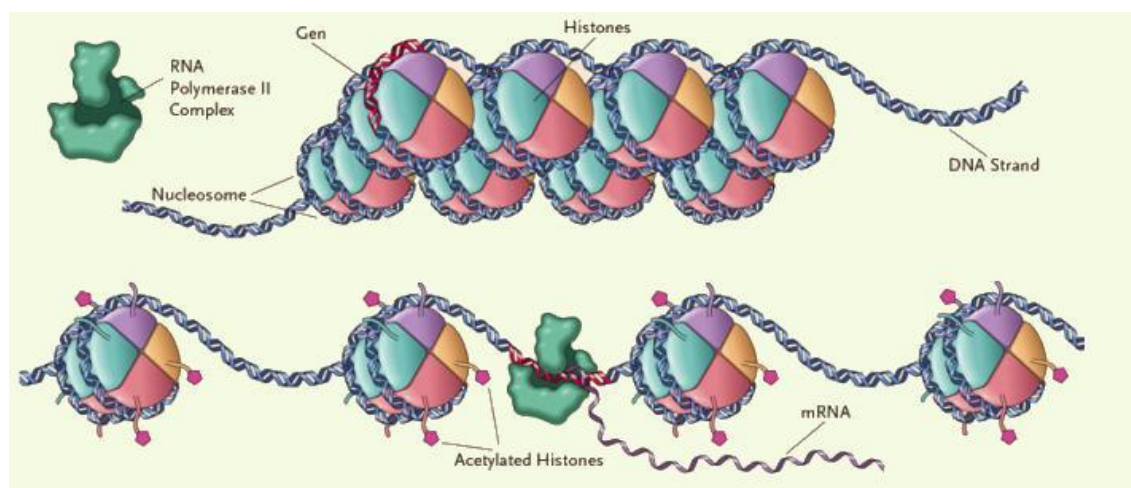


Figura 1: Cromatina. A acetilação das caudas N-terminais das histonas causa alteração na arquitetura da cromatina e possibilita acesso da RNA polimerase II à porção do DNA referente a um gene hipotético, em vermelho. (disponível em <http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/>).

Para que a transcrição e outros processos nucleares ocorram é preciso que grandes complexos proteicos (contendo fatores de transcrição, remodeladores de

cromatina dependentes de ATP, enzimas etc.) tenham acesso ao DNA. As sinalizações realizadas por estas proteínas envolvem uma dinâmica molecular que abrange pequenas moléculas (água, sais, lipídeos) e a cromatina. Desequilíbrios nestas sinalizações estão relacionados a diversas doenças, como demência, síndrome metabólica e câncer (MCKENNA; O'MALLEY, 2010).

Para dirigir o acesso de proteínas ao DNA é necessária a fina regulação do grau de empacotamento da fibra de cromatina, que é principalmente ditado por três fatores: a epigenética das histonas, a presença de cátions divalentes, como o magnésio, e a presença da *linker* histona, proteína que causa o dobramento da fibra (LI; REINBERG, 2011).

No que tange à epigenética, modificações pós-traducionais das porções N-terminais (caudas) básicas das histonas podem ser determinantes da regulação transcricional. Quando acetilada, a cauda da histona H4 perde a afinidade por outro nucleossomo, interferindo no grau de compactação da cromatina (ROBINSON et al., 2008) (Figura 1). Esta interação da cauda da H4 ocorre numa região presente na superfície proteica dos nucleossomos chamada *patch* ácido, que é alvo de ligação de diversas outras proteínas à cromatina (BARBERA et al., 2006; MAKDE et al., 2010; ARMACHE et al., 2011; KATO, H. et al., 2013).

Este trabalho segue dividido em duas partes. A primeira traz um panorama acerca do papel da água na manutenção da estrutura da cromatina. Verificamos a ação de detergentes sobre a arquitetura da fibra da cromatina, buscando condições de maior estabilidade das fibras. A segunda fração, para a versão pública, foi removida, por motivo de redação de patente.

Enfim, antes da divisão, há uma introdução comum englobando a estrutura da cromatina e sua compactação, com a finalidade de ambientar o leitor neste vasto universo de regulação de processos celulares através da cromatina.

INTRODUÇÃO

Estrutura da Cromatina

Há algumas décadas, o estudo da estrutura da cromatina vem tendo destaque entre as preferências dos biólogos moleculares. Em 2009, o artigo “Structures of Desire”, publicado na revista Nature, trouxe uma relação de estruturas altamente desejadas pelos cristalógrafos (BHATTACHARYA, 2009). Dentre elas, figurava a estrutura da cromatina de alta ordem. Se um novo artigo com o mesmo mote fosse publicado hoje, provavelmente ainda relacionaria essa estrutura no rol das mais ambicionadas da atualidade. Além da estrutura, o entendimento da regulação da arquitetura da cromatina, por interferir diretamente em desfechos de importantes processos celulares, é tido hoje como um grande desafio para a ciência.

A cromatina é formada, basicamente, por complexos de DNA e proteínas, o que possibilita a acomodação de quase dois metros de DNA dentro do núcleo de cada célula humana. Intrigantemente, o processo de empacotamento do DNA é fina e dinamicamente regulado por outras moléculas nucleares, tanto pequenas moléculas como outras proteínas com atividade enzimática e/ou remodeladora da cromatina.

As histonas são as principais proteínas envolvidas no enovelamento do DNA, formando os nucleossomos.

Partícula Central do Nucleossomo (NCP)

O nucleossomo é a unidade repetitiva básica da cromatina (Figura 2a). A primeira estrutura atômica de um nucleossomo, resolvida por cristalografia em 1997 com resolução de 2,8 Å, foi obtida utilizando-se sequência de DNA α -satélite e histonas recombinantes (LUGER, K et al., 1997). Esta estrutura definiu a partícula central do nucleossomo (NCP). Um NCP é composto por cerca de 147 pares de

bases de DNA que enovelam, com 1,7 voltas, um complexo proteico designado octâmero de histonas (HO).

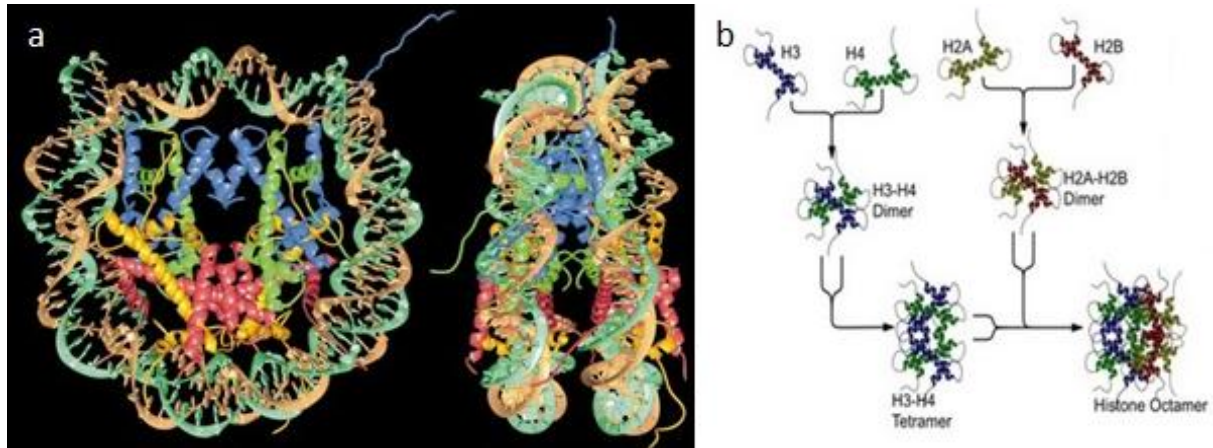


Figura 2: Nucleossomo. **(a)** Vistas frontal e lateral da estrutura cristalográfica de um nucleossomo. H2A em amarelo; H2B em rosa; H3 em azul, H4 em verde, fitas de DNA em turquesa e laranja. É possível observar as caudas protuberantes das histonas do octâmero (Extraído de Luger, K. et al., 1997) **(b)** Esquema representando a formação dos dímeros de H2A-H2B e do tetrâmero de 2H3-2H4, em que é possível visualizar os domínios globulares e as caudas flexíveis das histonas (disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Histona>).

O HO é formado por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Em solução, as histonas H2A e H2B apresentam-se na forma de dois heterodímeros e H3 e H4 formam um tetrâmero (Figura 2b). Com a associação destes complexos (2 dímeros e 1 tetrâmero) forma-se o HO (Figura 2b). As histonas do octâmero possuem um domínio globular bastante conservado evolutivamente, ao redor do qual a dupla fita de DNA se enrola, e um domínio N-terminal, denominado cauda. As caudas N-terminais das histonas do octâmero são desestruturadas, flexíveis e ricas em resíduos de arginina e lisina, o que lhes confere carga altamente positiva no ambiente celular. Além disso, essas caudas são protuberantes, estendendo-se em solução para fora do NCP (LUGER, K et al., 1997) (Figura 2a). A histona H2A possui também a extremidade C-terminal na forma de cauda protuberante, localizada na região de entrada e saída do DNA no nucleossomo. A função desta cauda da H2A é ainda pouco conhecida, entretanto, foi demonstrado que pode interagir com uma *linker* histona H1, uma histona que não faz parte do NCP, mas está envolvida com a compactação da cromatina (ROBINSON et al., 2008; ROUTH et al., 2008; LI et al., 2010; LI; REINBERG, 2011). Ainda, este domínio C-terminal da H2A está envolvido na regulação da dinâmica do

nucleossomo, bem como na mobilidade da própria H2A (VOGLER et al., 2010). A conexão entre dois nucleossomos é feita por um pedaço de DNA conhecido como *linker DNA*, de comprimento variável (PRUNELL; KORNBERG, 1982). Em vertebrados, o comprimento do *linker DNA* pode variar aproximadamente entre 20 pb e 70 pb (VAN HOLDE, 1989).

Acredita-se que o nucleossomo atua como um silenciador gênico, impedindo o acesso de fatores de transcrição e maquinaria transcricional basal aos genes localizados em regiões do DNA envolvidas no enovelamento de HO (Figura 1). De fato, para que ocorra a transcrição gênica é necessário que a RNA polimerase II (RNA Pol II) invalide a barreira nucleossomal, liberando a elongação do transcrito (PETESCH; LIS, 2012). A barreira nucleossomal para a transcrição consiste de diversos componentes que dificultam, em diferentes graus, a transcrição gênica, como as caudas das histonas, os contatos entre histona e DNA e a sequência de DNA (BINTU et al., 2012).

Estudos de dinâmica molecular, procurando entender de que forma ocorre o desenrolamento do DNA nucleossomal, mostraram que as caudas das histonas estabilizam o complexo e tornam as interações DNA-proteína assimétricas, dependendo do padrão de contato com o DNA. Tal assimetria poderia, então, motivar o desenrolamento do DNA por um lado do nucleossomo, em detrimento do outro, ao menos na escala de tempo de nanossegundos (ETTIG et al., 2011). Comparativamente, na ausência das caudas das histonas, a interação entre DNA e proteínas, no nucleossomo, é bastante enfraquecida ou, de outra forma, as caudas das histonas têm papel de estabilizar os nucleossomos (ETTIG et al., 2011), o que ratifica o papel destas estruturas flexíveis e protuberantes na manutenção da estrutura do nucleossomo.

Hoje, sabe-se que, além de seu papel repressor, o nucleossomo também atua na ativação da expressão gênica (WYRICK et al., 1999) e a coordenação adequada deste balanço depende de diversas proteínas correguladoras já conhecidas e, possivelmente, de muitas outras que ainda serão descritas.

Funcionalmente, o posicionamento dos nucleossomos nos cromossomos é de notável importância na regulação de processos celulares.

Posicionamento de nucleossomos

O posicionamento de octâmeros de histonas sobre a dupla hélice *in vivo* é influenciado, dentre outros fatores nucleares, pela sequência do DNA (SEGAL; WIDOM, 2009). Na década de 90, uma extensa pesquisa realizada em biblioteca de moléculas de DNA sintéticas e aleatórias resultou na descoberta de uma sequência de forte posicionamento de nucleossomos, isto é, que possui alta afinidade por octâmeros de histonas e certo comprimento fixo de repetição (LOWARY; WIDOM, 1998). Essa sequência, que ficou conhecida como 601 Widom, é amplamente utilizada na literatura e foi empregada para a realização dos ensaios de reconstituição da cromatina *in vitro* descritos neste trabalho.

Além dos contatos entre DNA e histonas no NCP, o contato entre as duas voltas de dupla hélice que cingem o HO também contribui para a oclusão estérica do DNA (SEGAL; WIDOM, 2009). Ademais, a curvatura acentuada adotada pelo DNA nucleossomal, bem como a torção assumida pela dupla hélice ao formar o NCP (LUGER, K et al., 1997) prejudicam a ligação de outras proteínas ao DNA (SEGAL; WIDOM, 2009), interferindo na consequência funcional do posicionamento dos nucleossomos.

Outros fatores que interferem no posicionamento de nucleossomos incluem a metilação do DNA, a presença de variantes e/ou modificações pós-traducionais de histonas, a própria estrutura quaternária da cromatina (chamada estrutura de alta ordem) e a ação de outras proteínas (SEGAL; WIDOM, 2009).

Linker Histona

Uma quinta histona, chamada *linker* histona (LH), participa da organização da cromatina sem estar envolvida na formação do NCP. Sua ligação ao nucleossomo promove aumento na organização e compactação da estrutura da cromatina.

Usando diferentes arranjos longos de nucleossomos, com tamanhos de *linker* DNA distintos, Routh e colegas mostraram que a ligação da LH à cromatina *in vitro* promove aumento na sua compactação em níveis tanto mais altos quanto maior for o

tamanho do *linker* DNA, chegando a uma espessura média de 34,3 nm para o arranjo 197.61 (61 nucleossomos e *linker* DNA de 50 pares de bases) e 21,3 nm para o arranjo 167.80 (80 nucleossomos e *linker* DNA de 20 pares de bases) (ROUTH et al., 2008). Comparando a compactação do arranjo 197.61 à compactação de cromatina extraída de fígado de rato, com aproximadamente o mesmo tamanho, por ultracentrifugação analítica, foi demonstrado, ainda, que apenas em presença da LH é alcançado o nível de compactação da cromatina nativa (ROUTH et al., 2008). Ademais, um experimento usando células-tronco embrionárias de camundongos evidenciou que a depleção de cerca de 50% da quantidade normal de H1 causou mudanças dramáticas na estrutura da cromatina, incluindo redução global do espaçamento entre nucleossomos e diminuição local da compactação da cromatina, embora apenas um pequeno número de genes tenha tido sua expressão afetada (FAN, Y et al., 2005). Imagens de microscopia eletrônica mostraram a diminuição local da compactação da cromatina: a amostra com depleção de H1 apareceu de forma menos compacta e com maior variabilidade de conformação (FAN, Y et al., 2005) (Figura 3).

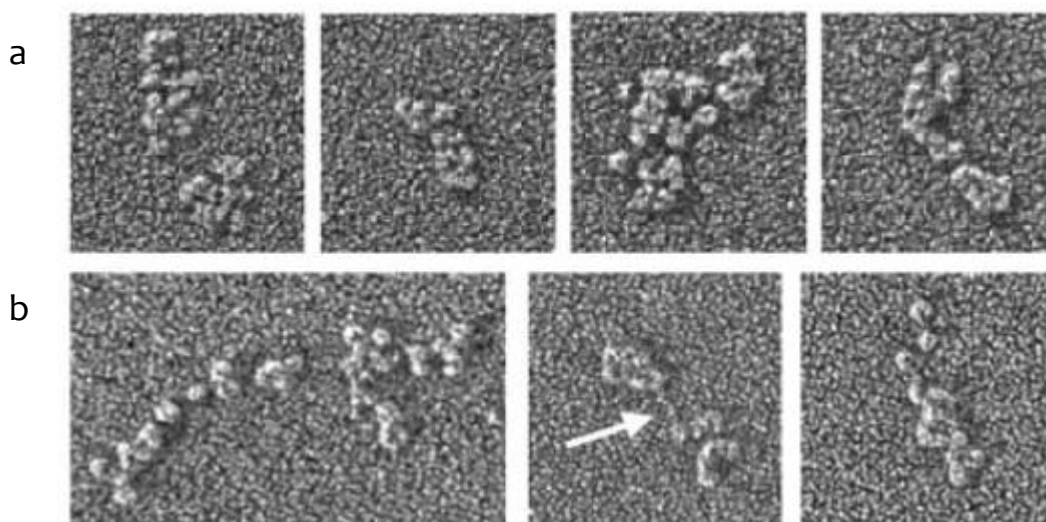


Figura 3: Alteração da arquitetura da cromatina causada pela depleção de H1. **(a)** cromatina *wild type* e **(b)** com depleção de 50% de H1. A seta branca representa região de menor compactação da cromatina (Adaptado de Fan et al., 2005)

Basicamente, existem dois tipos de LH: a H1, que é encontrada em células humanas e a H5, que está presente em eritrócitos de galinha e que possui algumas lisinas substituídas por argininas em diversas regiões de sua sequência primária. A

linker histona H5, em solução, possui um domínio globular e duas caudas relativamente livres e desestruturadas, sendo uma longa C-terminal e outra N-terminal, mais curta (AVILES et al., 1978).

Quando ligado ao nucleossomo, o domínio globular da LH é suficiente para proteção de 20 pares de bases adicionais do DNA nucleossomal, garantindo que o nucleossomo assumira a forma de cromatossomo. O cromatossomo, portanto, consiste de cerca de 166 pares de bases de DNA, um octâmero de histonas e uma H1 (THOMAS, J., 1984) (Figura 4).

Experimentos usando marcação radioativa demonstraram que as lisinas mais protegidas da H5, pela associação com a cromatina, pertencem ao domínio globular (THOMAS; WILSON, 1986). Desta forma, especula-se que este domínio, tanto da H1 quanto da H5, seja o responsável pela ligação da LH ao nucleossomo, enquanto a cauda C-terminal poderia ligar-se ao *linker* DNA entre os nucleossomos (RAMAKRISHNAN, 1997).

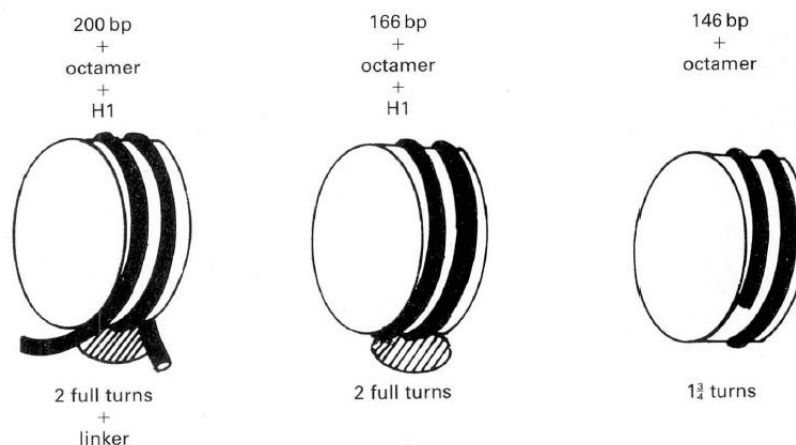


Figura 4: Modelo da relação entre nucleossomo, cromatossomo e partícula central do nucleossomo. A presença da *linker* histona garante envolvimento de 20 pb adicionais ao nucleossomo, formando o cromatossomo. Em hachura, representada a *linker* histona, DNA em preto e octâmero de histonas em branco. Adaptado de Thomas, 1984.

Sabemos, então, que a ligação da LH é determinante para a definição da arquitetura da cromatina e, conseqüentemente, para a resposta transcricional. Todavia, outros fatores participam da modulação da estrutura da cromatina, como a epigenética, especialmente as modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas do octâmero.

Modificações pós-traducionais de histonas – epigenética

As enzimas que causam modificações pós-traducionais (PTMs) nas histonas estão intimamente relacionadas com a remodelação da cromatina, sendo inclusive componentes de complexos correguladores (O'MALLEY et al., 2012). As PTMs de histonas podem alterar interações diretas entre nucleossomos, bem como servir de alvo para reconhecimento por outras proteínas (MUSSELMAN et al., 2012).

Em meio às diversas PTMs que ocorrem nas caudas N-terminais das histonas, a acetilação reversível de resíduos de lisina merece destaque e vem sendo estudada desde a década de 80 (VIDALI et al., 1968). As acetiltransferases de histonas (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) são responsáveis por realizar estas acetilações e sua reversão, ou desacetilações, respectivamente (Figura 5). A acetilação tem como consequência a neutralização da carga positiva dos resíduos de lisina, por meio da modificação química do grupamento $-NH_3^+$ da cadeia lateral destes resíduos por um grupo acetil (Figura 5).

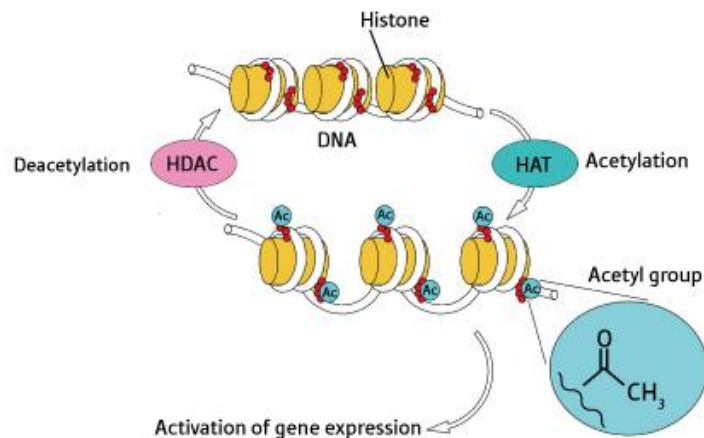


Figura 5: Ação das enzimas acetiltransferase de histonas (HAT) e deacetilase de histonas (HDAC) sobre a cromatina. A acetilação da cromatina pela HAT causa diminuição em sua compactação, possibilitando a expressão gênica. De maneira contrária, a desacetilação da cromatina pela HDAC causa aumento na compactação. Disponível em <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/5568>.

Outras PTMs que ocorrem em caudas N-terminais de histonas incluem metilação e ubiquitinação de lisinas, metilação de argininas e fosforilação de serinas, treoninas, e tirosinas. Essas PTMs transformam as caudas modificadas

quimicamente em alvos específicos de outras moléculas que podem lê-las (MUSSELMAN et al., 2012), ditando caminhos posteriores de recrutamento de, por exemplo, enzimas e outras proteínas (VICENT et al., 2011). Em alguns casos, a abertura da cromatina por complexos remodeladores é necessária para uma posterior acetilação das caudas de histonas (DILWORTH et al., 2000). Em outros casos, o recrutamento de complexos remodeladores da cromatina deve preceder a ligação da RNA Pol II e acetilação de histonas, criando sítios de ligação para proteínas remodeladoras da cromatina (AGALIOTI et al., 2000).

A epigenética das histonas pode afetar diretamente a compactação da cromatina (Figura 5). Um estudo demonstrou que, mesmo em presença de H1, apenas quando as histonas do octâmero foram desacetiladas enzimaticamente alcançou-se o nível máximo de condensação da cromatina, evidenciado por métodos bioquímicos e microscopia eletrônica (LI et al., 2010). Outros estudos demonstraram que a cauda da H4 é crucial para a compactação da cromatina (DORIGO et al., 2003) e que a acetilação da lisina 16 da cauda desta histona (H4K16Ac) reduz a compactação da fibra (ROBINSON et al., 2008). O mecanismo molecular central para explicar este fenômeno envolve a interação da cauda da H4 com o *patch* ácido (LUGER, K et al., 1997; YANG, D.; ARYA, 2011), uma região específica do nucleossomo cujas características e função serão esclarecidas nas próximas seções deste trabalho.

O *patch* ácido

No nucleossomo, cada um dos dois heterodímeros de H2A e H2B apresentam, em sua superfície, oito aminoácidos (seis pertencentes à H2A e dois à H2B) que contêm carboxilas em suas cadeias laterais (ácidos aspártico e glutâmico). Estes aminoácidos são os principais componentes de uma região bem contornada chamada *patch* ácido (Figura 6) (KALASHNIKOVA et al., 2013).

Considerando que o pKa dos ácidos aspártico e glutâmico é próximo de 3 e 4,3, respectivamente, podemos esperar que esta região adote carga negativa no ambiente nuclear. De fato, um mapa da superfície do nucleossomo obtido com a ferramenta APBS por meio do PyMOL, apresentado na figura 6a, mostra essa

diferença de potencial eletrostático na região do *patch* ácido, evidenciando que ela possui caráter mais ácido que o restante do nucleossomo (KALASHNIKOVA et al., 2013).

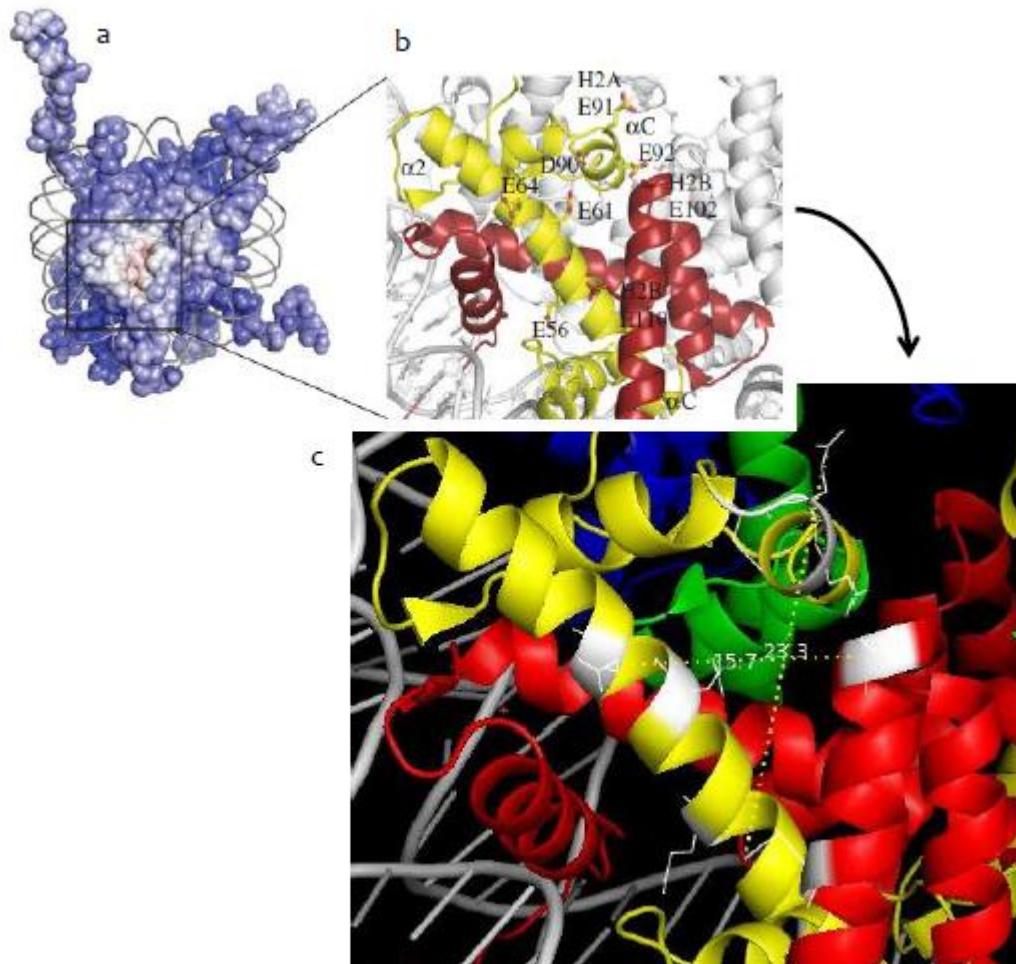


Figura 6: O *patch* ácido. **(a)** Vista do potencial eletrostático do nucleossomo. A escala de cores corresponde a faixa de -25 kTe^{-1} (vermelho) a $+25 \text{ kTe}^{-1}$ (azul). Código PDB 1KX5. **(b)** Vista aproximada do *patch* ácido, formado pelos resíduos da H2A (E56, E61, E64, D90, E91, E92) e H2B (E102, E110). H2A em amarelo e H2B em vermelho. Código PDB: 1KX5. **(c)** Vista aproximada do *patch* ácido mostrando distâncias entre limites em ângstroms. Resíduos componentes do *patch* ácido são mostrados em branco e cadeias laterais estão presentes representadas por linhas. H2A em amarelo; H2B em vermelho; H3 em azul; H4 em verde; DNA em cinza. Código PDB 1AOI. **(a)** e **(b)** extraídos de Kalashnikova et al., 2013.

O *patch* ácido é alvo de ligação de proteínas com função remodeladora da cromatina, além da cauda da H4 de outro nucleossomo, estando envolvido na compactação da cromatina (LUGER, K et al., 1997; YANG, D.; ARYA, 2011). Quatro interações proteína:*patch* ácido foram estudadas em nível atômico por cristalografia. Suas estruturas e os achados consequentes, bem como outros derivados de modelos computacionais, estão detalhados na Parte II deste trabalho.

O *patch* ácido apresenta-se sob a forma de um sulco estreito e alguns aminoácidos da H2A definem um bolso não-polar ao longo da parte inferior deste sulco. Em termos de tamanho, o *patch* ácido é grande o suficiente para acomodar motivos proteicos como α -hélices, alças, *hairpin* etc. (KALASHNIKOVA et al., 2013), medindo cerca de 23 ângstrons de comprimento por 16 ângstrons de largura (considerando as maiores distâncias entre as cadeias laterais dos aminoácidos componentes da região) (Figura 6c).

O *patch* ácido é importante também para a compactação da cromatina, à medida que cauda da H4 de outro nucleossomo pode interagir nesta região (LUGER, K et al., 1997), possibilitando a aproximação de nucleossomos distantes.

Compactação da Cromatina

A quantidade de DNA que é empacotada sob a forma de cromatina depende da espécie e pode chegar a espantosos bilhões de pares de bases por célula.

Para entendermos como mecanismos moleculares de alta importância para a manutenção do genoma e transcrição são regulados, faz-se necessário elucidar os fatores determinantes da compactação da cromatina.

A cromatina compacta-se em vários níveis sucessivos, a partir da dupla fita livre de DNA, para acomodar cerca de seis bilhões de pares de bases (no caso da espécie humana) dentro dos núcleos de células diploides (ANNUNZIATO, 2008) (Figura 7). O nível menos denso de compactação, denominado *beads-on-a-string* ou “colar de contas”, tem espessura de aproximadamente 10nm e consiste de uma sequência de nucleossomos separados entre si pelo *linker DNA*. Um aumento na compactação, em presença da LH, culmina em fibra mais compactada, com aproximadamente 30nm de espessura. Níveis ulteriores de compactação são alcançados, compreendendo até o nível máximo do cromossomo (Figura 7).

Em termos de ativação ou inativação transcricional, a cromatina em organismos eucariotos, de maneira simplificada, pode ser dividida em dois grupos extremos: uma forma geralmente ativa, conhecida como eucromatina e uma forma

geralmente inativa (silenciada) chamada de heterocromatina (BASSETT et al., 2009). Observa-se que, quando a cromatina está em sua estrutura relaxada (eucromatina), existe um fácil acesso dos fatores de transcrição a regiões do DNA livres de nucleossomo, podendo assim haver regulação da transcrição. Por outro lado, quando a cromatina está compactada (heterocromatina), fatores de transcrição, corretores e a maquinaria transcritiva basal não conseguem acessar o DNA para ativar ou reprimir a expressão gênica. Desta forma, pode-se dizer que a cromatina, por si só, constitui o principal regulador da expressão de genes-alvo (BINTU et al., 2012).

O dobramento da cromatina é também dependente de sal, ou seja, depende da força iônica do meio.

Um estudo sistemático mostrou os efeitos da força iônica sobre a morfologia de fibras de cromatina em presença e ausência de H1, por microscopia eletrônica. Com o aumento da força iônica, a cromatina se dobra progressivamente, desde um filamento de nucleossomos em 1 mM de sal monovalente até uma fibra grossa de 250 Å em presença de 60 mM (ou 0,3 mM de Mg²⁺) (Figura 8). A compactação também foi crescente com aumento da força iônica em ausência de H1, porém, menos intensa e gerando fibras menos bem definidas do que em sua presença (THOMA et al., 1979). Em força iônica muito baixa, viu-se que nucleossomos estavam presentes apenas em presença da H1 (THOMA et al., 1979).

Recentemente, outro estudo demonstrou a relação existente entre a força iônica e a compactação da cromatina. Experimentos de ultracentrifugação analítica usando um arranjo de DNA de 177 pares de bases repetidos 12 vezes (177.12) foram realizados em presença de diferentes cátions (KOROLEV et al., 2010). Observou-se que, dependendo do sal e da valência do cátion (+1 a +4), a concentração necessária para se alcançar o dobramento máximo da fibra (verificado pelo valor de coeficiente de sedimentação) variou numa faixa de quase cinco ordens de magnitude, sendo que quanto maior a valência do cátion, menores concentrações eram necessárias para atingir a compactação máxima (KOROLEV et al., 2010). Para o cátion Mg²⁺, utilizado neste trabalho com a finalidade de possibilitar o dobramento da cromatina *in vitro*, a concentração de 1 mM foi suficiente para alcançar o valor

máximo de coeficiente de sedimentação do arranjo estudado (KOROLEV et al., 2010).

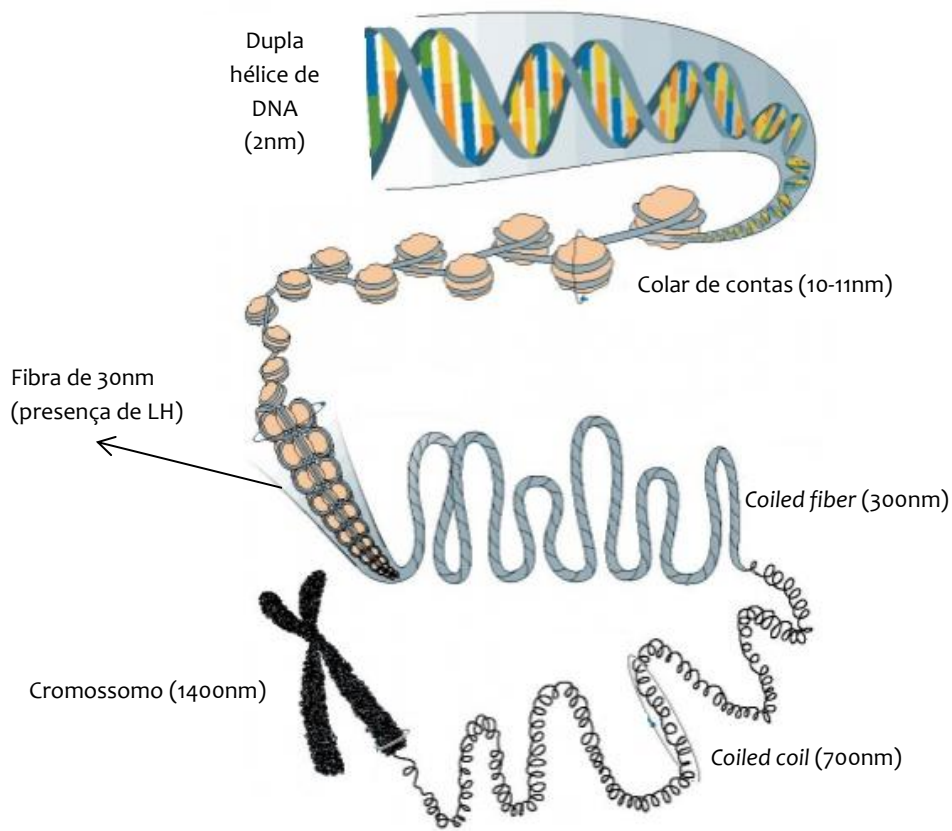


Figura 7: Compactação da cromatina em eucariotos. Níveis sucessivos de compactação são mostrados, partindo do DNA livre, passando pelas fibras de 10nm, também chamada colar de contas, e de 30 nm, até alcançar níveis ulteriores, que culminam com a compactação máxima, representada pelo cromossomo (adaptado de www.materiaestudada.blogspot.com.br).

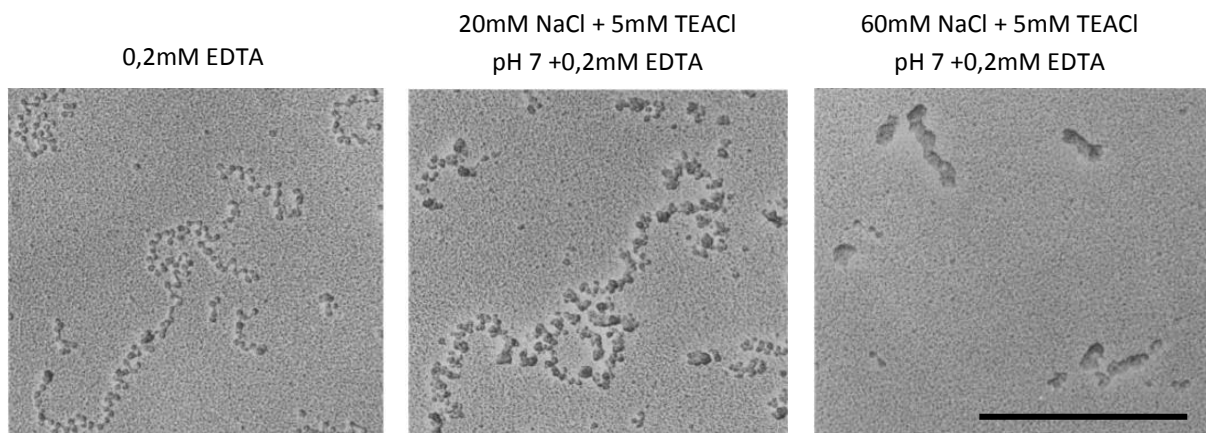


Figura 8: Relação entre morfologia da fibra de cromatina e força iônica. Imagens de microscopia eletrônica de cromatina extraída de fígado de rato são mostradas em diferentes concentrações de sais (descritas acima das imagens). A compactação da cromatina aumenta com o aumento da força iônica. A barra corresponde a 5000 Å. Adaptado de THOMA et al., 1979.

Fibra de cromatina compactada (fibra de 30nm)

A existência *in vivo* da fibra de cromatina de 30 nm ainda é controversa (MAESHIMA et al., 2010). Todavia, evidências *in vitro* de estudos estruturais, especialmente microscopia eletrônica, bioquímicos e biofísicos, como ultracentrifugação analítica, indicam fortemente sua existência (FINCH; KLUG, 1976; ROBINSON et al., 2006; ROUTH et al., 2008). Até o momento, a estrutura da fibra longa de cromatina de alta ordem (30 nm) não foi resolvida.

Funcionalmente, a forma de dobramento da fibra de 30 nm pode ter grande impacto para o controle de processos celulares como a transcrição. Isso porque, dependendo da forma adotada, o contato entre nucleossomos pode ser alterado (Figura 9), modificando o acesso de fatores de transcrição, corretores etc. a regiões específicas do DNA.

Basicamente, existem na literatura dois modelos conflitantes de estrutura atômica da fibra de cromatina de 30 nm (Figura 9):

- Modelo hélice de um início (*one-start helix*) ou solenoide (Figura 9a):

Nucleossomos adjacentes são conectados por um pedaço de *linker* DNA dobrado entre eles, formando uma hélice única e contínua, com 6-8 nucleossomos por volta (FINCH; KLUG, 1976; WIDOM; KLUG, 1985);

- Modelo de hélice de dois inícios (*two-start helix*) ou zigue-zague (Figura 9b):

Ilustrado por uma ligação direta (reta) feita pelo *linker* DNA entre nucleossomos adjacentes, formando duas pilhas contínuas de nucleossomos. Este modelo é baseado no arranjo zigue-zague de nucleossomos observado por análise da cromatina em tampões com baixa força iônica, por microscopia eletrônica (WOODCOCK, C L et al., 1984; DORIGO et al., 2004).

Uma notável diferença entre os dois modelos está na interação entre nucleossomos em sequência. No modelo solenoide a hélice é mais larga, compreendendo de 6 a 8 nucleossomos para encerrar uma volta, e assim o primeiro nucleossomo faz contato com o sétimo. No modelo zigue-zague, o contato do

primeiro nucleossomo é com o terceiro, pois o caminho traçado pelo *linker* DNA é para frente e para trás. Desta forma, o segundo nucleossomo interage com o quarto, o terceiro com o quinto e assim por diante (Figura 9).

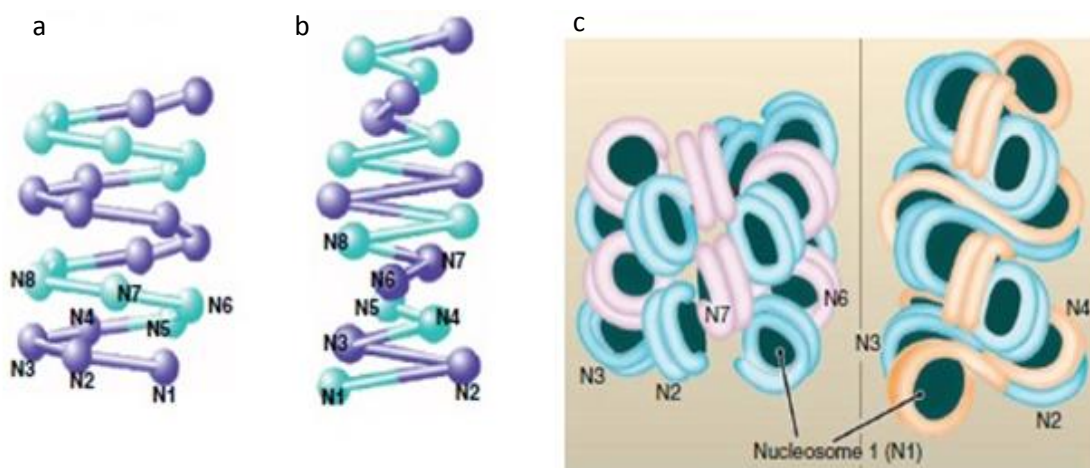


Figura 9: Modelos da fibra de cromatina de 30nm. **(a)** modelo solenoide, ou hélice de um início, onde cerca de 6 a 8 nucleossomos são necessários para encerrar uma volta completa da hélice; **(b)** modelo zigue-zague, ou hélice de dois inícios, no qual o *linker* DNA faz trajetória para frente e para trás, formando duas pilhas de nucleossomos; **(c)** Representação de empilhamento de nucleossomos nos dois modelos, solenoide à esquerda e zigue-zague à direita. (Adaptado de Li & Reinberg, 2011)

Por cristalografia, uma sequência de quatro nucleossomos (oligonucleossomo) foi resolvida a uma resolução de 9 Å (SCHALCH, T et al., 2005). Esta estrutura, resolvida com base na estrutura previamente publicada de um mononucleossomo (LUGER, K et al., 1997), mostrou que o *linker* DNA traça um caminho em zigue-zague para frente e para trás entre duas pilhas de nucleossomos, que formam uma hélice de dois inícios truncada, não seguindo o caminho compatível com a hélice de um início (solenóide) (SCHALCH, T et al., 2005). Entretanto, essa estrutura foi obtida na ausência de LH.

Como já mencionado, a fibra de 30 nm não teve até hoje sua existência comprovada *in vivo*. Entretanto, por adotar consistentemente esta forma *in vitro*, inclusive com dimensões e aparência semelhantes às de cromatina nativas extraídas de núcleos, acredita-se que represente um nível de dobramento existente *in vivo* (VAN HOLDE, 1989).

O tamanho do *linker* DNA em um arranjo de cromatina é decisivo para o nível de compactação que a fibra pode alcançar. Utilizando microscopia eletrônica e

arranjos de nucleossomos longos reconstituídos *in vitro* na presença de LH, Robinson e colegas encontraram duas classes estruturais: (i) arranjos com *linker* DNA de tamanho entre 10 e 40 pares de bases (incrementos de 10 em 10) alcançaram espessura média de 33 nm; (ii) arranjos com *linker* DNA com tamanho entre 50 e 70 pares de bases (incrementos de 10 em 10) produziram fibras com 44 nm de espessura média (ROBINSON et al., 2006). Além disso, a razão de empacotamento de nucleossomos, que é definida como a quantidade de nucleossomos por 11 nm, também foi medida e observou-se que, para o primeiro caso, o valor foi de 11 NCP por 11 nm e para o segundo caso, 15 NCP por 11nm (ROBINSON et al., 2006). Baseando-se nos impedimentos físicos impostos por essas medidas, construíram, ainda, um modelo em que o empacotamento de nucleossomos é alcançado através da “interdigitação” de nucleossomos de hélices adjacentes (ROBINSON et al., 2006). Esse modelo concorda com o modelo solenoide, ou hélice de um início e não é consistente com o modelo zigue-zague, ou hélice de dois inícios.

OBJETIVOS GERAIS

Estudar a formação e a arquitetura da cromatina.

Parte I – Identificar fatores determinantes para a formação de fibras de cromatina mais estáveis, que auxiliem futuros estudos estruturais.

Parte II – Interferir na compactação da cromatina, através de uma nova estratégia farmacológica.

PARTE I

Ação dos detergentes Triton X-100 e CHAPS
sobre a fibra de cromatina

INTRODUÇÃO

Macromoléculas em solução aquosa

Soluções aquosas de macromoléculas são profundamente influenciadas pelo comportamento físico e químico da água. Uma solução de uma proteína, por exemplo, pode conter moléculas de água em três diferentes níveis: moléculas pertencentes ao grande volume de solvente, que não são perturbadas pelo soluto; moléculas que interagem com a superfície do soluto; e moléculas profundamente inseridas em fendas ou cavidades internas da estrutura da macromolécula (SCHWABE, 1997). O nível de organização dessas moléculas de água varia de acordo com sua localização. Enquanto as moléculas do solvente estão dispersas de maneira desorganizada e com alto grau de agitação, aquelas inseridas na estrutura apresentam-se de maneira mais arranjada e as da superfície intercambiam-se com o solvente de maneira rápida. A organização destas moléculas resulta em certo custo entrópico, cuja minimização pode ser o fator motivador do “efeito hidrofóbico” de dobramento das proteínas (SCHWABE, 1997).

Em um nucleossomo, as interações entre DNA e HO dependem intensamente de ligações de hidrogênio, que podem ser diretas ou mediadas por moléculas de água presentes no meio. A estrutura cristalográfica com resolução de 1,9 Å de um mononucleossomo reconstituído com 147pb de DNA α -satélite e HO recombinante de *Xenopus laevis* (código PDB: 1KX5) possibilitou a modelagem ampla dos componentes do solvente e sua interação com o complexo nucleoproteico (DAVEY, C. et al., 2002). Nesta estrutura, a camada primária de hidratação (moléculas de água na distância máxima de 3,5 Å de algum átomo das histonas ou do DNA) do nucleossomo contém 2088 moléculas de água. Dessas, 1108 circundam o DNA, dentre as quais 302 são achadas dentro do sulco menor e têm a importância de facilitar a inserção de cadeias laterais de argininas das histonas (DAVEY, C. et al., 2002). 121 moléculas de água medeiam interações entre DNA e histonas (Figura 10), através de ligações de hidrogênio simultâneas com ambos (média de 3 ligações de hidrogênio por molécula de água, resultando em 358 no total). As ligações diretas

entre as macromoléculas, por outro lado, são em número de 116, ou seja, aproximadamente a mesma quantidade das interações via água. A maioria (83%) das interações mediadas por água é do tipo “facilitadora”, o que quer dizer que permite interação entre grupos que estão demasiado distantes ou mal orientados para poderem realizar a interação direta, normalmente envolvendo cadeias laterais básicas ou amidas peptídicas. Cadeias laterais de argininas ou lisinas, por exemplo, ganham uma extensão de uma molécula de água, garantindo seu alcance até o átomo de oxigênio de um grupamento fosfato no DNA (DAVEY, C. et al., 2002) (Figura 10). Ou seja, pode-se dizer que esta molécula de água causa uma acomodação da cadeia lateral do resíduo, o que faz com que essa interação possivelmente dependa menos da sequência de DNA para ocorrer.

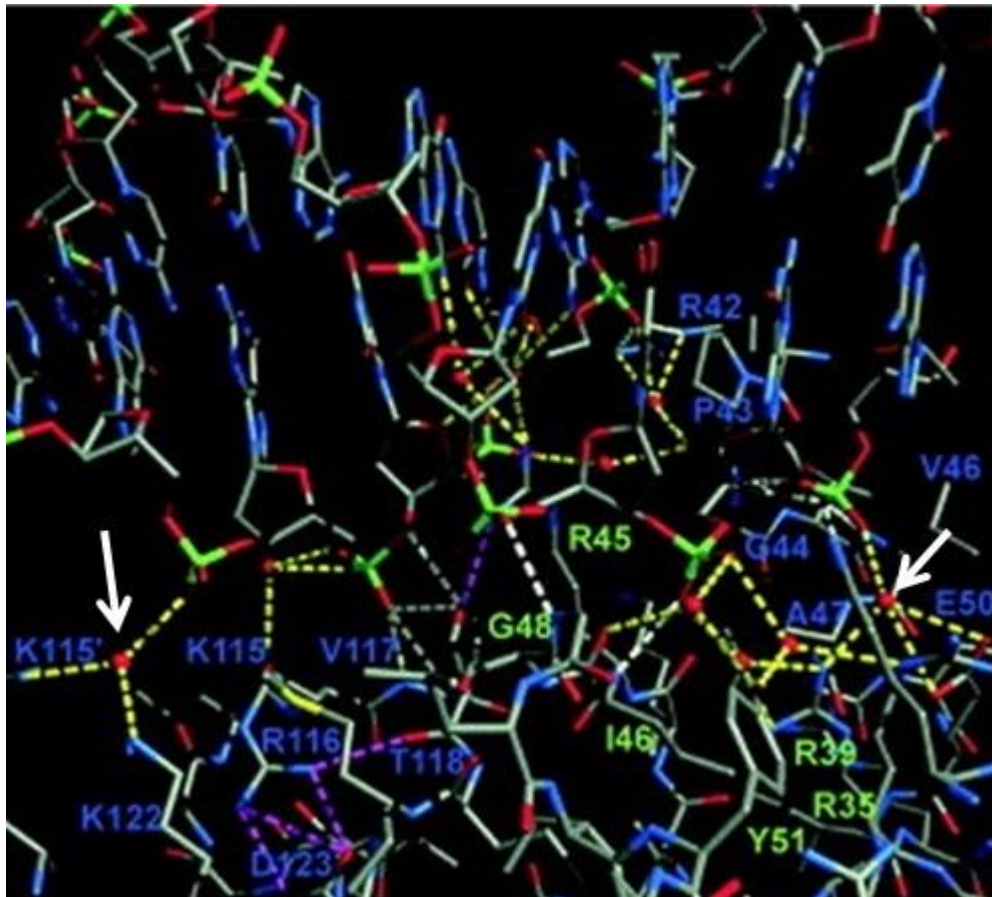


Figura 10: Ligações entre histonas e DNA mediadas por moléculas de água. Resíduos de aminoácidos interagindo com DNA estão indicados (H3, azul; H4, verde). Ligações de hidrogênio diretas (linha branca pontilhada) e mediadas por água (linha amarela pontilhada) estão representadas. Esferas vermelhas representam as moléculas de água e as setas brancas, exemplos de moléculas de água que possibilitam interações distantes entre resíduos de arginina e lisina e átomos de oxigênio pertencentes a grupos fosfato do DNA. Código PDB: 1KX5. (Adaptado de Davey, 2002)

Além de possibilitar interações entre átomos mais distantes, a ligação de hidrogênio mediada por molécula de água aumenta a estabilidade destas interações, em relação às ligações de hidrogênio diretas. Ademais, cátions divalentes posicionados em locais específicos no NCP contribuem para as interações DNA-histona e histona-histona (DAVEY, C. et al., 2002).

Não é tarefa simples calcular o ganho de estabilidade para o NCP que as ligações mediadas por água promovem, em relação às ligações diretas. Cada interação via molécula de água faz com que uma molécula de água a menos esteja na “forma” de solvente. Uma vez que a entropia da água livre é maior do que a entropia da água aprisionada, existe um custo entrópico para a ligação de uma molécula de água à macromolécula. Ainda, a ligação de uma molécula de água à macromolécula causa aumento de energia livre do sistema e quanto mais firme a ligação, maior essa energia (DUNITZ, 1994).

Se, no nucleossomo, as interações entre histonas e DNA são, em grande parte, mediadas por moléculas de água, essas mesmas interações em fibras longas de cromatina possivelmente seguirão padrão semelhante. Entretanto, por falta de informações ao nível atômico, ainda não se sabe como a água participa das interações internucleossomais para a formação da cromatina, especialmente em sua forma compactada. Desta forma, a ação de agentes desidratantes pode, ainda, nos fornecer indícios do papel da água nas fibras longas de cromatina.

Simulações da dinâmica e estrutura da cromatina por métodos computacionais podem trazer informações importantes sobre questões biofísicas da fibra. Porém, devido ao tamanho do complexo e ao fato de que as alterações estruturais de nucleossomos e da cromatina ocorrem em tempos extensos (microsegundos), não é simples obter informações sobre a movimentação da cromatina em solução por dinâmica molecular considerando todos os átomos separadamente. Para minimizar este problema, torna-se necessária uma abordagem do tipo *Coarse-grained*. Normalmente, esses modelos computacionais não consideram alguns fatores, incluindo moléculas de água moleculares, a fim de simplificar os cálculos (KOROLEV et al., 2012). Desta forma, é necessário considerar as limitações dos modelos computacionais que tentam desvendar a estrutura da fibra de cromatina, especialmente em relação à fibra de 30 nm que,

além de controversa, possivelmente depende fortemente de interações via solvente para se tornar estável.

Com o objetivo de estabelecer condições em que as fibras de cromatina de 10 nm e 30 nm apresentam maior estabilidade, ambicionando estudos estruturais futuros, inclusive de cristalização, pensamos em fazer o uso de detergentes. Os detergentes utilizados neste trabalho foram o Triton X-100 e o CHAPS. Trabalhamos com a hipótese de que estes agentes desidratantes, presentes em solução, podem interagir diretamente com as fibras, em regiões acessíveis ao solvente, ou ainda indiretamente, pela mobilização de moléculas de água. Esta mobilização causaria alterações nas forças eletrostáticas locais, o que poderia alterar a estabilidade das fibras, especialmente, por mudanças no perfil eletrostático das interações do complexo nucleoproteico.

Detergentes

Detergentes (ou surfactantes) são compostos químicos orgânicos e anfifílicos, isto é, possuem em sua molécula uma parte polar e outra apolar. Desta forma, têm a capacidade de interagir tanto com água, normalmente alterando sua tensão superficial (e, por isso, chamados tensoativos), quanto com solvente apolar. Em relação à porção hidrofílica, os detergentes podem ser classificados de acordo com sua carga em catiônicos, aniônicos, não iônicos ou zwitteriônico, sendo que este último consiste em molécula com cargas opostas, positiva e negativa, em igual número, resultando em composto neutro (LEMOS; AZEVEDO, 2013).

Se expusermos uma macromolécula em solução aquosa a um detergente, podemos esperar que haja, sem dúvida, modificações das características do solvente e, possivelmente, das forças eletrostáticas agentes nas macromoléculas, ao menos em sua superfície e em intensidade dependente da concentração de detergente.

Triton X-100 e CHAPS

O Triton X-100 é um detergente não iônico (Figura 11a) amplamente utilizado em laboratório, com diversas finalidades, entre elas a descelularização de tecidos derivados de animais (KAJBAFZADEH et al., 2013) e a solubilização de proteínas de membrana em seu estado nativo (CIERO et al., 2004; CHAE et al., 2013). O CHAPS, por sua vez, é um detergente zwitteriônico (Figura 11b) também utilizado em técnicas laboratoriais, especialmente na solubilização de macromoléculas biológicas, a exemplo de proteínas de membrana, sem causar desordens substanciais (CIERO et al., 2004; NAZARI et al., 2012).

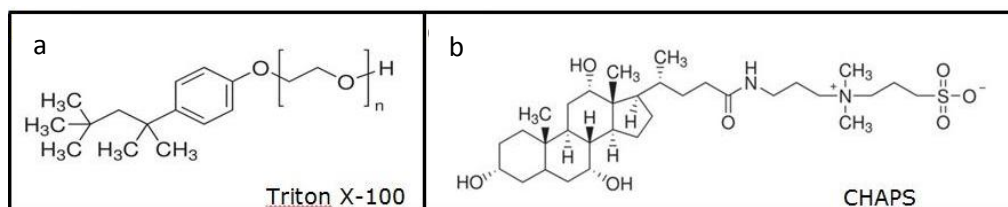


Figura 11: Estrutura dos detergentes Triton X-100 e CHAPS. **(a)** Fórmula estrutural do Triton X-100, detergente não iônico e **(b)** do CHAPS, zwitteriônico.

O principal objetivo deste trabalho foi, portanto, compreender os efeitos de agentes desidratantes (detergentes) sobre a estrutura das longas fibras de cromatina, a fim de se obter condições de maior estabilidade das fibras, além de informações sobre o papel da água nestas fibras. Para isto, trabalhamos na reconstituição das fibras de cromatina utilizando uma sequência de DNA sintética com regiões que possuem alta afinidade pelos HOs e, conseqüentemente, formação de nucleossomos. Esta sequência, conhecida como DNA 601 Widom (LOWARY; WIDOM, 1998), foi selecionada a partir de uma biblioteca sintética de DNAs, conforme descrito no início deste trabalho, na seção “Posicionamento de nucleossomos”. A grande vantagem do uso do DNA 601 Widom é a possibilidade de obtermos fibras de cromatina com quantidade estequiométrica de DNA, octâmero de histonas e *linker* histona.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Utilizando diferentes detergentes, encontrar condições de alta estabilidade para as longas fibras de cromatina visando futuros estudos estruturais ao nível atômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e purificação do DNA

Obtenção de arranjos de DNA

Os arranjos de DNA utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de plasmídeos pUC18, gentilmente cedidos pela pesquisadora Daniela Rhodes, do Laboratory of Molecular Biology (LMB) pertencente ao Medical Research Council (MRC), em Cambridge, Inglaterra. Estes arranjos foram obtidos pela multimerização de sequências com forte posicionamento de nucleossomo, conhecidas como DNA 601 (LOWARY; WIDOM, 1998). Neste trabalho, utilizamos os seguintes arranjos: 197.15 (15 repetições de 197 pares de bases); 197.25 (25 repetições de 197 pares de bases – esquema na figura 13) e 177.36 (36 repetições de 177 pares de bases). Além dos insertos de interesse, os plasmídeos continham genes de resistência a ampicilina, bem como sítios de restrição para diversas enzimas, como EcoRV, Haell, Ddel e Dral (Figura 12). As etapas de obtenção de DNA puro são descritas a seguir.

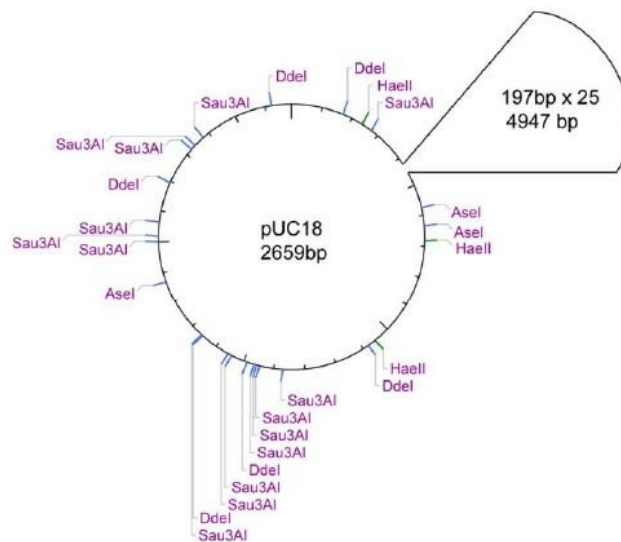


Figura 12: Mapa de restrição do plasmídeo pUC18 contendo 25 repetições de 197pb de DNA 601. Sítio de resistência a antibiótico, entre outros, não mostrados (Extraído de Routh, 2009).

Transformação e seleção bacterianas

A transformação é uma técnica por meio da qual se insere em células hospedeiras um DNA exógeno. Neste trabalho, foi utilizada a cepa DH5 α da bactéria *Escherichia coli* a fim de se obter a multiplicação dos plasmídeos de interesse.

Em tubos de centrífuga, foram misturados 1 μ g do DNA plasmidial de cada um dos arranjos de interesse a 50 μ L de uma suspensão de *E. coli* DH5 α e a mistura permaneceu durante 5 minutos em gelo. O tubo contendo a mistura foi transferido para banho-maria a 42°C, onde sofreu choque térmico por 45 segundos, etapa necessária para abrir os poros da membrana celular da bactéria, permitindo a entrada dos plasmídeos. A mistura foi novamente transferida para o gelo, onde permaneceu por 5 minutos. Adicionei à mistura 100 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB), contendo 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl em água destilada, sem a presença de antibiótico e incubei a 37°C por 30 minutos, sob agitação constante, para crescimento das bactérias (inclusive as não-transformadas). Posteriormente, 50 μ L da suspensão de bactéria obtida foram plaqueados e incubados por cerca de 18 horas a 37°C, em placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido (acrescido com 1,5% de ágar) com antibiótico (0,1 mg/mL de ampicilina), para seleção e crescimento de colônias transformadas.

Toda a manipulação foi feita por trás de chama de bico de gás, de forma a garantir zona de esterilidade.

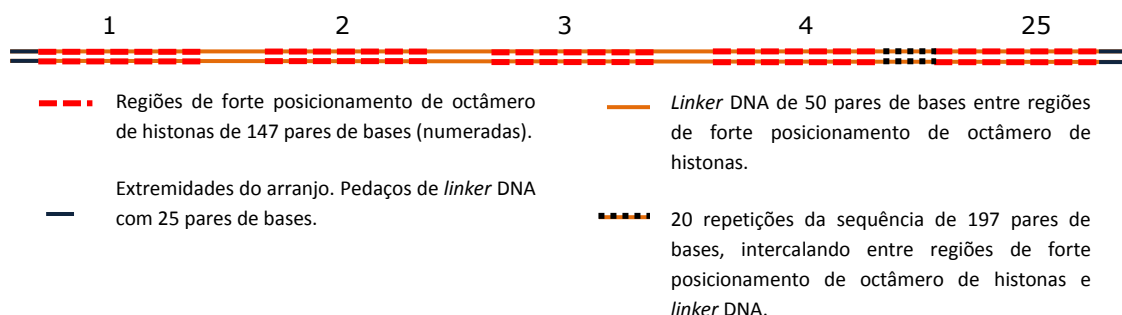


Figura 13: Esquema da dupla fita de um longo arranjo de DNA. O arranjo 197.25 consiste de 25 repetições de 197 pares de bases cada, sendo 147 pb de DNA 601 com forte posicionamento de octâmero de histonas intercalados com 50 pb de *linker* DNA.

Purificação do DNA plasmidial

Após a transformação e crescimento, uma colônia resistente a ampicilina foi transferida da placa de Petri para um tubo contendo 5 mL de meio de cultura LB estéril e a mesma concentração de ampicilina da etapa anterior. Este tubo foi incubado a 37°C por cerca de 8 horas e então seu conteúdo foi transferido para erlenmeyer com capacidade para 2.000 mL contendo 1.000 mL do mesmo meio de cultura LB estéril com ampicilina 0,1 mg/mL e incubei a 37°C, sob agitação constante a 200 rpm, por 18 horas. Foi realizado o protocolo de Maxi-Prep utilizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) da Universidade de Brasília (UnB), o qual consiste, em resumo, das seguintes etapas:

- Centrifugação a 5.700 rpm por 10 minutos – células no *pellet*;
- Ressuspensão do pellet com solução contendo glicose, tampão e EDTA, que desestabiliza a membrana celular permitindo a entrada de glicose na célula e seu inchaço;
- Adição de lisozima para digerir carboidratos de alto peso molecular da parede celular bacteriana (peptidoglicano);
- Adição de solução contendo hidróxido de sódio e SDS para desestabilização da membrana;
- Adição de solução contendo acetato de potássio e ácido acético, para aumentar o pH para próximo de 8 e precipitar DNA genômico bacteriano;
- Centrifugação 5.700 rpm por 20 minutos e filtração do sobrenadante por papel de filtro;
- Adição de isopropanol ao filtrado para precipitar DNA plasmidial;
- Centrifugação 5.700 rpm por 20 minutos e ressuspensão do pellet em água e adição de acetato de amônio
- Centrifugação 4.000 rpm por 30 minutos e adição de etanol absoluto ao sobrenadante para precipitação de DNA;
- Centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos e adição de RNase ao *pellet* para digestão de RNA bacteriano;
- Adição de mistura de PEG/NaCl para precipitar DNA;
- Centrifugação por 40 minutos a 13.000 rpm e ressuspensão do pellet em água ou tampão.

O DNA obtido foi então purificado com fenol:clorofórmio para remover contaminantes proteicos remanescentes.

Digestão do DNA plasmidial

O DNA plasmidial puro obtido de cada arranjo foi quantificado utilizando o equipamento NanoVue Plus da GE e posteriormente submetido a digestão enzimática para separar o inserto de interesse do esqueleto do plasmídeo. Para isto, foram utilizadas as enzimas de restrição EcoRV, DdaI, Drel e HaeII, fornecidas pela New England Biolab (NEB), na proporção de 1 unidade de enzima para 1µg de DNA. As digestões enzimáticas foram realizadas nas temperaturas, tempos e em presença dos tampões recomendados pela NEB (www.neb.com). Por eletroforese em gel nativo de agarose 1% foi possível visualizar as bandas e confirmar a digestão enzimática (Figura 14).

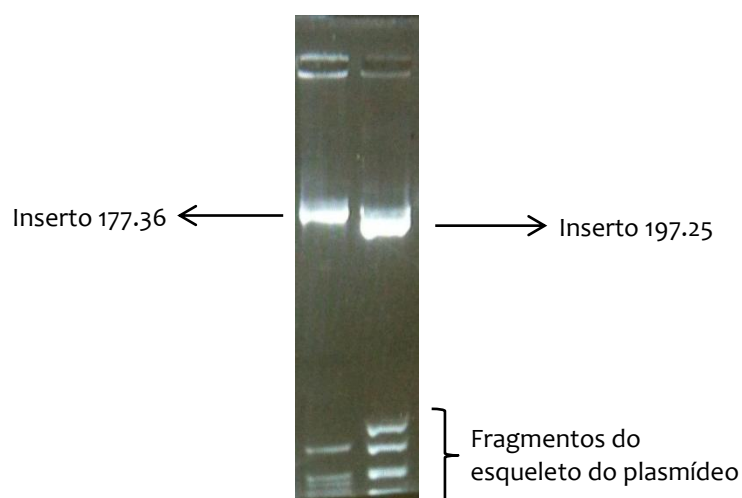


Figura 14: Arranjos de DNA 177.36 e 197.25 digeridos com enzimas de restrição.

Purificação do arranjo de DNA

Para separar os arranjos de DNA 601 dos fragmentos de plasmídeos, foi utilizada técnica de precipitação com PEG 6000 e NaCl, que permite a precipitação preferencial de longos fragmentos de DNA. Inicialmente, foram adicionados 5% de PEG 6000 e 2,5M de NaCl. Após repouso de 5 minutos em gelo, o DNA precipitado

foi decantado por centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos. O *pellet* foi então separado do sobrenadante e ressuscitado em tampão TE. Ambos (*pellet* e sobrenadante) foram analisados por gel nativo de agarose 1% para checar a presença do arranjo de DNA 601 e dos fragmentos plasmidiais. Com os 5% iniciais de PEG 6000, nem o arranjo de DNA nem os fragmentos plasmidiais foram visualizados. A concentração de PEG 6000 foi então aumentada em adições posteriores e sucessivas de 0,5% até se obter a separação total do arranjo de DNA 601, no *pellet*, dos fragmentos plasmidiais mais leves, no sobrenadante (Figura 15). O arranjo puro de DNA 601 foi então submetido à limpeza por extração com fenol/clorofórmio para remoção do PEG, precipitado em etanol, e os *pellets* finalmente ressuscitados em TE.



Figura 15: Purificação do arranjo de DNA. A raia 1 representa conteúdo do *pellet* (arranjo de DNA purificado) e a raia 2, do sobrenadante (esqueleto do plasmídeo), após 36ª adição de PEG0,5%/NaCl2,5M. Arranjo 197.25. DNAs carregados em gel de agarose nativo 1%.

Obtenção e purificação das histonas

Neste trabalho, foram utilizadas histonas extraídas e purificadas de eritrócitos de galinha pelo Prof. Guilherme Martins Santos no LMB/MRC, Cambridge, Inglaterra. O armazenamento do octâmero de histonas (HO) foi feito em glicerol 50%, agente crioprotetor, a 20°C e em alta concentração (3M) de NaCl, com vistas a manter sua estabilidade. Antes de serem utilizadas, sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida 14%, com o uso do agente detergente desnaturante SDS (SDS-PAGE) (Figura 16).

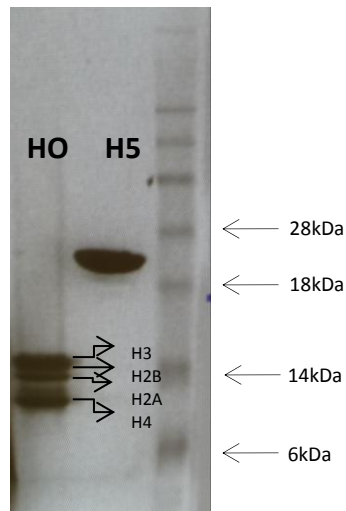


Figura 16: Histonas utilizadas nos ensaios. Na raia referente ao octâmero de histonas, indicada como HO, é possível observar quatro bandas, referentes às histonas H3, H2B, H2A e H4, conforme indicado. A raia referente à *linker* histona está indicada como H5. Bandas referentes ao marcador de peso molecular estão indicadas. Gel de SDS-PAGE corado com solução de Coomassie blue.

Amplificação do DNA competidor por PCR

O DNA competidor (crDNA) é uma sequência de DNA de 147 pares de bases que utilizamos na reconstituição da cromatina *in vitro*. O crDNA se liga ao HO em excesso com menor afinidade do que o arranjo longo, evitando a supersaturação dos arranjos de DNA 601. Desta forma, o crDNA impede que histonas livres causem agregação de fibras reconstituídas, garantindo que os arranjos contenham quantidades estequiométricas de octâmero de histonas. Utilizamos *primers* desenhados para amplificar a seguinte região aleatória de 147 pares de bases contida no vetor pUC18, de 5' para 3': attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagc. Abaixo, as sequências dos primers utilizados:

Forward Primer: 5'... ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG

Reverse Primer: 5'... GTCACAATTCCACACAACATACGCGCC

Em um tubo cônico, foi adicionada mistura contendo os dois primers descritos, dNTP, o plasmídeo pUC 18 (molde), água, tampões e a enzima Taq Polimerase, uma DNA polimerase termoestável isolada do microorganismo *Thermus*

aquaticus (CHIEN et al., 1976). Oriundas desta mistura, 60 reações de 50 μ L foram simultaneamente submetidas a reações de polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se para isso o termociclador Biorad Thermal Cycler T-100 e o seguinte ciclo de temperatura, com as etapas “b”, “c” e “d” repetidas 65 vezes:

- a. 94°C por cinco minutos → iniciação
- b. 95°C por 1 minuto → abertura da dupla fita de DNA
- c. 52°C por 30 segundos → anelamento dos primers ao DNA molde
- d. 72°C por 30 segundos → ação da Taq polimerase
- e. 72°C por 1 minuto → extensão
- f. 4°C → eterno

O produto resultante foi analisado por gel nativo de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (Figura 17).



Figura 17: DNA competidor após amplificação por PCR

Reconstituição da cromatina *in vitro*

Para reconstituição de longas fibras de cromatina, utilizamos diferentes arranjos do DNA 601, conforme descrito em “Obtenção do DNA”, e histonas extraídas de galinha.

Para promover um suave e ordenado posicionamento de nucleossomo, realizamos a reconstituição da cromatina fundamentada em diálises lentas de sal

Uma mistura contendo o DNA e o crDNA (*Master Mix*), em proporção 1:1, foi feita antes da adição aos tubos, para que houvesse maior praticidade e reprodutibilidade. A quantidade de tampão adicionada foi calculada para que o volume final da reação se mantivesse sempre constante (80 μ L ou 400 μ L) (Tabela 1).

Depois de feita a mistura em alta concentração de sal, o conteúdo dos microtubos foi transferido para tubos de vidro de silicone abertos em um dos lados, onde foi então posicionado um pequeno pedaço de membrana de diálise com poros de 3 kDa, feita de pele de cobra. (Figura 18a).

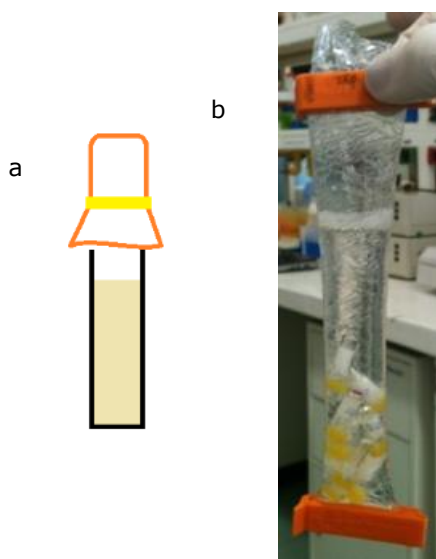


Figura 18: Método de reconstituição da cromatina. **(a)** Esquema do tubo de vidro de silicone (em preto), contendo a mistura de DNA, crDNA e HO (marrom), fechado por membrana de diálise com poro de 3kDa (laranja) presa por anel de borracha (amarelo). **(b)** Fotografia do saco de diálise contendo os tubos com as reações de reconstituição, conforme a Tabela 1, além de tampão, fechado por cliques de plástico.

Os tubos de vidro já fechados por membrana de diálise foram transferidos, de ponta-cabeça, para que a solução permanecesse em contato com a membrana, para um saco de diálise feito da mesma membrana com *cut-off* de 3 kDa contendo 30 mL de tampão também com alta concentração de sal (10mM TEA ph 7,4, 1mM EDTA e 2M NaCl). Este saco foi fechado por cliques de diálise (Figura 18b) e transferido para béquer contendo 4 litros de tampão sem NaCl (10mM TEA ph 7,4, 1mM EDTA). Sob agitação magnética lenta, a diálise ocorreu por período de cerca de 18 horas

(*overnight*). Após esse período, as amostras dentro dos tubos de silicone continham baixa concentração de sal (aproximadamente 15 mM de NaCl).

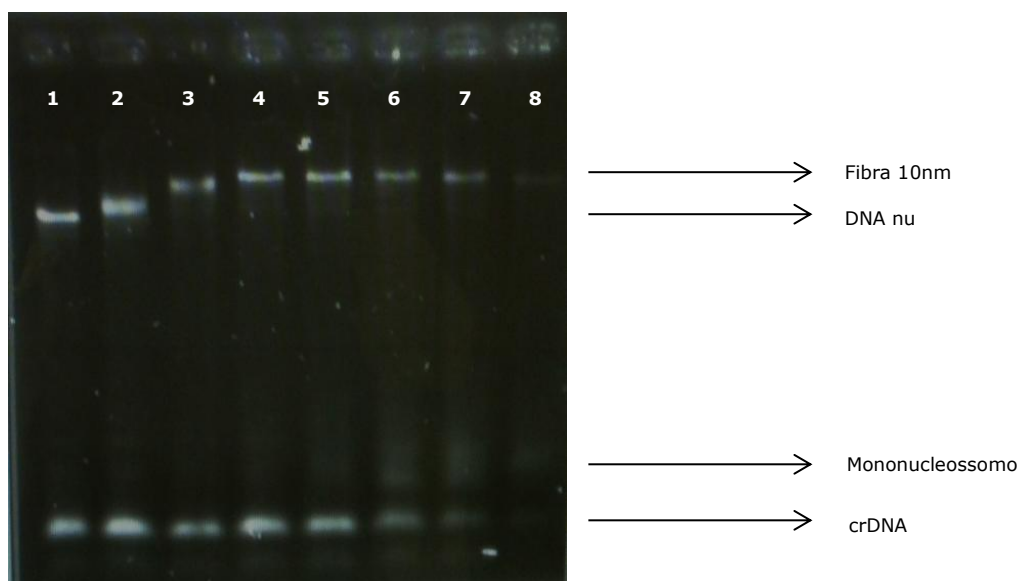


Figura 19: Reconstituição da fibra de cromatina de 10nm. Raia 1 representa DNA nu (sem HO) e raia de 2 a 8 representam quantidades crescentes de HO, conforme Tabela 1. A partir da raia 6 há aparecimento de mononucleossomos, o que indica o ponto de saturação do arranjo (no caso 197.25) com HO. Além disso, é possível observar retardo na migração da fibra de 10 nm conforme o HO vai sendo titulado, até alcance de um platô, na raia 4.

Para as amostras reconstituídas em presença de Triton X-100 (marca Sigma), este foi adicionado, em concentração 0,1% a todos os tampões utilizados. Esta concentração do detergente foi escolhida a partir de ensaios realizados anteriormente pelo Prof. Guilherme Martins Santos, em que a concentração de 0,1% se mostrou adequada para realização das reconstituições, a julgar pela definição das bandas (Figura 20).

Após a reconstituição, diálise e conseqüente diminuição da concentração de sal, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese utilizando gel nativo de agarose 0,8%. 10 μ L de cada reconstituição foram misturados a 2 μ L de *loading buffer* (20% glicerol, 20mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1% bromophenol blue) e carregados no gel. Como tampão de corrida, foi utilizado TBE 0,2X. A corrente aplicada variou entre 13 mA e 20 mA, utilizando sempre a maior miliamperagem (sem ultrapassar 20 mA) sem que a voltagem ultrapassasse 100V. Para visualização das bandas, o gel de agarose foi posteriormente exposto por a uma solução contendo brometo de etídeo.

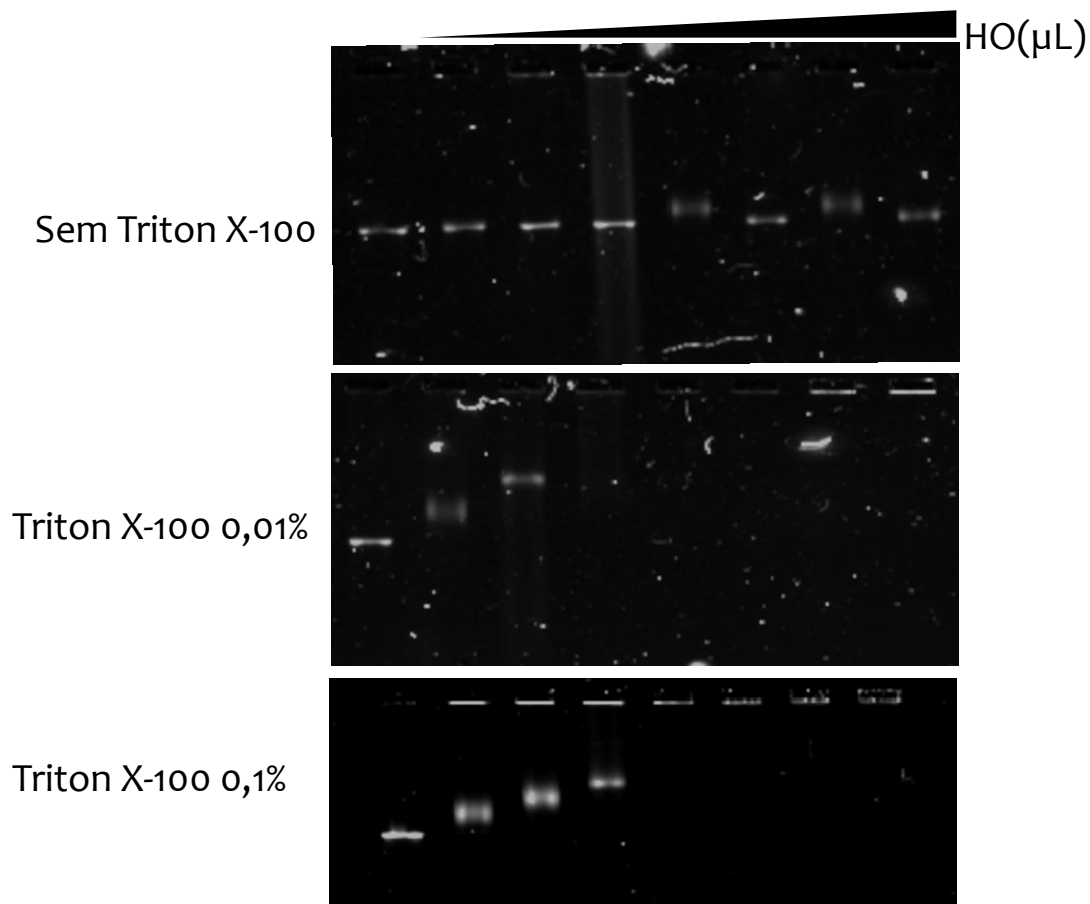


Figura 20: Titulações de HO em arranjo de DNA 197.61 realizadas com diferentes concentrações de Triton X-100, indicadas à esquerda. É possível perceber que a concentração de 0,1% reflete a condição de melhor formação das bandas. Gel nativo de agarose 0,8%.

Determina-se o ponto de saturação pelo aparecimento de uma banda no gel referente aos mononucleossomos formados, pois o HO começa a se ligar ao DNA competidor quando todos os locais de alta afinidade no arranjo de DNA já estão ocupados. Observa-se, ainda, que as bandas atingem um platô, após o qual deixa de haver retardo na migração por conta do aumento da massa (Figura 19).

Todas as manipulações foram realizadas a 4°C.

Titulação da *Linker* Histona (obtenção de fibra de 30nm)

Para a produção de fibras de cromatina compactadas, utilizamos a incorporação da *linker* histona (LH) H5. Similarmente à titulação do HO, procedeu-se a uma reação em tampão com alta concentração de sal: 10mM TEA ph 7,4, 1mM EDTA e 2M de NaCl. Desta vez, porém, o HO foi adicionado em quantidade fixa a

todas as amostras. Esta quantidade adicionada é exatamente o ponto de saturação definido pela etapa anterior, de reconstituição da fibra de 10nm (Figura 19). Várias amostras foram reconstituídas em paralelo contendo, além do DNA, crDNA e HO em quantidade fixa, quantidades crescentes de H5 (titulação). Da mesma forma que para a fibra de 10nm, a quantidade de tampão adicionada foi calculada para que o volume final da reação se mantivesse sempre constante (80 μ L ou 400 μ L).

Uma mistura contendo o DNA e o crDNA foi feita antes da adição aos tubos, para que houvesse maior praticidade e reprodutibilidade.

A transferência das misturas para os tubos de vidro, assim como a diálise *overnight*, foram feitas da mesma forma que para a titulação de HO (fibra de 10nm).

Para a reconstituição da fibra de 30nm, seguiu-se para uma nova diálise no segundo dia de experimento. Os tubos foram removidos do saco de diálise e transferidos, ainda de ponta-cabeça, para que o líquido permanecesse em contato com a membrana de diálise, para um béquer com dois litros de *foldng buffer*, contendo 1mM de MgCl₂ e 10mM de TEA 10mM pH 7,4. Essa segunda diálise, assim como a primeira, ocorreu sob agitação lenta por cerca de mais 18 horas (*overnight*). Para essa diálise, não foi utilizado o saco de membrana. Boias de borracha permitiram a flutuação dos tubos.



Figura 21: Reconstituição da fibra de cromatina de 30nm. Raia 1 representa fibra de 10nm (sem H5) e raias de 2 a 10 representam quantidades crescentes de H5. A partir da raia 8 a migração atinge um platô, sem que haja compactação posterior da fibra, indicando a compactação máxima, ou o ponto de saturação de H5.

Depois de dialisadas, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 0,1% durante 25 minutos a 4°C, para permitir o *crosslink* da H5. A etapa de fixação é

necessária para preservar a ligação da H5 à cromatina, mantendo o dobramento dos arranjos, que poderiam se desdobrar durante a travessia pelo gel de agarose. As amostras foram, então, submetidas à análise por eletroforese utilizando gel nativo de agarose 0,8%, em condições idênticas às da fibra de 10nm. Observa-se uma migração mais rápida das amostras conforme a H5 vai sendo titulada. Este fenômeno ocorre porque, embora haja um aumento de massa com adição da H5, a cromatina se dobra, adotando uma forma mais compactada, que migra mais rapidamente através da malha de agarose do gel (Figura 21).

Para as amostras reconstituídas em presença de Triton X-100 (marca Sigma), este foi adicionado, em concentração 0,1% a todos os tampões utilizados.

Todas as manipulações foram realizadas a 4°C.

Ensaio de desnaturação térmica

Para verificar o efeito dos detergentes sobre a estabilidade das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*, as melhores amostras de fibras de 10 nm (pontos em que havia saturação do arranjo de DNA com HO) foram submetidas à rampa de temperatura crescente, utilizando um equipamento termociclador Techno TC-300. A exposição a cada temperatura foi de cinco minutos. A rampa de temperatura variou conforme o experimento, normalmente abrangendo faixa entre 50°C e 90°C. A visualização da integridade das amostras após o experimento foi feita por eletroforese em gel de agarose nativo 0,8%, com posterior exposição ao brometo de etídeo.

Para as fibras em presença de Triton X-100, foram escolhidas as melhores amostras reconstituídas em presença do detergente, conforme descrito nos tópicos anteriores nesta seção Material e Métodos. As condições da corrida eletroforética foram as mesmas usadas para as reconstituições das fibras de 10nm e 30nm, descritas anteriormente.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Com a finalidade de verificar o efeito do Triton X-100 e do cloreto de sódio sobre o perfil de distribuição de tamanho de partículas das amostras, utilizei a técnica de DLS. Foram utilizados o equipamento DynaPro (*Protein Solutions*) e o programa Dynamics (versão 6.12.0.3), do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC), em Campinas, SP. Para cada amostra, foram realizadas 50 aquisições de dados, de 30 segundos cada e com 90% de poder de *laser*. Antes de iniciar as aquisições, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos, a fim de mover possíveis partículas em suspensão para o fundo do microtubo, impedindo sua interferência na análise. As medidas foram feitas a 4°C.

Para estes ensaios, as amostras reconstituídas foram incubadas por 30 minutos a 4°C com água (controle) ou Triton X-100 em concentração final de 0,1%.

Após a primeira leitura (sem adição de sal), as amostras foram expostas a concentrações crescentes de cloreto de sódio de 0,1M, 0,2M e 0,5M, e as aquisições foram realizadas novamente.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para visualização das fibras por microscopia eletrônica, procedeu-se ao preparo da amostra pela técnica de contraste negativo (*negative staining*), com acetato de uranila em concentração de 1,5% a 2%. Inicialmente, as grades de carbono foram submetidas a uma descarga elétrica de alta voltagem, para que sua superfície se tornasse hidrofílica, permitindo um melhor espalhamento da amostra. Para isso, foi utilizado o sistema easiGlow (PELCO). Uma gota de 8 µL de amostra permaneceu por 3 minutos em contato com a grade. O excesso foi removido com papel de filtro. Então, foi adicionado acetato de uranila em 3 etapas de 30 segundos cada, removendo-se o excesso com papel de filtro após cada etapa. As fibras de 30nm, antes do contraste e da visualização, foram fixadas por 25 minutos com glutaraldeído 0,1%. A visualização das amostras foi feita em um microscópio

eletrônico de transmissão JEM 3010, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), pertencente ao CNPEM, em Campinas, SP.

RESULTADOS

Triton X-100

Triton X-100 antecipa o ponto de saturação da fibra de cromatina reconstituída *in vitro*

Para analisar o efeito do Triton X-100 sobre a fibra de cromatina, realizamos reconstituições de fibras de cromatina de 10nm sem e com 0,1% de Triton X-100. Utilizamos diferentes arranjos de DNA: 197.15, 197.25 e 177.36. Em todos os casos, observamos que o Triton X-100 causou a antecipação do ponto de saturação da fibra pelo HO, ou seja, foi necessária uma quantidade menor de HO para a formação da fibra de 10 nm.

Para o arranjo 197.15, em um dos ensaios, a quantidade de HO 0,5 mg/mL necessária para saturar o arranjo diminuiu de 24 μ L, na ausência do detergente, para 19 μ L na presença de 0,1% de Triton X-100 (Figura 22a). Além disso, na presença do detergente, com 25 μ L de HO 0,5 mg/mL observa-se a formação de fibras agregadas caracterizada pela banda abaixo da fibra de 10nm formada. No controle até 27 μ L não se observa a formação desta banda mais baixa (Figura 22a). Ainda, observa-se a formação de mononucleossomos a partir de 19 μ L de HO 0,5 mg/mL quando em presença de Triton X-100, enquanto no controle o mononucleossomo só é observado a partir do ponto com 24 μ L da mesma solução de HO. No caso do arranjo 177.36, vê-se que as bandas referentes aos mononucleossomos começam a aparecer com 18 μ L de HO 0,5mg/mL para o controle e, na presença de 0,1% de Triton X-100, com 12 μ L da mesma solução de HO (Figura 22b).

Desta forma, pode-se dizer que na presença de 0,1% de Triton X-100 é necessária uma menor quantidade de HO na reação para ocupar todos os sítios de forte posicionamento no nucleossomo no arranjo de DNA. Determina-se o ponto de saturação pelo aparecimento de uma banda no gel referente aos mononucleossomos formados, pois o HO começa a se ligar ao DNA competidor

quando todos os locais de alta afinidade no arranjo de DNA já estão ocupados. É possível observar, ainda, que as bandas atingem um platô, após o qual deixa de haver retardo na migração por conta do aumento da massa.

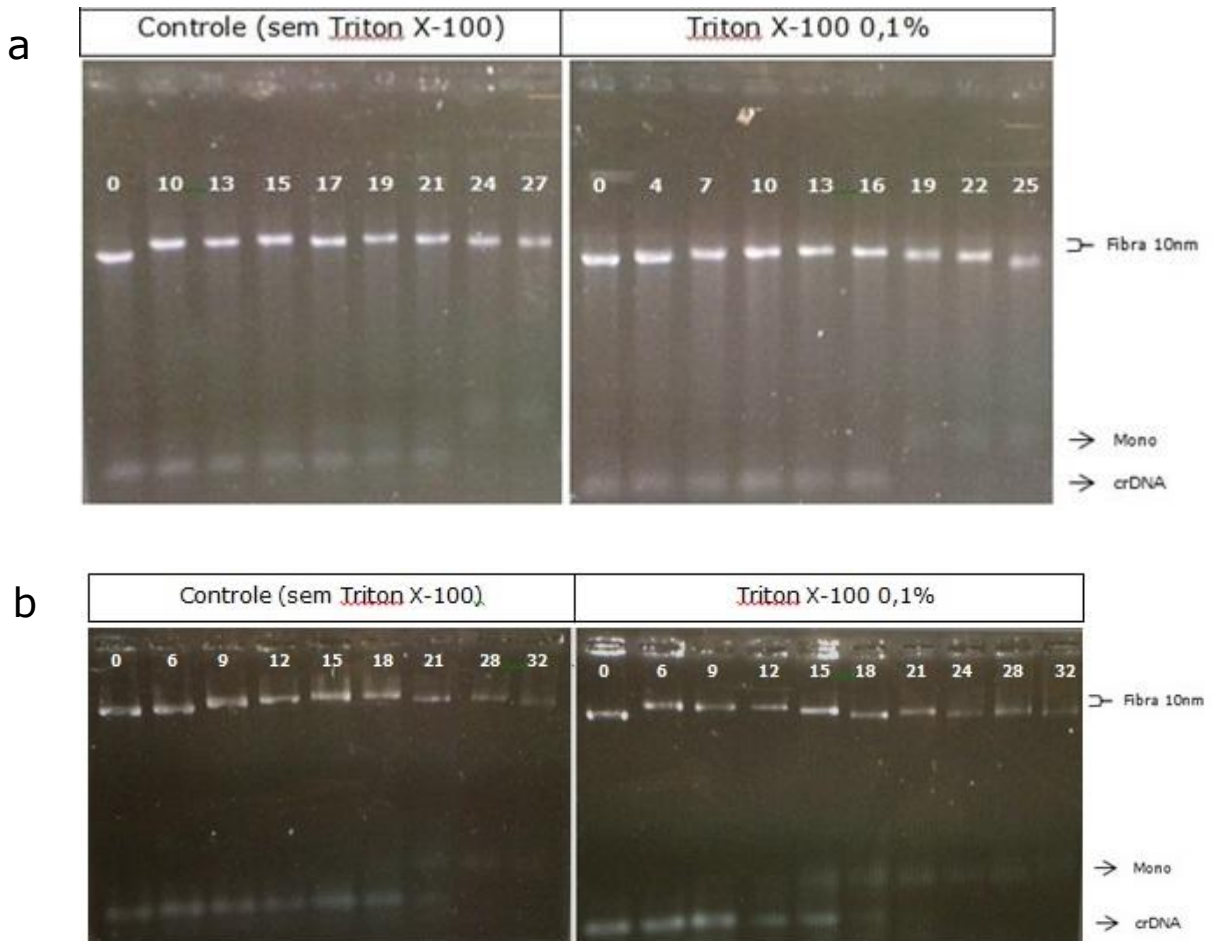


Figura 22: Triton X-100 diminui o ponto de saturação da fibra de 10nm com HO. Arranjo 197.15 (a) e 177.36 (b). As alturas das bandas referentes à fibra de 10 nm, aos mononucleossomos (Mono) e ao DNA competidor (crDNA) são mostradas. Os números indicam a quantidade, em microlitros, de HO 0,5 mg/mL adicionada à cada amostra. Géis nativos de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo.

Triton X-100 diminui termoestabilidade da fibra de 10nm

Para observar o efeito do Triton X-100 sobre a termoestabilidade da fibra de cromatina de 10nm, realizamos ensaios de desnaturação térmica com fibras de cromatina de 10 nm formadas com os arranjos de DNA 197.25 (Figura 23) e 177.36 (dados não mostrados). Observamos que as fibras de cromatina, em presença de Triton X-100, são menos resistentes ao aumento gradual de temperatura, ou seja,

perdem sua conformação e integridade em temperaturas mais baixas do que as fibras controle (reconstituídas em ausência de detergente). Com o aumento da temperatura, as bandas tendem a migrar mais no gel, o que indica que as fibras de cromatina estão perdendo histonas, até observar-se somente o DNA nu, ponto em que todas as interações entre HO e DNA foram desfeitas.

Com a fibra formada com o arranjo de DNA 197.25, observamos que, enquanto na ausência de Triton X-100 a fibra de cromatina de 10 nm se mantém intacta até próximo a 70°C (banda se mantém na mesma altura da fibra controle, que permaneceu a 4°C), em presença do detergente ela começa a se desfazer em temperatura mais baixa, próxima a 60°C (Figura 23).

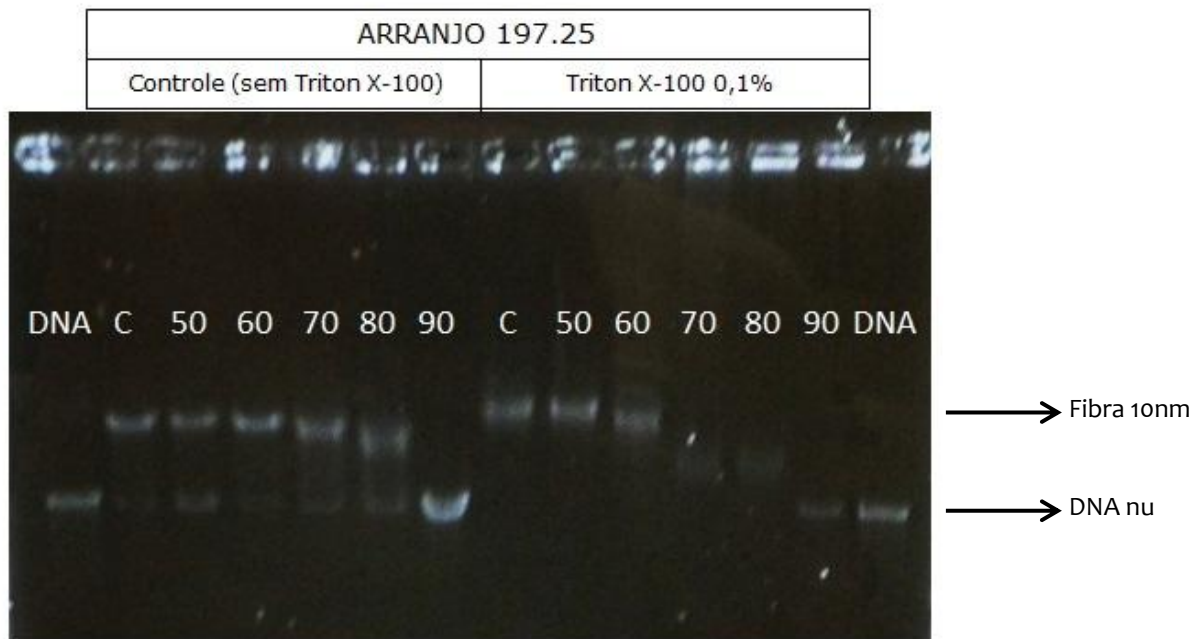


Figura 23: Ensaio de desnaturação térmica do arranjo 197.25. A primeira e a última raia foram carregadas com arranjo 197.25 de DNA, sem histonas (DNA nu). Os valores de 50 a 90 indicam as temperaturas às quais as fibras de cromatina de 10nm foram submetidas, ficando 5 minutos expostas a cada uma. As raias “C” são os controles (fibras que permaneceram a 4°C). Gel nativo de agarose 0.8%, corado com brometo de etídeo.

Fibra de cromatina de 10nm é mais bem formada em presença de Triton X-100

Uma característica notável do Triton X-100 que observamos diversas vezes ao longo de nosso trabalho, é a de impedir o aparecimento de bandas duplas, que

foram visualizadas nas reconstituições de fibras de cromatina de 10nm. Acreditamos que estas duas bandas sejam relativas ao DNA nu e à fibra de cromatina, devido ao perfil de migração no gel de agarose. Esse fenômeno é claramente observado no gel representativo do ensaio de desnaturação térmica (Figura 23).

Triton X-100 não afeta a formação da fibra de 30 nm

Para os arranjos 197.25 (dado não mostrado) e 177.36 (Figura 24), obtivemos sucesso em realizar a reconstituição da fibra de cromatina de 30nm em presença de Triton X-100, da mesma forma que em sua ausência (Figura 21, seção Material e Métodos).

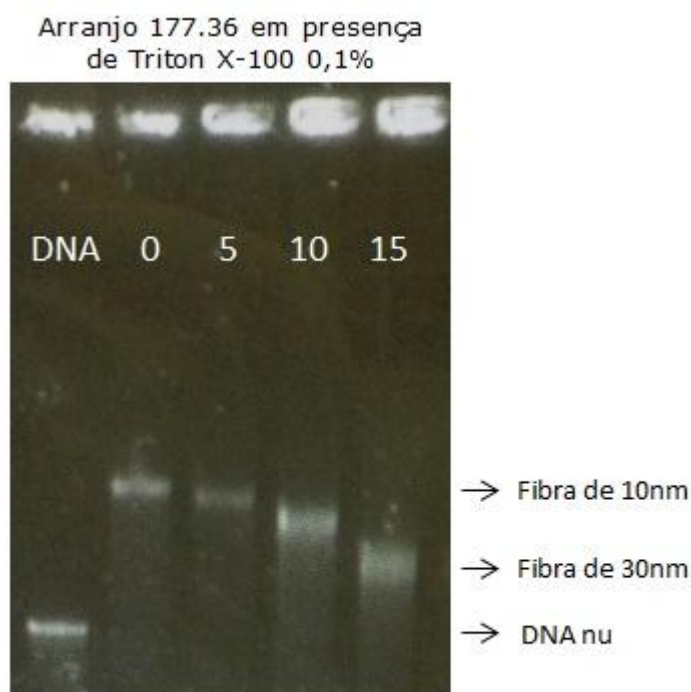


Figura 24: Reconstituição da fibra de cromatina de 30nm em presença de Triton X-100 0,1%. Os números indicam a quantidade, em microlitros, de H5 0,5 mg/mL que foi adicionada à cada ponto da reconstituição. A fibra de compactação máxima (raia com 15 μ L de H5) migra mais rapidamente no gel, por causa de sua forma compactada, apesar do aumento de massa causado pela ligação da H5. Gel nativo de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo.

Partindo da ausência de H5, onde se observa a formação da fibra de 10 nm, e titulando-se a H5 0,5 mg/mL em quantidades crescentes sobre a fibra de cromatina de 10 nm, observa-se claramente um aumento na velocidade de migração das fibras através do gel de agarose 0,8%. Essa maior migração no gel, embora haja aumento

de massa, se deve à forma que a fibra adota (compactada) em presença da H5 e 1 mM de Mg²⁺ (Figura 24).

Triton aumenta proporção de partículas de raio pequeno e de agregados de fibras de 10nm

Para traçar o perfil de distribuição das partículas por tamanho (raio hidrodinâmico), realizamos ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com fibra de cromatina de 10 nm. Este experimento foi realizado com o arranjo 177.36 em ausência e em presença de 0,1% de Triton X-100 e em ausência e presença de NaCl em diferentes concentrações.

Verifiquei que, em comparação ao controle, a amostra após ter sido incubada com Triton X-100 na concentração final de 0,1% apresentou intensidade maior de sinal relativo a partículas de raio hidrodinâmico pequeno – 3,7 nm. Enquanto o controle praticamente não apresentava partículas deste tamanho, na presença de Triton X-100 0,1% elas foram responsáveis por 33% do total da intensidade de sinal reportada pelo equipamento. Além disso, a incubação com Triton X-100 ocasionou o aparecimento de sinal referente a agregados com mais de 550 nm de raio hidrodinâmico (38% da intensidade total).

O cloreto de sódio foi adicionado sobre a amostra já contendo 0,1% de Triton X-100, em concentrações crescentes de 0,1M, 0,2M e 0,5M. A intensidade de sinal referente a partículas de pequeno raio hidrodinâmico (cerca de 4 nm) aumentou para 51% do total na presença de 0,1M de NaCl e caiu para pouco mais de 40% em presença das concentrações maiores do sal. Sinais referentes a agregados (partículas de 550 nm), por outro lado, desapareceram em presença de sal, porém, com 0,5M de NaCl, foi detectada uma espécie de cerca de 310 nm de raio hidrodinâmico, compreendendo 46% do total de sinal da amostra. A tabela 2 sumariza os resultados obtidos para cada caso descrito, relacionando o raio hidrodinâmico de cada espécie presente nas amostras à porcentagem correspondente do total de sinal obtido pelo equipamento (definido pela quantidade de fótons que alcançaram o detector em cada caso).

Entretanto, a intensidade de sinal reportada varia também conforme o tamanho da partícula. Assim, a porcentagem indicada não necessariamente reflete a quantidade de espécies presentes em solução. Desta forma, 38% de sinal correspondente a agregados de 554 nm de raio hidrodinâmico, no caso das amostras incubadas com Triton X-100, por exemplo, podem ser relativos a uma quantidade desprezível desses agregados.

Tabela 2: resultados obtidos do experimento de DLS. Os raios dizem respeito ao raio hidrodinâmico das espécies detectadas e as porcentagens correspondem à porcentagem do sinal total lido obtido pelo equipamento.

Controle		Triton 0,1%		Triton 0,1% + NaCl 0,1M		Triton 0,1% + NaCl 0,2M		Triton 0,1% + NaCl 0,5M	
Raio (nm)	%	Raio (nm)	%	Raio (nm)	%	Raio (nm)	%	Raio (nm)	%
3,8	0	3,7	33	3,7	51	3,6	43	4,1	42
11,4	5	16,2	5	39,4	19	119,2	57	44,7	12
63,4	85	93,3	24	214	30	*	*	309,9	46
201,7	10	554,1	38	*	*	*	*	*	*

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) revela ação desmanteladora do Triton X-100 sobre as fibras da cromatina

Para analisar as fibras abertas (10 nm) e compactadas (30 nm) de cromatina, conduzimos ensaio de TEM por coloração negativa.

Observamos (Figura 25), primeiramente, que as fibras formadas com diferentes arranjos de nucleossomos foram reconstituídas com sucesso. Conforme esperado, observamos que as fibras de 10nm apresentam-se como um colar de contas (*beads-on-a-string*) em diferentes conformações. Também em consonância com o esperado, em presença de *linker* histona e Mg²⁺, as fibras apresentaram-se de forma mais compactada. Entretanto, a compactação máxima esperada para a fibra de 30 nm não foi alcançada. Importaneamente, observamos claramente a diferença na compactação entre as duas fibras, com e sem *linker* histona e Mg²⁺. Assim, confirmamos, por TEM, ter obtido êxito na delicada metodologia de reconstituição de fibras de cromatina *in vitro*.

Podemos notar que as fibras com o arranjo 197.15 foram mais bem visualizadas pela microscopia eletrônica e as diferenças entre as fibras em presença e ausência de LH foram claramente observadas. Por este motivo, este arranjo foi eleito para realizarmos os ensaios com o Triton X-100.

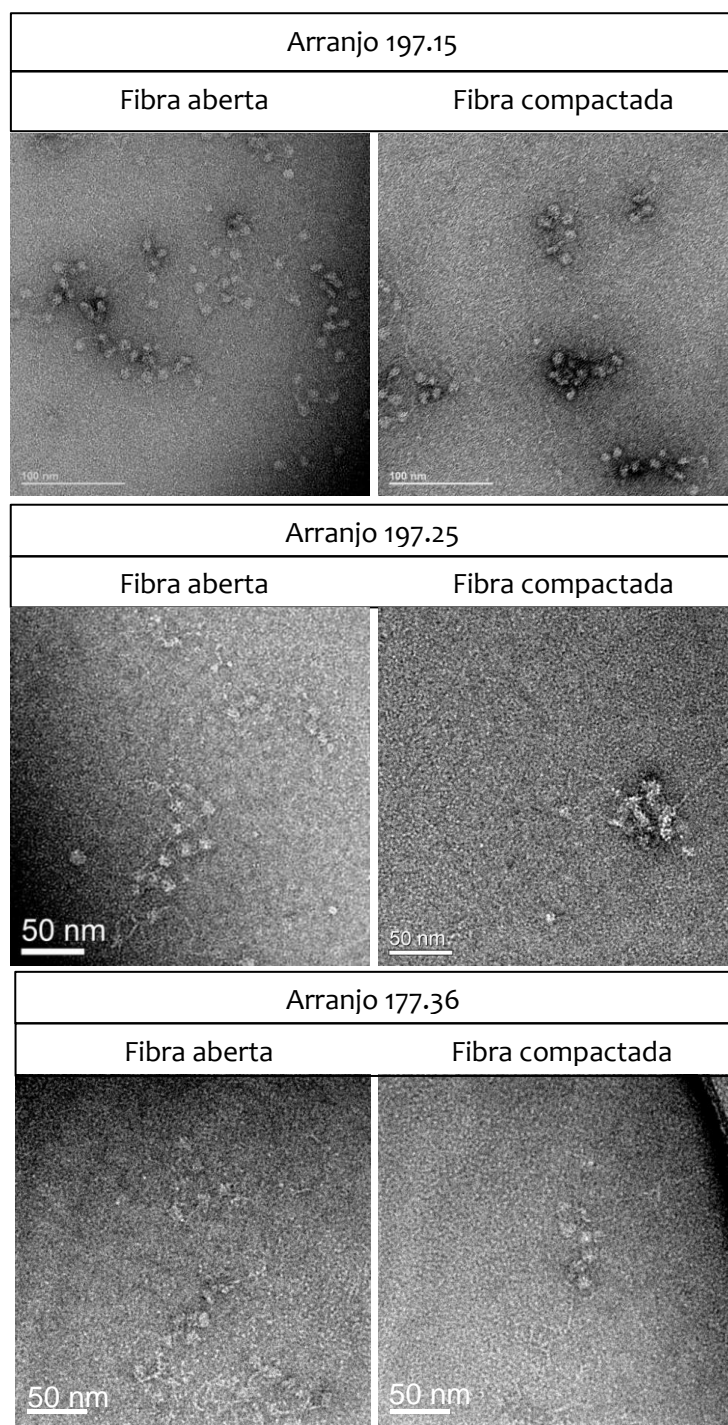


Figura 25: Fibras de cromatina reconstituídas na ausência de Triton X-100. Imagens de microscopia eletrônica obtidas por coloração negativa com acetato de uranila mostram a fibra aberta e fechada, para os diferentes arranjos, conforme indicado.

Para nossa surpresa, quando em presença de Triton X-100, não conseguimos visualizar as fibras de cromatina de 10 nm e 30 nm. Observamos somente arranjos de DNA e nucleossomos (ou octâmeros de histonas) dispersos no campo (Figura 26). A presença de algumas regiões mais condensadas se deve a acúmulo de acetato de uranila, usado como corante para as telas.

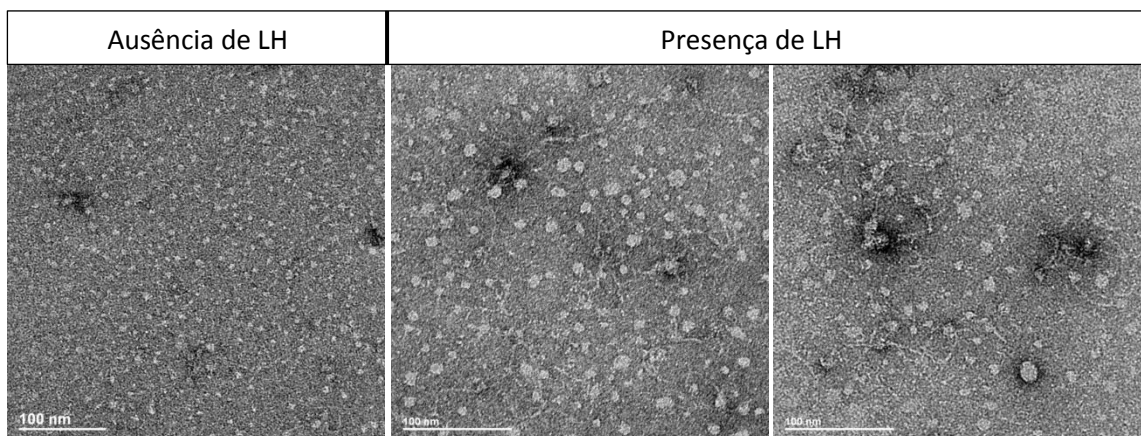


Figura 26: Fibras de cromatina reconstituídas em presença de Triton X-100, sem (imagem da esquerda) ou com (imagens da direita) *linker* histona. As imagens de microscopia eletrônica com coloração negativa com acetato de uranila mostram nucleossomos e DNA dispersos nos campos. Não é possível observar formação da fibra de cromatina.

CHAPS

CHAPS não altera termoestabilidade da fibra de 10nm

Após verificar que o Triton X-100 diminui a termoestabilidade de longas fibras de cromatina, decidimos avaliar a ação de outro detergente sobre as fibras de 10 nm reconstituídas *in vitro*. Os ensaios de desnaturação térmica com os arranjos 197.15 (Figura 27) e 177.36 (dados não mostrados) revelaram que a cromatina, em presença de 0,1% de CHAPS, não sofre alteração na estabilidade frente ao aumento gradual de temperatura estudado.

Na ausência ou presença de 0,1% de CHAPS, para o arranjo 197.15, a fibra de cromatina permaneceu estável até 72°C. Observamos, para ambos os casos, que a 80°C a fibra começa a se desestabilizar, até desfazer-se em 85°C.

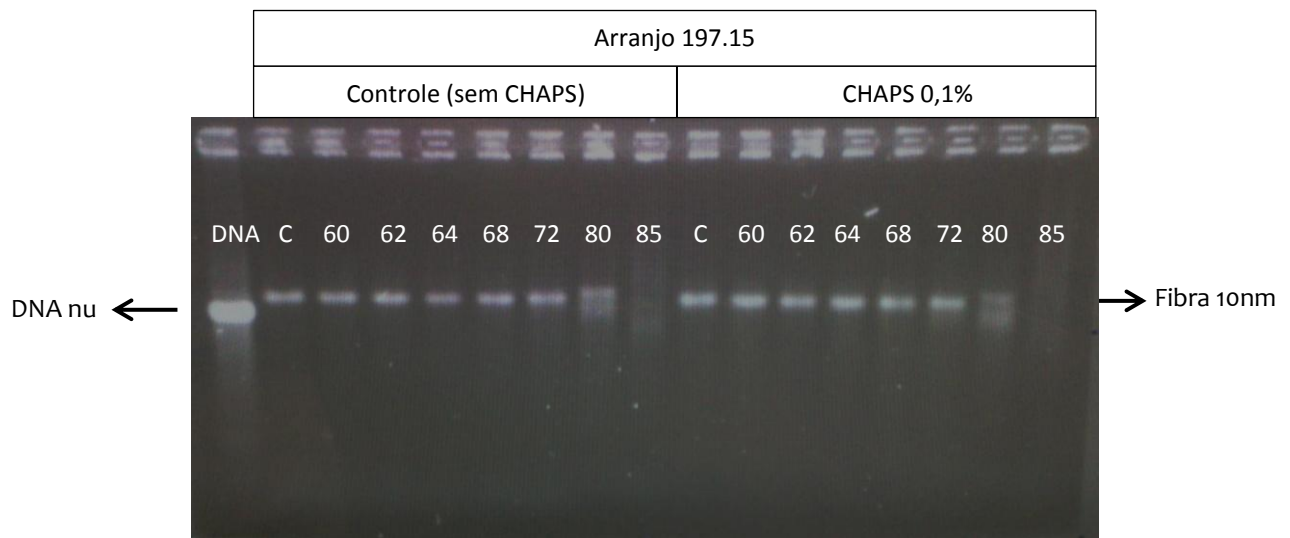


Figura 27: Ensaio de desnaturação térmica do arranjo 197.15. A primeira raia foi carregada com arranjo 197.15 de DNA, sem histonas (DNA nu). Os valores de 60 a 85 indicam as temperaturas às quais as fibras de cromatina de 10nm foram submetidas, ficando 5 minutos expostas a cada uma. As raias “C” são os controles (fibras que permaneceram a 4°C). Gel nativo de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

CHAPS não altera estabilidade da fibra de cromatina de 10 nm após período de 35 dias

A fim de verificar o efeito do detergente CHAPS sobre a estabilidade da fibra de cromatina de 10 nm com o tempo, realizamos duas reconstituições em paralelo, utilizando o arranjo 197.15: uma sem detergentes e uma com CHAPS 0,1% adicionado aos tampões de reação e do saco de diálise. No dia seguinte à reconstituição, as fibras foram analisadas por eletroforese em gel nativo de agarose e sua integridade pôde ser verificada (Figura 28, “ANTES”). Após um período de 35 dias, durante o qual as fibras foram mantidas a 4°C, realizamos nova análise eletroforética, nas mesmas condições da primeira (Figura 28, “DEPOIS”).

Observamos que em ambos os casos o perfil de migração e de integridade das bandas permaneceu o mesmo, tanto para o controle quanto para as fibras reconstituídas em presença de 0,1% de CHAPS. Estes resultados sugerem que o CHAPS, a uma concentração de 0,1%, não desestabiliza a fibra de cromatina de 10 nm em um período de 35 dias (Figura 28).

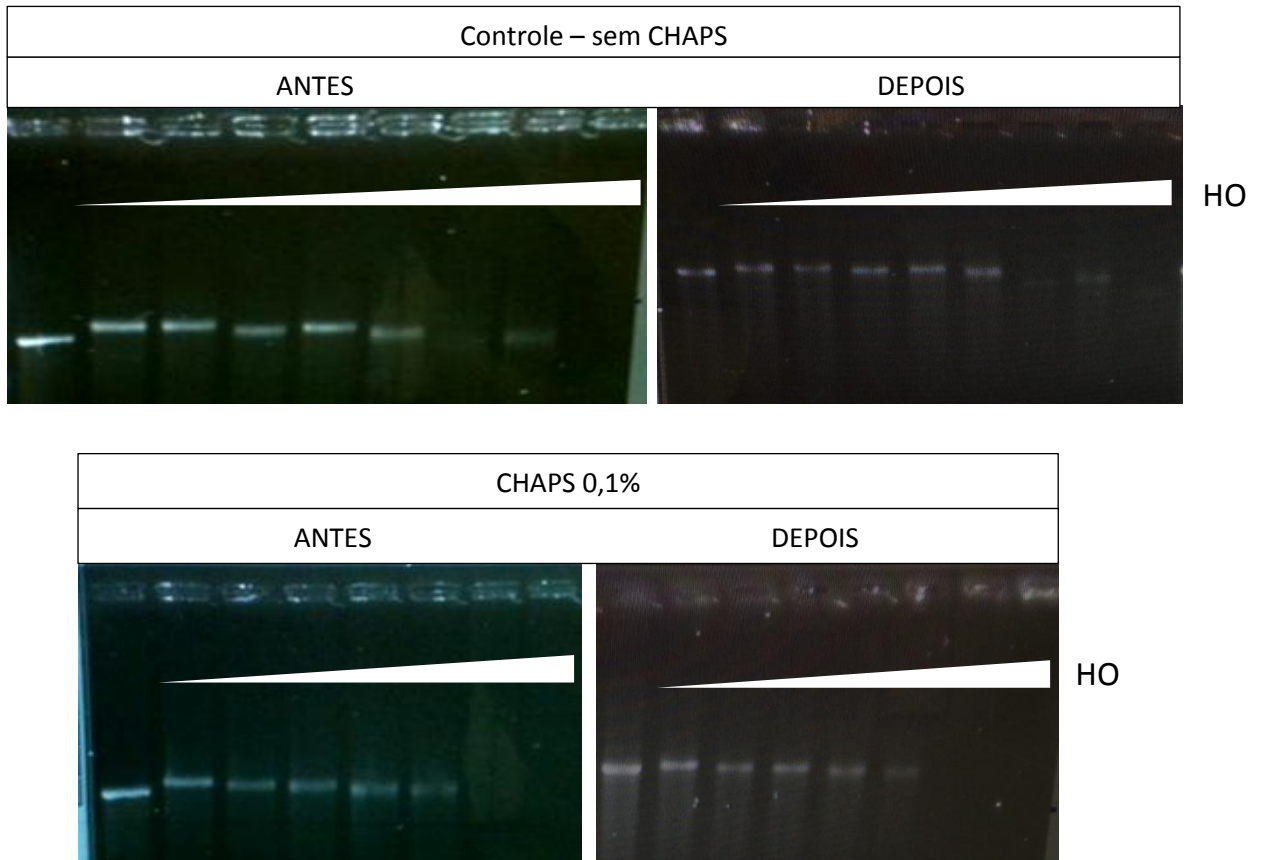


Figura 28: CHAPS não desestabiliza fibra de cromatina em um período de 35 dias. Reconstituição da fibra de cromatina de 10 nm *in vitro*, utilizando arranjo de DNA 197.15 e quantidades crescentes de HO a cada amostra. Condições de ausência de detergente (acima) e em presença de 0,1% de CHAPS (abaixo). “ANTES” se refere à corrida eletroforética realizada no dia seguinte à reconstituição e “DEPOIS”, após período de 35 dias. Géis nativos de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo.

DISCUSSÃO

Nucleossomos e cromatina têm sido vastamente produzidos *in vitro* com sucesso. Diversos métodos têm se mostrado eficientes na obtenção de respostas relacionadas à arquitetura da fibra de cromatina (DORIGO et al., 2003; ROBINSON et al., 2008; ROUTH et al., 2008; LI et al., 2010), às interações entre histonas e DNA (LUGER et al., 1997; DAVEY et al., 2002), a estruturas de proteínas e peptídeos em complexo com o nucleossomo (KALASHNIKOVA et al., 2013), entre outros. Para reconstituir a cromatina *in vitro* é necessário lançar mão de histonas e DNA, que podem ser endógenos, obtidos por extração de organismos e/ou células, ou produzidos em laboratório, como histonas recombinantes e sequências de DNA clonadas em plasmídeos.

Neste trabalho, usamos histonas extraídas de galinha, contendo as possíveis modificações pós-traducionais realizadas pela maquinaria enzimática do organismo vivo. Já foi demonstrado que é possível mapear as modificações pós-traducionais de histonas de galinha utilizando espectrometria de massa (ZHANG; TANG, 2003). Futuramente, pretendemos também analisar quais são as modificações pós-traducionais das histonas que usamos através de espectrometria de massas, a fim de relacioná-las com esse estudo e responder a perguntas sobre a sinalização hormonal. Para este trabalho, acreditamos que o conjunto de modificações pós-traducionais das histonas utilizadas não teria interferência com nossos resultados. Traçamos em todos os ensaios comparações entre fibras de cromatina reconstituídas em presença e ausência de agentes detergentes, no que tange à sua estabilidade e arquitetura. Para todos os ensaios, as mesmas histonas foram utilizadas.

Em relação ao DNA, nos valem da sequência 601 Widom, uma sequência sintética que tem sido de grande utilidade na obtenção de respostas relacionadas à estrutura da cromatina, inclusive cristalográficas (SCHALCH et al., 2005; MAKDE et al., 2010). A grande vantagem de trabalharmos com esta sequência é que, por possuir alta afinidade por octâmeros de histonas (HO) em regiões regularmente espaçadas, permite a obtenção de fibras que possuem quantidades

estequiométricas de DNA, HO e *linker* histona. Desta forma, temos certeza de que traçamos comparações confiáveis entre as amostras reconstituídas em ausência e em presença de Triton X-100. As bandas referentes aos mononucleossomos e o alcance de um platô ao atingir a saturação dos arranjos com HO, visualizados em gel de agarose, subsidiam esta afirmação (Figura 19). Por outro lado, é claro que a artificialidade deve ser levada em consideração, porém, sem a possibilidade de posicionamento exato e estequiométrico das histonas, provavelmente este trabalho não teria sido possível. Enfim, no futuro, acreditamos ser importante também observar o efeito dos detergentes sobre fibras reconstituídas com sequências naturais com conhecido posicionamento de nucleossomo, a exemplo do promotor do MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) (VICENT et al., 2011).

Aqui neste trabalho, mostramos ser capazes de reconstituir *in vitro* longas fibras de cromatina, com diferentes tamanhos de *linker* DNA e arranjos de nucleossomos. Assim, consideramos deter um excelente modelo artificial para estudar a estrutura e remodelamento da cromatina.

Nesta primeira parte da dissertação, objetivamos analisar como os detergentes Triton X-100 e do CHAPS poderiam causar modificações na arquitetura da cromatina. Enfatizo que, obviamente, não intencionamos observar a ação destes agentes em cultura de células, tampouco *in vivo*. Acreditamos sim, que seu uso em um sistema artificial *in vitro* poderia nos auxiliar na tarefa de encontrar condições de maior estabilidade das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*, para obtermos condições compatíveis com futuros estudos estruturais, além de nos fornecer evidências indiretas sobre o papel da água nas longas fibras de cromatina. Consideramos duas formas principais de interação entre o solvente e as fibras de cromatina: (i) direta, em regiões que estejam acessíveis ao solvente, e que variam de acordo com a forma que a fibra adota (desidratação da cromatina) e (ii) indireta, por causar alterações no solvente que modifiquem a interação entre as macromoléculas (DNA e histonas).

Há diversas hipóteses para explicar os efeitos obtidos dos detergentes sobre as fibras de cromatina.

Uma das hipóteses para os efeitos observados do Triton X-100 sobre as fibras de cromatina está na solvatação. Olhando a fórmula estrutural do Triton X-100 (Figura 11a), observamos que se trata de um detergente não iônico, cuja porção polar é formada por diversas repetições de ligações C-O. Notamos que nesta porção, portanto, há vários átomos de oxigênio (de 9 a 10 átomos por molécula), o que confere considerável eletronegatividade a esta região. Quando presente, este detergente poderia rodear as histonas, carentes de elétrons, mantendo-as em solução e evitando sua aderência às paredes das ponteiros e tubos. Esta aderência, acreditamos ser causada pela carga superficial altamente positiva destas proteínas, o que as torna tendenciosas a realizar interações. Acreditamos que este efeito pode explicar a antecipação do ponto de saturação da fibra de cromatina de 10 nm causada pela presença de Triton X-100, em relação ao controle; um mesmo volume de uma mesma solução de HO, em presença de Triton X-100, acarretaria em maior quantidade de histonas disponíveis para interação com o DNA.

Podemos, ainda, pensar que o Triton X-100 pode estar causando uma abertura do arranjo longo de DNA, por ligar-se diretamente a ele, evitando que adote formas enroladas e priorizando formas mais abertas, com os sítios de ocupação de HO mais expostos. Desta forma, a saturação do DNA pelo HO ocorreria antes em presença do detergente, pelo maior acesso dos HO ao DNA.

Outra hipótese para explicar este efeito de antecipação do ponto de saturação do DNA pelo HO seria um deslocamento do equilíbrio: $\text{histonas} + \text{DNA} \rightarrow \text{histonas-DNA}$ no sentido de formação do complexo. Considerando sua porção hidrofóbica como ditadora do comportamento, a presença do Triton X-100 em solução poderia desviar as histonas no sentido de interagir com o DNA, evitando que permanecessem livres em solução. Porém, entendemos esta explicação menos provável, pois acreditamos fortemente que, tendo proteínas com carga superficial predominante positiva e moléculas com eletronegatividade como a do Triton X-100 em uma mesma solução, mais elas se atrairiam do que repeliriam, ainda que o detergente possua uma porção hidrofóbica. Assim, acreditamos que a orientação das moléculas de detergentes seria no sentido de cercar as proteínas, na tentativa de neutralizar suas cargas com sua porção hidrofílica abundante em elétrons.

Contudo, esta última hipótese, relacionada ao deslocamento do equilíbrio, poderia explicar o desaparecimento, no gel, das bandas duplas que observamos diversas vezes ao longo do trabalho em ausência de Triton X-100 (Figura 23). Acreditamos que estas bandas duplas, indicando uma reconstituição da cromatina ruim, se refiram à fibra de cromatina e ao DNA nu, devido ao padrão de migração eletroforética no gel de agarose (Figura 23). Ao direcionar o DNA e as histonas no sentido de formação da fibra, o Triton estaria evitando a presença de DNA livre em solução. À medida que o DNA é ácido e o Triton X-100 possui eletronegatividade considerável devida aos seus vários átomos de oxigênio, é natural pensarmos que essas duas moléculas tenderiam a se repelir. Desta forma, o Triton X-100 poderia atuar como adjuvante na formação da fibra pelos dois lados, tanto direcionando o DNA para a interação com as histonas, quanto o contrário. Ainda, para explicar o desaparecimento das bandas duplas, poderíamos levantar também a hipótese de que o Triton X-100 inibe a interação do DNA 601 nu e/ou complexos inespecíficos de DNA:Histonas com as paredes dos tubos e ponteiros. Ainda em relação a este desaparecimento das bandas duplas, podemos explicar este fenômeno com base no efeito previamente discutido do Triton X-100 de manter o DNA mais exposto à ligação do HO, evitando formas enroladas.

De modo aparentemente contraditório, o Triton X-100 causou diminuição da termoestabilidade da fibra de cromatina de 10 nm. Podemos explicar este efeito se considerarmos que, da mesma forma que mantém o arranjo de DNA mais aberto em solução, este detergente pode estar sendo favorável à abertura da fibra quando exposta a aumento de temperatura. O CHAPS, neste sentido, não apresentou efeito. Comparando as porções hidrofóbicas dos dois detergentes (Figura 11), podemos perceber que, enquanto o Triton X-100 tem uma cadeia ramificada, com vários átomos de carbono, ligada a um anel aromático, o que confere considerável hidrofobicidade à molécula, o CHAPS possui, em sua porção hidrofóbica, várias hidroxilas que certamente reduzem seu caráter apolar. Desta forma, podemos pensar ainda que com o aumento de temperatura, os sítios hidrofóbicos das histonas poderiam ser mais motivados à exposição ao solvente em presença de Triton X-100 e, portanto, este desmantelamento da fibra, observado pela migração do DNA cada vez maior no gel com o aumento de temperatura, poderia ocorrer antes do que na presença do CHAPS ou no controle (solvente sem detergente). Uma estratégia que

podemos adotar no futuro para confirmar a importância da região hidrofóbica do Triton em seu efeito sobre as fibras longas de cromatina é realizar ensaios comparativos, utilizando um agente que seja semelhante ao Triton X-100, em termos de hidrofobicidade, porém que não possua porção hidrofóbica, como, por exemplo, o polietilenoglicol (PEG).

Os resultados de desnaturação térmica obtidos com o Triton X-100 vão de encontro ao resultado obtido pelo ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS), em que pudemos observar que a fibra mostrou tendência a se desfazer em presença desse detergente (aumento do número de partículas com raio hidrodinâmico pequeno). Para o ensaio de DLS, a fibra usada foi reconstituída com o arranjo 177.36. Considerando que a largura de um nucleossomo é de 10 nm e que o *linker* DNA, neste caso contendo 30 pb, mede cerca de 10 nm (0,33 nm por par de bases, aproximadamente), a fibra inteira hipoteticamente esticada mediria pouco mais de 700 nm. Todavia, não acreditamos que, em solução, onde as fibras se encontram em constante movimento, as fibras irão se encontrar linearmente organizada. Por não se configurar uma estrutura compactada, ou seja, por não existir estrutura de alta ordem e um padrão de dobramento definido para a fibra de 10 nm, torna-se desafiante prever as formas em que a fibra estará presente em solução. Representações esquemáticas de algumas possibilidades hipotéticas, contudo, são apresentadas na figura 29. Os raios hidrodinâmicos pequenos (cerca de 4 nm) observados em presença de Triton X-100 não seriam esperados para a fibra de cromatina de 10 nm. Acreditamos que sejam relativos a octâmeros de histonas livres, o que refletiria o desmantelamento da fibra.

Entretanto, devemos analisar os resultados obtidos por DLS (Tabela 2) com cautela. Primeiramente, a amostra submetida ao ensaio de DLS contém diversas espécies em solução, como a fibra de cromatina de 10nm, DNA competidor e mononucleossomo. Esperamos, portanto, visualizar diversos tamanhos de raios hidrodinâmicos como resultado, porém, é difícil prever quais seriam os raios esperados, especialmente no que tange à fibra formada. Além disto, não conseguimos, nas condições empregadas, alcançar reprodutibilidade dos efeitos. Vale ressaltar que os resultados aqui apresentados derivam de apenas um experimento.

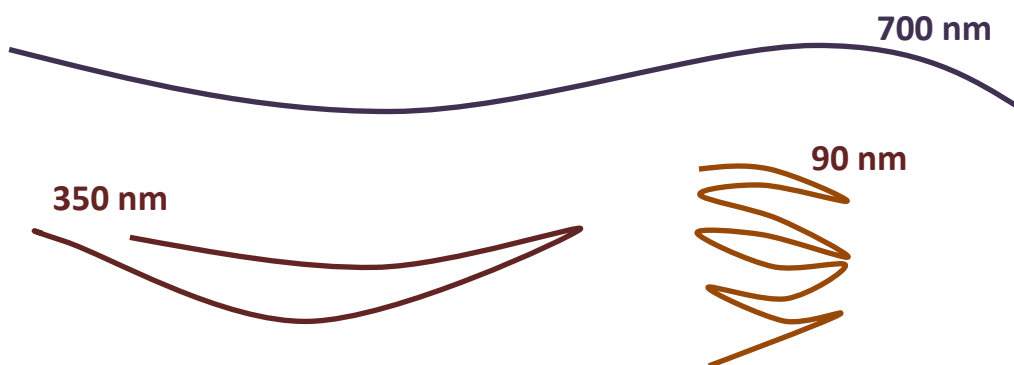


Figura 29: Esquema hipotético de possíveis formas adotadas pela fibra de 10 nm do arranjo 177.36 em solução. São representadas algumas possíveis condições de dobramento adotadas pela fibra de 10 nm com as respectivas espessuras aproximadas.

Para o ensaio de DLS, as amostras não foram reconstituídas em presença do Triton X-100, mas sim, incubadas por 30 minutos com o detergente antes da submissão à análise, para que o controle de origem utilizado pudesse ser o mesmo. Acompanhando esses resultados, outra explicação para o efeito do Triton X-100 poderia estar no efeito cinético. O momento de adição do detergente à solução pode ser decisivo para seu efeito, pois acreditamos que a área acessível ao solvente vai sendo restringida conforme vai havendo a formação da fibra, durante a diálise de sal. Nos ensaios de desnaturação térmica e antecipação do ponto de saturação da fibra, o detergente foi adicionado desde o primeiro tampão e a todos os tampões em diante. Para o DLS, de modo diferente, foi feita incubação posterior da fibra já formada com o detergente. Em nenhum dos casos, porém, houve uma pré-incubação dos componentes (DNA, histonas e DNA competidor) com o Triton X-100 separadamente. Para comprovar esta hipótese, pretendemos realizar no futuro ensaios em paralelo, com adição do Triton X-100 antes e depois da formação da fibra, comparando os resultados.

De todo modo, será importante realizarmos novos ensaios de DLS tentando melhorar as condições experimentais. Talvez aumentando o número de experimentos, possamos observar um perfil mais bem definido de espalhamento de luz da fibra de cromatina de 10 nm. Estes novos ensaios precisarão, contudo, considerar os resultados de polidispersão, pois este parâmetro fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas, o que é

especialmente importante quando se trabalha com amostras com várias espécies em solução.

De acordo com os resultados obtidos para os ensaios de DLS e desnaturação térmica, as visualizações das fibras por microscopia eletrônica mostraram tendência do Triton X-100 de desmanchar as fibras; belíssimas imagens de fibras de cromatina foram obtidas em ausência desse detergente, enquanto em sua presença foi possível visualizar apenas os componentes dispersos, histonas e DNA.

Ante o exposto, reforçamos o efeito aparentemente contraditório do Triton X-100 sobre a fibra de cromatina: (i) efeito “benéfico”, por formar fibras melhores e com menores quantidades de HO e (ii) efeito “maléfico”, por desestabilizar as fibras termicamente, além de desfazê-las. Entretanto, com base no que foi discutido anteriormente, entendemos que estes dois efeitos podem ser independentes.

Em relação à fibra de 30 nm, observamos que pode ser formada normalmente em presença do Triton X-100. Podemos pensar que esta forma mais compactada não sofre tanta interferência do detergente por ele não se localizar em regiões internas da estrutura. Este resultado indica que a atuação do detergente pode se dar de forma superficial nas macromoléculas, sem comprometer o dobramento da fibra em estruturas de alta ordem.

Uma importante pergunta que também pretendemos responder em um futuro próximo é o efeito do Triton X-100 sobre o octâmero de histonas, independente da presença do DNA. Já realizamos algumas tentativas nesse sentido, porém até o momento não obtivemos boas condições de visualização dos resultados em gel de poliacrilamida não denaturante.

Em relação ao CHAPS, não observamos, com os ensaios realizados, efeito deste detergente sobre a fibra de cromatina. O fato do CHAPS não ter causado diminuição da termoestabilidade da fibra da mesma forma que o Triton X-100 pode ser explicado pelo seu caráter hidrofóbico menos acentuado, conforme discutido anteriormente. Em sua porção hidrofóbica, o CHAPS apresenta três hidroxilas, que aumentam sua polaridade, conseqüentemente diminuindo a hidrofobicidade. Desta forma, as histonas podem ser menos “motivadas” a exporem seus sítios hidrofóbicos na presença de CHAPS do que em presença do Triton X-100.

CONCLUSÃO

Observamos neste trabalho que o Triton pode melhorar a formação e ao mesmo tempo diminuir a estabilidade das fibras longas de cromatina reconstituídas *in vitro*. Por diminuir a estabilidade da fibra de cromatina, este detergente não parece, a princípio, um bom candidato para prosseguirmos com futuros estudos estruturais. Porém, novos ensaios serão necessários para confirmarmos o efeito deste detergente sobre o octâmero de histonas e mononucleossomos separadamente.

Investiremos, com prioridade, na investigação do efeito cinético, comparando resultados obtidos com a adição do detergente em diferentes momentos da formação das fibras de cromatina. Ainda, intentamos realizar estudos computacionais, procurando observar de que modo o detergente poderia exercer ação direta, ligando-se à fibra de cromatina, além de observar a possibilidade deste agente de participar de interações internucleossomais em diferentes condições de formação da fibra (aberta, fechada).

Em relação ao CHAPS, observamos que este agente não afetou a estabilidade da fibra de cromatina, o que pode torná-lo um bom candidato para ser utilizado em futuros estudos estruturais. Antes, porém, é necessário complementarmos os estudos com este agente, realizando ensaios como, por exemplo, a microscopia eletrônica. Ainda, por não absorver luz em região do UV-visível, este é também um bom agente para prosseguirmos, por exemplo, com ensaios biofísicos de ultracentrifugação analítica e dicroísmo circular.

PARTE II

Busca por Peptídeo Ideal Ligante do
Patch Acídico

DECLARAÇÃO

A parte II deste trabalho foi retirada por motivos de sigilo, para a redação de patente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALIOTI, T.; LOMVARDAS, S.; PAREKH, B. et al. Ordered Recruitment of Chromatin Modifying and General Transcription Factors to the IFN- β Promoter. **Cell**, v. 103, p. 667–678, 2000.

ANNUNZIATO, A. DNA packaging: Nucleosomes and chromatin. **Nature Education** 1(1), 2008.

ARMACHE, K.; GARLICK, J.; CANZIO, D.; NARLIKAR, G.; KINGSTON, R. Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. **Science**, v. 334, p. 977–982, 2011.

AVILES, F.; CHAPMAN, G.; KNEALE, G.; CRANE-ROBINSON, C.; BRADBURY, E. The conformation of histone H5. **European Journal of Biochemistry**, v. 88, p. 363–371, 1978.

BARBERA, A.; BALLESTAS, M.; KAYE, K. The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen 1 N Terminus Is Essential for Chromosome Association, DNA Replication, and Episome Persistence. **Journal of Virology**, v. 78, p. 294–301, 2004.

BARBERA, A.; CHODAPARAMBIL, J.; KELLEY-CLARKE, B. et al. The Nucleosomal Surface as a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA. **Science**, v. 311, p. 856–861, 2006.

BASSETT, A.; COOPER, S.; WU, C.; TRAVERS, A. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, p. 159–165, 2009.

BERNSTEIN, F.; KOETZLE, T.; WILLIAMS, G.; MEYER, E. The Protein Data Bank: A Computer-Based Archival File For Macromolecular Structures. **European Journal of Biochemistry**, v. 80, p. 319–324, 1977.

BHATTACHARYA, A. Structures of desire. **Nature**, v. 459, n. May, p. 24–27, 2009.

BINTU, L.; ISHIBASHI, T.; DANGKULWANICH, M. et al. Nucleosomal Elements that Control the Topography of the Barrier to Transcription. **Cell**, v. 151, p. 738–749, 2012.

CAI, Q.; KNIGHT, J.; VERMA, S.; ZALD, P.; ROBERTSON, E. EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 10, p. 1002–1012, 2006.

CARRIERE, V.; ROUSSEL, L.; ORTEGA, N. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 1, p. 282–287, 2007.

CARROLL, C.; MILKS, K.; STRAIGHT, A. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 7, p. 1143–1155, 2010.

CHENG, X.; IVANOV, I. Molecular Dynamics. **Methods in Molecular Biology**, v. 929, p. 243-285, 2012.

CHIEN, A.; EDGAR, D.; TRELA, J. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1550–1557, 1976.

CIERO, L.; BELLATO, C.; MEINHARDT, L. et al. Assessment Of Four Different Detergents Used To Extract Membrane Proteins From *Xylella fastidiosa* By Two-Dimensional Electrophoresis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 269–274, 2004.

DAVEY, C.; SARGENT, D.; LUGER, K; MAEDER, A.; RICHMOND, T. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, p. 1097–1113, 2002.

DILWORTH, F.; FROMENTAL-RAMAIN, C.; YAMAMOTO, K.; CHAMBON, P. ATP-Driven Chromatin Remodeling Activity and Histone Acetyltransferases Act Sequentially during Transactivation by RAR/RXR In Vitro. **Molecular Cell**, v. 6, p. 1049–1058, 2000.

DORIGO, B.; SCHALCH, T; BYSTRICKY, K.; RICHMOND, T. Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, p. 85–96, 2003.

DORIGO, B.; SCHALCH, T; KULANGARA, A. et al. Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber. **Science**, v. 306, p. 1571–1573, 2004.

DUNITZ, J. The Entropic Cost of Bound Water in Crystals and Biomolecules. **Science**, v. 264, p. 670, 1994.

ENGLAND, J. R.; HUANG, J.; JENNINGS, M. J.; MAKDE, R. D.; TAN, S. RCC1 Uses a Conformationally Diverse Loop Region to Interact with the Nucleosome: A Model for the RCC1 – Nucleosome Complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 398, n. 4, p. 518–529, 2010.

ETTIG, R.; KEPPEL, N.; STEHR, R.; WEDEMANN, G.; RIPPE, K. Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping. **Biophysical journal**, v. 101, n. 8, p. 1999–2008, 2011.

FAN, J. Y.; RANGASAMY, D.; LUGER, KAROLIN; TREMETHICK, D. J. H2A.Z Alters the Nucleosome Surface to Promote HP1 α -Mediated Chromatin Fiber Folding. **Molecular Cell**, v. 16, p. 655–661, 2004.

FAN, Y; NIKITINA, T.; ZHAO, J. et al. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. **Cell**, v. 123, p. 1199–212, 2005.

FINCH, J. T.; KLUG, A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 6, p. 1897–1901, 1976.

GUSE, A.; CARROLL, C. W.; MOREE, B.; FULLER, C. J.; STRAIGHT, A. F. In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. **Nature**, v. 477, p. 354–358, 2011.

HUYNH, V. A. T.; ROBINSON, P. J. J.; RHODES, D. A Method for the In Vitro Reconstitution of a Defined “30 nm” Chromatin Fibre Containing Stoichiometric Amounts of the Linker Histone. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, p. 957–968, 2005.

KALASHNIKOVA, A. A.; PORTER-GOFF, M. E.; MUTHURAJAN, U. M.; LUGER, KAROLIN; HANSEN, J. C. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, p. 1–9, 2013.

KATO, H.; INGEN, H.; ZHOU, B. et al. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 1–6, 2011.

KATO, H.; JIANG, J.; ZHOU, B. et al. A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. **Science**, v. 340, p. 1110–1113, 2013.

KAYNE, P. S.; KIM, U. J.; HAN, M. et al. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. **Cell**, v. 55, p. 27–39, 1988.

KOROLEV, N.; ALLAHVERDI, A.; YANG, Y. et al. Electrostatic Origin of Salt-Induced Nucleosome Array Compaction. **Biophysical Journal**, v. 99, p. 1896–1905, 2010.

KOROLEV, N.; FAN, YANPING; LYUBARTSEV, A. P.; NORDENSKIÖLD, L. Modelling chromatin structure and dynamics: status and prospects. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, p. 151–159, 2012.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LEMO, M. A.; AZEVEDO, C. G. Laboratórios Abertos 2013, 1 ed, Lisboa, Dep. de Engenharia Química Instituto Superior Técnico, 2013.

LI, G.; MARGUERON, R.; HU, G. et al. Highly compacted chromatin formed in vitro reflects the dynamics of transcription activation in vivo. **Molecular cell**, v. 38, p. 41–53, 2010.

LI, G.; REINBERG, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 21, p. 175–186, 2011.

LOWARY, P. T.; WIDOM, J. New DNA Sequence Rules for High Affinity Binding to Histone Octamer and Sequence-directed Nucleosome Positioning. **Journal of Molecular Biology**, v. 276, p. 19–42, 1998.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D F; RICHMOND, T J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1997.

MAESHIMA, K.; HIHARA, S.; ELTSOV, M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 291–297, 2010.

MAKDE, R. D.; ENGLAND, J. R.; YENNAWAR, H. P.; TAN, S. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. **Nature**, v. 467, p. 562–566, 2010.

MCBRYANT, S. J.; KRAUSE, C.; WOODCOCK, CHRISTOPHER L; HANSEN, J. C. The Silent Information Regulator 3 Protein, SIR3p, Binds to Chromatin Fibers and Assembles a Hypercondensed Chromatin Architecture in the Presence of Salt. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, p. 3563–3572, 2008.

MILKS, K. J.; MOREE, B.; STRAIGHT, A. F. Dissection of CENP-C – directed Centromere and Kinetochore Assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 4246–4255, 2009.

MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Snapshot: Nuclear Receptors I. **Cell**, v. 142, p. 882, 2010.

MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P.; Force Fields for Classical Molecular Dynamics. **Methods in Molecular Biology**, v. 924, p. 197-213, 2013.

MUSSELMAN, C. A.; LALONDE, M. E.; CÔTÉ, J.; KUTATELADZE, T. G. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. **Nature Structure Molecular Biology**, v. 19, n. 12, p. 1218–1227, 2012.

NAZARI, M.; KURDI, M.; HEERKLOTZ, H. Classifying Surfactants with Respect to Their Effect on Lipid Membrane Order. **Biophysical Journal**, v. 102, p. 498–506, 2012.

OLIVEIRA, S. H. P. Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e caracterização de cavidades em regiões específicas de estruturas tridimensionais de proteínas. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O'MALLEY, B. W.; MALOVANNAYA, A.; QIN, J. Nuclear Receptor and Coregulator Proteomics - 2012 and Beyond. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 10, p. 1646–1650, 2012.

PETESCH, S. J.; LIS, J. T. Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 6, p. 285–294, 2012.

POSTNIKOV, Y.; BUSTIN, MICHAEL. Regulation of chromatin structure and function By HMGN proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, p. 62–68, 2010.

PRUNELL, A.; KORNBERG, R. D. Variable Center to Center Distance of Nucleosomes in Chromatin. **Journal of Molecular Biology**, v. 154, p. 515–523, 1982.

PRZEWLOKA, M. R.; VENKEI, Z.; BOLANOS-GARCIA, V. M. et al. CENP-C is a Structural Platform for Kinetochores Assembly. **Current Biology**, v. 21, n. 5, p. 399–405, 2011.

RAMAKRISHNAN, V. Histone structure and the organization of the nucleosome. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 26, p. 83–112, 1997.

ROBINSON, P. J. J.; AN, W.; ROUTH, A. et al. 30 nm Chromatin Fibre Decompaction Requires both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, p. 816–825, 2008.

ROBINSON, P. J. J.; FAIRALL, L.; HUYNH, V. A. T.; RHODES, D. EM measurements define the dimensions of the “ 30-nm ” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 6506–6511, 2006.

ROUSSEL, LUCIE; ERARD, M.; CAYROL, C.; GIRARD, JEAN-PHILIPPE. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. **European Molecular Biology Organization**, v. 9, p. 1006–1012, 2008.

ROUTH, A. L. The Determinants of the Structure of the 30 nm Chromatin Fibre. 2009. 165 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - MRC Laboratory of Molecular Biology, University of Cambridge, Cambridge. 2009.

ROUTH, A.; SANDIN, S.; RHODES, D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 8872–8877, 2008.

SCHALCH, THOMAS; DUDA, SYLWIA; SARGENT, DAVID F; RICHMOND, TIMOTHY J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. **Nature**, v. 436, p. 138–141, 2005.

SCHWABE, J. W. R. The role of water in protein-DNA interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 126–134, 1997.

SCREPANTI, E.; ANTONI, A. DE; ALUSHIN, G. M. et al. Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochores. **Current Biology**, v. 21, p. 391–398, 2011.

SEGAL, E.; WIDOM, J. What controls nucleosome positions? **Trends in Genetics**, v. 25, n. 8, p. 335–343, 2009.

SHAO, J.; TANNER, S. W.; THOMPSON, N.; CHEATHAM, T. E. Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 3, n. 6, p. 2312–2334, 2007..

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature reviews Immunology**, v. 10, p. 89–102, 2010.

TAN, S.; DAVEY, C. A. Nucleosome structural studies. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, p. 128–136, 2011.

THOMA, F.; KOLLER, T. H.; KLUG, A. Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-dependent Superstructures of Chromatin. **Journal of Cell Biology**, v. 83, p. 403-427, 1979

THOMAS, J. The higher order structure of chromatin and histone H1. **Journal of Cell Science Supplement**, v. 1, p. 1–20, 1984.

THOMAS, J. O.; WILSON, C. M. Selective radiolabelling and identification of a strong nucleosome binding site on the globular domain of histone H5. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 13, p. 3531–3537, 1986.

TURINSKY, A. L.; TURNER, B.; BORJA, R. C. et al. DAnCER: Disease-Annotated Chromatin Epigenetics Resource. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D889–D894, 2011.

UEDA, T.; CATEZ, F.; GERLITZ, G.; BUSTIN, MICHAEL. Delineation of the Protein Module That Anchors HMGN Proteins to Nucleosomes in the Chromatin of Living Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, p. 2872–2883, 2008.

VAN HOLDE, K. E., **Chromatin**. New York: Springer-Verlag, 1989.

VICENT, G. P.; NACHT, A. S.; FONT-MATEU, J. et al. Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. **Genes Development**, v. 25, p. 1–18, 2011.

VIDALI, G.; GERSHEY, E. L.; ALLFREY, V. G. Chemical Studies of Histone Acetylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 24, p. 6361–6366, 1968.

VOGLER, C.; HUBER, C.; WALDMANN, T. et al. Histone H2A C-Terminus Regulates Chromatin Dynamics, Remodeling, and Histone H1 Binding. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, p. 1–12, 2010.

WIDOM, J.; KLUG, A. Structure of the 300A Chromatin Filament: X-Ray Diffraction from Oriented Samples. **Cell**, v. 43, p. 207–213, 1985.

WOODCOCK, C L; FRADO, L. L. Y.; RATTNER, J. B. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, p. 42–52, 1984.

WYRICK, J. J.; HOLSTEGE, F. C. P.; JENNINGS, E. G. et al. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. **Nature**, v. 402, p. 418–421, 1999.

YANG, D.; ARYA, G. Structure and binding of the H4 histone tail and the effects of lysine 16 acetylation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 2911–2921, 2011.

ZHANG, K.; TANG, H. Analysis of core histones by liquid chromatography-mass spectrometry and peptide mapping. **Journal of Chromatography**, v. 783, p. 173–179, 2003.