

Universidade de Brasília

Isabel Torres Gomes da Silva

**Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de  
nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados  
*in silico* sobre a cromatina**

Brasília, 2017.

Isabel Torres Gomes da Silva

**Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de  
nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados *in silico*  
sobre a cromatina**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Patologia  
Molecular pelo Programa de Pós-Graduação  
em Patologia Molecular da Universidade de  
Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins  
Santos

Brasília, 2017.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular, Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

Este trabalho teve o apoio financeiro do CNPq.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, prof. Guilherme Santos, por ter me feito crescer tanto durante esse período de longo aprendizado. Um orientador extremamente dedicado e presente, que me proporcionou a incrível descoberta do mundo da cromatina e do valor da produção de uma ciência de alto impacto sem esquecer a importância dos conhecimentos básicos durante todo o processo.

Aos meus companheiros de trabalho do grupo Cromatina. Desde quem iniciou essa jornada ao meu lado, como a Manuela Leite, minha querida amiga e fiel escudeira, a Yasmim Resende, com quem dividi muitas alegrias e frustrações, e o Martin Fonkoua, por quem tenho um enorme carinho e quem me apresentou uma nova cultura. Ao Tibor Gyuris, pelo paciência e carinho que até hoje demonstra por mim. Agradeço também aos mais novos integrantes do grupo, Wanessa Felix, Vinicius Fernandes, Kaian Teles e Camyla Ribeiro e aos estagiários que estiveram conosco, em especial à Cibele Jacílhia, sempre companheira e dedicada, e a Paloma, que se tornou nossa “mascotinha” tão querida.

À família Farmol! Tantas pessoas presentes todos os dias que colaboraram para que o ambiente de trabalho se tornasse tão alegre e descontraído como uma família! Aos queridos amigos Pedro, Mariella, Alexandre, Henrique, Simone, Cinthia, Carol Lourenço, Sidney, Flora, Maria Isadora, Yasmina, Gleice, Mariana, Carol Martins, Erica, Fernanda, Bruna e Anna. Meu muito obrigada pela amizade e companheirismo de cada um.

Aos que deram apoio técnico e administrativo ao laboratório, Rilva Soares, Cristina Simeoni e Luciano Martins. Obrigada pela paciência e atenção que sempre tiveram.

Aos professores do Farmol, Angélica Amato, Francisco Neves, Djane Duarte, Marie Togashi, Luiz Simone, Fátima Borin, Michella Soares e Carine Roiter. Obrigada pelo apoio, atenção e ensinamentos.

À equipe do CNPEM, Ana Carolina Figueira e Paulo Sérgio do LNBio, Rodrigo Portugal e Alexandre Cassago do LNNano. Obrigada pela contribuição que me permitiu enriquecer esse trabalho.

Aos colegas do Instituto de Biologia da UnB, Ingrid, Cláudio, Lorena, Dani e Misleia, que me ajudaram na microscopia e tiveram toda paciência do mundo com meus desesperos.

Aos professores José Raimundo Correa, Werner Treptow e Angelo Machado pelas discussões científicas que colaboraram para esse trabalho.

À minha família e meu noivo, Fred, que são a base sólida que me mantém de pé e me fornecem todo suporte, incentivo e carinho. Com certeza não teria conseguido trilhar esse caminho sem a presença de vocês ao meu lado. Muito obrigada!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Obrigada geral e carinhoso a todos que colaboram para que este trabalho fosse realizado!

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*  
*(Charles Chaplin)*

## Resumo

SILVA, Isabel Torres Gomes. Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados *in silico* sobre a cromatina. Brasília, 2016. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

A cromatina é o principal regulador da expressão gênica e manutenção do genoma. Sua estrutura consiste de unidades repetitivas de nucleossomos, sendo estes formados por octâmeros de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) enrolados pelo DNA de 145-147pb. A regulação da estrutura da cromatina é um fenômeno extremamente dinâmico e envolve vários fatores e mecanismos. Além de proteínas ligantes de nucleossomos, que são determinantes para ditar o desfecho da cromatina, é plausível considerar que pequenas moléculas e peptídeos presentes no compartimento nuclear possuam importante ação sobre a estrutura do nucleossomo e, conseqüentemente, sobre a dinâmica da cromatina. Neste trabalho objetivamos estudar: i) impacto do colesterol sobre a estrutura da cromatina e ii) efeito de peptídeos ligantes de nucleossomo sobre a cromatina *in vitro* e em células de mamíferos. Na primeira parte desse trabalho, observamos que a ligação do colesterol à cromatina auxilia na formação de mononucleossomos e fibras de 30nm *in vitro*, assim como induz a compactação de longas fibras de cromatina. Nossa abordagem sugere que um lipídio, como o colesterol, pode ser considerado fisiologicamente uma molécula ligante de nucleossomo com influência na estrutura da cromatina. Na segunda parte, demonstramos que um peptídeo desenhado *in silico* é capaz de se ligar aos nucleossomos *in vitro* sem afetar sua estabilidade. Observamos que o peptídeo induz a compactação de fibras longas de cromatina, na presença de magnésio, *in vitro*. Análises por microscopia confocal à laser revelaram que o peptídeo é capaz de penetrar no núcleo de células Hela em cinco minutos. Ensaios de citotoxicidade revelaram que o peptídeo diminuiu a viabilidade de células tumorais (Hela, Raw 264.7 e C3H10 T1/2), o que não ocorreu com a linhagem de células normais (CCD1059). Além disso, análises da expressão relativa do gene TNF $\alpha$ , demonstraram que o peptídeo causou uma redução de até cinco vezes na expressão desse gene. Dessa forma, acreditamos que a modulação da cromatina por moléculas exógenas ligantes de nucleossomo possa ser um mecanismo valioso do ponto de vista farmacológico, podendo visar a regulação de várias desordens celulares.

Palavras-chave: cromatina, nucleossomo, colesterol, NBM.

## Abstract

SILVA, Isabel Torres Gomes. Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados *in silico* sobre a cromatina. Brasília, 2016. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Chromatin is the major regulator of gene expression and genome maintenance. Its structure consists of nucleosomes, formed by histone octamer (H2A, H2B, H3 and H4) wrapped by DNA of 145-147bp. The regulation of chromatin structure is an extremely dynamic phenomenon and involves several factors and mechanisms. In addition to the nucleosome binding proteins, which are determinant to dictate the chromatin outcome, it is plausible to consider that small molecules and peptides present in the nuclear compartment have important action on the nucleosome structure and, consequently, on the chromatin dynamics. In this work we aimed to study: i) impact of cholesterol on chromatin structure and ii) effect of nucleosome ligand peptides on chromatin *in vitro* and in cell based assays. In the first part of this work, we observed that the binding of cholesterol to chromatin assists the formation mononucleosomes and 30nm fibers *in vitro*, as well as increases stability and induces compaction of long chromatin fibers. Our approach suggests that a lipid, such as cholesterol, can be physiologically considered as a nucleosome ligand molecule with influence on chromatin structure. In the second part, we demonstrate that the peptide designed *in silico* binds to the nucleosomes *in vitro* and does not affect its stability. We observed that the peptide induces long chromatin fibers compaction in the presence of magnesium *in vitro*. Analyzes by confocal laser microscopy revealed that the peptide is able to penetrate in HeLa cell nuclei in five minutes. Cytotoxicity assays revealed that the peptide decreased the viability of tumor cells (HeLa, Raw 264.7 and C3H10 T1/2), which did not occur with the normal cell line (CCD1059). In addition, analyzes of the relative expression of the TNF $\alpha$  gene demonstrated that the peptide caused up to five-fold reduction in the expression of that gene. Thus, we believe that modulation of chromatin by exogenous nucleosome ligand molecules may be a valuable mechanism from a pharmacological point of view, and can be used to regulate various cellular disorders.

Key words: chromatin, nucleosome, cholesterol, NBM.



## Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
ATP - Adenosina Trifosfato  
AUC – Ultracentrifugação Analítica  
BAH - *Bromo-Associated Domain*  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio  
CAT - Catalase  
CBM - *Chromatin-Binding Motif*  
CCS - *Copper Chaperone For Superoxide Dismutase*  
CENP-C - *Centrome Protein C*  
CHD – *Chromodomain*  
CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
CPPs – *cell penetrating peptides*  
crDNA - DNA competidor  
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
DMSO - *Dimethyl sulfoxide*  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
DTT - Ditioneitol  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
eNBMs - *Exogenous Nucleosome Binding Molecules*  
GMIP1 - *Genetic Modified Inducible Peptide 1*  
GSR - *Glutathione Reductase*  
GSS - *Glutathione Synthetase*  
HCl- Ácido Clorídrico  
HMG-CoA - *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*  
HMGN2 - *High Mobilty Group Nucleosome binding protein 2*  
HO – Octâmero de Histonas  
HUB – Hospital Universitário de Brasília  
IL-33 - Interleucina 33  
INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

Insig - *Insulin induced gene*  
KCl- Cloreto de Potássio  
Kd - Constante de Dissociação  
KSHV - *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*  
LANA - *Latency-Associated Nuclear Antigen*  
LB - Luria-Bertani  
LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia  
LPS – Lipopolisacarídeo  
MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de Magnésio  
MM – Master Mix  
MNase – Micrococcal Nuclease  
MRC - *Medical Research Council*  
MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
NaCl –Cloreto de Sódio  
NBD – *Nucleosome Binding Domain*  
NBMs – Moléculas Ligantes de Nucleossomo  
NBPs - *Nucleosome Binding Proteins*  
NCP – *Nucleosome core particle*  
NHS - *N-Hydroxysuccinimide*  
NLS - *Nuclear Localization Signal*  
PBS - *Phosphate-buffered Saline*  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
PDB - *Protein Data Bank*  
PEG – Polietilenoglicol  
PNKP - *Polynucleotide kinase/phosphatase*  
PRC1 - *Polycomb repressive complex 1*  
PTMs -Modificações Pós-Traducionais  
RCC1 - *Regulator of Chromosome Condensation*  
RE – Retículo Endoplasmático  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
RNA –Ácido Ribonucleico  
SAGA - *Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase*  
SCAP - *Cleavage-Activating Protein*  
SDS-PAGE - Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida

Sir3 - *Silent Information Regulator 3*

SOD - *Superoxide dismutase*

SREBPs - *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

TAMRA - *Tetramethylrhodamine*

TBE - Tris/Borato/EDTA

TE - Tris-HCl/EDTA

TEA – Trietanolamina

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alpha

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplo de titulação de octâmero de histonas para formação de fibras de cromatina.	40
Tabela 2. Exemplo de titulação de H5.....	42
Tabela 3. Mapa de interação dos peptídeos/proteínas com patch ácido e desfecho da cromatina. ....	75
Tabela 4. Dados da triplicata da expressão do RNAm do gene TNF $\alpha$ por PCR em tempo real. .	95
Tabela 5. Dados da triplicata da expressão do RNAm do gene TNF $\alpha$ por PCR em tempo real .	96

## Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura do nucleossomo .....	18
Figura 2. Mapa dos sítios de interação de proteínas com o nucleossomo .....	19
Figura 3. Compactação da cromatina .....	20
Figura 4. Esquema dos modelos de fibra de 30nm.....	21
Figura 5. Estrutura química do colesterol.....	26
Figura 6. Modelo de organização lipídica em domínio de raft na membrana plasmática .....	27
Figura 7. Ensaio de termo estabilidade de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas <i>in vitro</i>	31
Figura 8. Integridade das histonas utilizadas .....	33
Figura 9. Plasmídeo (pUC18) contendo o arranjo 197.25 e sítios de enzimas de restrição.....	34
Figura 10. Digestão do plasmídeo 177.36. ....	36
Figura 11. Digestão do plasmídeo 167.80 .....	36
Figura 12. Exemplo de etapas de purificação dos longos fragmentos de DNA .....	37
Figura 13. DNA 167.1 purificado.....	37
Figura 14. Esquema ilustrativo das etapas realizadas na reconstituição <i>in vitro</i> de fibras de cromatina de 10nm.....	40
Figura 15. Esquema ilustrativo da formação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída <i>in vitro</i> .....	41
Figura 16. Esquema ilustrativo da formação da fibra de 30nm .....	42
Figura 17. Efeito dose-resposta do colesterol sobre o mononucleossomo .....	46
Figura 18. Formação da fibra de cromatina compactada em presença de colesterol.....	47
Figura 19. Efeito dose-resposta de magnésio sobre a compactação de fibras de cromatina de 10nm .....	47
Figura 20. Efeito do colesterol sobre a compactação das fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio .....	48
Figura 21. Esquema ilustrativo do acesso a digestão com a enzima MNase.....	49
Figura 22. Ensaio de MNase de fibras de cromatina de 10nm na ausência e presença de colesterol.....	50
Figura 23. Digestão com MNase de DNA livre na presença e ausência de colesterol. ....	50
Figura 24. Ensaio de ligação do colesterol marcado com as fibras de cromatina de 10nm.....	51
Figura 25. Ligação do colesterol às fibras de cromatina de 10nm e indução de compactação por magnésio .....	52
Figura 26. Fibras visualizadas por contraste negativo com acetato de uranila 1,5% .....	53
Figura 27. ME de fibras de cromatina de 30nm reconstituídas <i>in vitro</i> .....	54
Figura 28. Núcleo de células Hela tratados com veículo e diferentes concentrações de colesterol .....	55
Figura 29. Interação da cauda da H4 com o patch ácido.....	63
Figura 30. Regiões de interação do LANA com dímero H2A/H2B.....	64

Figura 31. Comparação da forma de interação de IL-33 e LANA com dímero de H2A/H2B ...	65
Figura 32. Complexo RCC1/nucleossomo .....	67
Figura 33. Docking da estrutura do HMGN2-NBD complexado ao NCP .....	68
Figura 34. Interações entre BAH-Sir3 e o nucleossomo.....	69
Figura 35. Estrutura de CENP-C/NCP quimérico .....	70
Figura 36. Interação do módulo de ubiquitinação de PRC1 com o nucleossomo .....	72
Figura 37. Interação de SAGA-DUB com nucleossomo .....	73
Figura 38. Hipótese de mudanças na arquitetura da cromatina na ligação de NBP e eNBM.....	74
Figura 39. Sítio de ancoragem de argininas no patch ácido .....	75
Figura 40. Esquema ilustrativo do thermal shift de nucleossomos .....	80
Figura 41. Ensaio de ligação de GMIP1 e cauda da H4 ao mononucleossomo .....	85
Figura 42. Ensaio de ligação dos peptídeos ao mononucleossomo.....	86
Figura 43. Ligação de GMIP1 fluorescente ao mononucleossomo.....	87
Figura 44. Especificidade de ligação de GMIP1 ao nucleossomo .....	88
Figura 45. Ensaio de deslocamento térmico de mononucleossomos com peptídeos.....	89
Figura 46. Ensaio da compactação de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas in vitro induzida por magnésio .....	90
Figura 47. GMIP1-TAMRA penetra no núcleo de células Hela .....	91
Figura 48. Análise de células Hela tratadas com 1uM GMIP1-TAMRA à 37°C e 4°C.....	92
Figura 49. Ensaio de viabilidade de células tumorais tratadas com GMIP1 .....	93
Figura 50. Análise de viabilidade de células normais tratadas com GMIP1 .....	94
Figura 51. Ensaio de viabilidade de células tratadas com LANA.....	94
Figura 52. Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$ em células induzidas com LPS e tratadas com GMIP1 por PCR em tempo real .....	96
Figura 53. Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$ em células induzidas com LPS e tratadas com GMIP1 e LANA por PCR em tempo real.....	97

## Índice

Agradecimentos .....	4
Resumo .....	7
Abstract.....	8
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	9
Índice de Tabelas.....	12
Índice de Figuras .....	12
Prefácio .....	16
Introdução geral.....	18
Nucleossomo.....	18
Cromatina: Fibras de 10nm e 30nm .....	19
Fatores determinantes da arquitetura da cromatina .....	21
Objetivo geral.....	24
PARTE I.....	25
Ação do colesterol sobre a cromatina .....	25
1. Introdução.....	26
a) Colesterol .....	26
b) Colesterol e cromatina .....	28
2. Objetivos Específicos .....	32
3. Materiais e Métodos .....	33
a) Histonas.....	33
b) Sequências de DNA.....	33
c) Colesterol .....	38
d) Reconstituição de fibras longas de cromatina e mononucleossomo.....	39
e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio ....	43
f) Digestão enzimática de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas <i>in vitro</i> com MNase (Micrococcal Nuclease).....	43
g) Ensaio de ligação de colesterol fluorescente a fibras de cromatina de 10nm .....	43
h) Visualização das fibras de cromatina reconstituídas <i>in vitro</i> por microscopia eletrônica .....	44
i) Visualização de núcleo de células tratados com colesterol .....	44
4. Resultados.....	46
a) Colesterol auxilia na formação de mononucleossomos reconstituídos <i>in vitro</i> .....	46
b) Colesterol auxilia na formação de fibras de 30nm .....	46
c) Colesterol auxilia na compactação de fibras de 10nm induzida por magnésio .....	47
d) Colesterol protege as fibras de cromatina de 10nm de digestão enzimática com MNase .....	49

e)	Colesterol se liga às fibras de cromatina reconstituídas <i>in vitro</i> .....	50
f)	Microscopia Eletrônica (ME) das fibras de cromatina reconstituídas <i>in vitro</i> : colesterol auxilia a formação das fibras de 10 e 30nm.....	52
g)	Colesterol não altera a morfologia do núcleo de células Hela.....	54
5.	Discussão e conclusão .....	56
PARTE II.....		61
Ação de peptídeos desenhados <i>in silico</i> sobre a cromatina .....		61
1.	Introdução.....	62
a)	NBMs (Moléculas ligantes de nucleossomo) .....	62
b)	Superfície do nucleossomo e dinâmica da cromatina .....	73
c)	GMIP1.....	76
2.	Objetivos específicos.....	77
3.	Materiais e Métodos .....	78
a)	Histonas, sequencias das DNA, e reconstituição de mononucleossomos e fibras de cromatina .....	78
b)	Peptídeos ligantes de nucleossomo .....	78
c)	Ensaio de ligação de peptídeos a mononucleossomos reconstituídos <i>in vitro</i> .....	78
d)	Ensaio de deslocamento térmico ( <i>Thermal shift</i> ) .....	80
e)	Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio .....	81
f)	Visualização de GMIP1 marcado em células por microscopia de fluorescência confocal.....	81
g)	Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	82
h)	Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$ em cultura de células induzida por LPS.....	83
4.	Resultados.....	85
a)	GMIP1 se liga ao mononucleossomo <i>in vitro</i> .....	85
b)	GMIP1 não afeta a estabilidade do mononucleossomo .....	88
c)	GMIP1 auxilia a compactação de fibras de cromatina de 10nm induzidas por magnésio .....	90
d)	GMIP1 penetra o núcleo de células de mamífero .....	91
e)	GMIP1 diminui a viabilidade celular (MTT).....	93
f)	GMIP1 reprime a expressão de TNF $\alpha$ em cultura de células induzidas por LPS .....	95
5.	Discussão e conclusão .....	98
6.	Referências Bibliográficas.....	102
ANEXO A.....		110
ANEXO B.....		113

## Prefácio

### **Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de nucleossomo: impacto do colesterol e de peptídeos desenhados *in silico* sobre a cromatina**

Em núcleo de células eucarióticas, o DNA genômico é hierarquicamente empacotado por proteínas histonas na forma de cromatina. A cromatina é determinante para a regulação celular e também para a manutenção do genoma. A cromatina é formada por unidades repetitivas de nucleossomos, sendo estes constituídos por octâmeros de histonas (dois dímeros de H2A/H2B e um tetrâmero de H3/H4) enrolados 1,7 vezes pelo DNA de 145-147pb.

A cromatina é capaz de controlar o acesso de proteínas e outras moléculas, como o RNA, ao DNA através de alterações dinâmicas em sua estrutura, regulando assim a expressão genica e manutenção do genoma. De forma simplista, a cromatina é encontrada em duas formas, relaxada, conhecida como fibra de 10nm, ou condensada, fibra de 30nm.

Diversos fatores contribuem para a compactação e formação da fibra de cromatina de 30nm. Ressaltamos aqui a ligação da cauda (região amino terminal flexível) da histona H4 à uma região do nucleossomo adjacente que contém resíduos de aminoácidos com carga negativa, o *patch* ácido. Esta interação é capaz de induzir a proximidade entre os nucleossomos e assim promover a compactação da cromatina.

Com o objetivo de identificar e caracterizar moléculas com potencial para se ligar ao nucleossomo e, assim, modular a arquitetura da cromatina, estudamos (i) a ação do colesterol e (ii) de peptídeo desenhado *in silico* sobre fibras de cromatina e mononucleossomos reconstituídos *in vitro*. Desta forma, esse trabalho foi dividido em duas partes, contendo uma introdução geral sobre a cromatina e os objetivos gerais do trabalho, seguidos pela Parte I: “Ação do colesterol sobre a cromatina” e parte II: “Ação de peptídeo desenhado *in silico* sobre a cromatina”.

Para formação *in vitro* destas estruturas, utilizamos histonas extraídas de eritrócitos de galinha e arranjos de DNA sintético com forte posicionamento de nucleossomos.



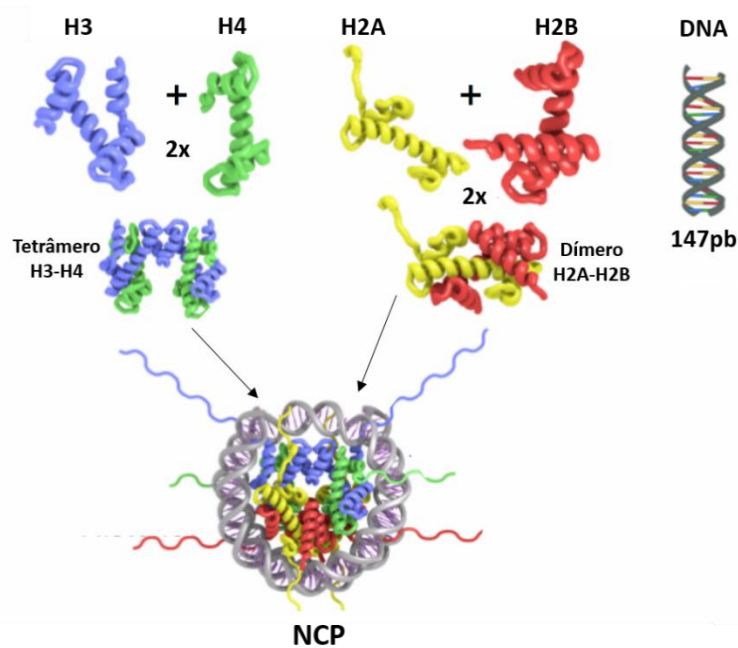
Ensaio bioquímico *in vitro* mostraram que o colesterol auxilia na formação do mononucleossomo, sendo necessária menor concentração de octâmero de histonas na reação. Este mesmo efeito foi observado na formação das fibras de 30nm, sugerindo ainda que o colesterol estabiliza as fibras compactadas. Corroborando estes achados, observamos que o colesterol induz a compactação de fibras de 10nm na presença de  $Mg^{2+}$ . Através da digestão enzimática com MNase, demonstramos que o colesterol apresentou um efeito protetor sobre a fibra de 10nm, sugerindo que esta estrutura se encontra mais compactada que as fibras na ausência do colesterol. Estudos de dinâmica molecular realizados por nossos colaboradores (não apresentados neste trabalho) sugerem que o colesterol se liga a regiões específicas no mononucleossomo, afetando sua estrutura. Desta forma, nossos resultados sugerem que o colesterol possui uma ação, nunca antes demonstrada, sobre a modulação da estrutura da cromatina.

Na segunda parte do trabalho, mostramos que o peptídeo (GMIP1) desenhado *in silico*, baseado na estrutura cristalográfica do complexo nucleossomo:RCC1 (proteína remodeladora da cromatina), e marcado com fluoróforo (Dylight 488) se liga ao mononucleossomo. Além disso, demonstramos a capacidade do peptídeo em penetrar o núcleo de células eucarióticas (células Hela) por meio da microscopia de fluorescência confocal. Através de ensaios de citotoxicidade (MTT), mostramos também que GMIP1 diminuiu a viabilidade celular de três linhagens tumorais (Hela, Raw 264.7, C3H10T1/2), a partir da concentração de 50 $\mu$ M. Para observar a ação deste peptídeo sobre a atividade transcricional do TNF alfa, gene envolvido na cascata inflamatória, tratamos as células (Raw 264.7) com o LPS (indutor da inflamação) e posteriormente com GMIP1, nas concentrações de 1 a 100 $\mu$ M. Por PCR em tempo real, observamos que GMIP1 reduziu significativamente (5 vezes) a expressão de TNF $\alpha$ . Nossos resultados sugerem que GMIP1 é uma molécula ligante de nucleossomo, com grande potencial terapêutico.

## Introdução geral

### Nucleossomo

Em núcleo de células eucarióticas, o DNA genômico é hierarquicamente empacotado por proteínas histonas na forma de cromatina. A cromatina é formada por unidades repetitivas de nucleossomos, sendo estes constituídos por octâmeros de histonas (dois dímeros de H2A/H2B e um tetrâmero de H3/H4) enrolados 1,7 vezes pelo DNA de 145-147pb (Figura 1) (KAROLIN et al., 1997).



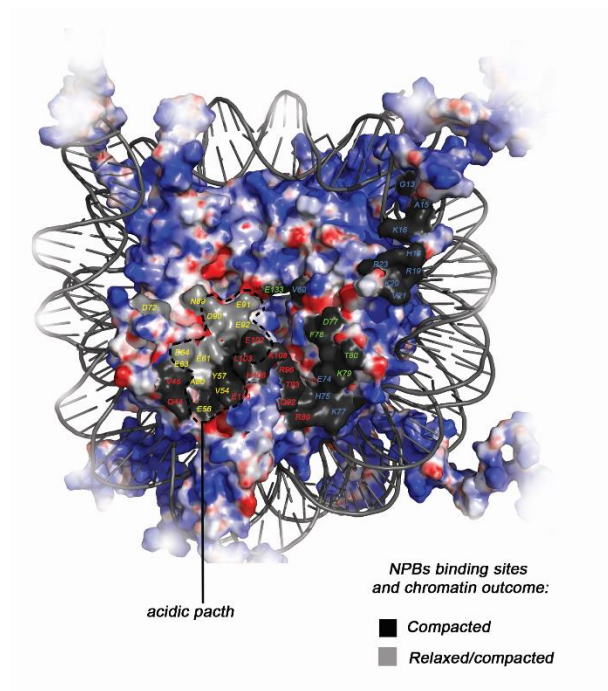
**Figura 1. Estrutura do nucleossomo.** Histonas H3 e H4 formando um tetrâmero e histonas H2A e H2B formando dois dímeros. Essas estruturas são enroladas por 147pb formando a partícula central do nucleossomo (NCP). Adaptado de (DRAIZEN et al., 2016).

O nucleossomo ou NCP (*nucleosome core particle* - partícula central do nucleossomo) é considerado o primeiro nível de empacotamento do DNA e a primeira barreira transcricional, portanto é um elemento chave da regulação da expressão gênica (BINTU et al., 2012).

Em 2002, Davey e colaboradores apresentaram a estrutura cristalográfica do nucleossomo em alta resolução (1,9 Å), o que permitiu detalhar com acurácia as interações moleculares do complexo em solução e a importância de moléculas de água na estabilização da estrutura. Foram identificadas 3.130 moléculas de água ao redor do nucleossomo (DAVEY et al., 2002). Os pesquisadores mostraram que a contribuição de ligações diretas e ligações de hidrogênio para a estabilidade do NCP é

aproximadamente igual (116 e 121 respectivamente), o que ressalta a importância da água nesse complexo (DAVEY et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que a água auxilia na adaptação da superfície das histonas a variações conformacionais do DNA, o que sugere que as moléculas de água possuem um papel fundamental em facilitar a mobilidade do nucleossomo.

O nucleossomo possui uma região chamada “*patch* ácido”, formada pelas histonas H2A e H2B. Essa região, composta por seis resíduos de aminoácidos da histona H2A e dois da H2B é um importante sítio de ligação de diversas proteínas. A interação de proteínas ligantes de nucleossomo regula a estrutura da cromatina, favorecendo a condensação ou relaxamento, dependendo da molécula ligante (Figura 2) (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015). O *patch* ácido e as moléculas que se ligam a essa região serão abordados com maior profundidade na segunda parte desse documento.



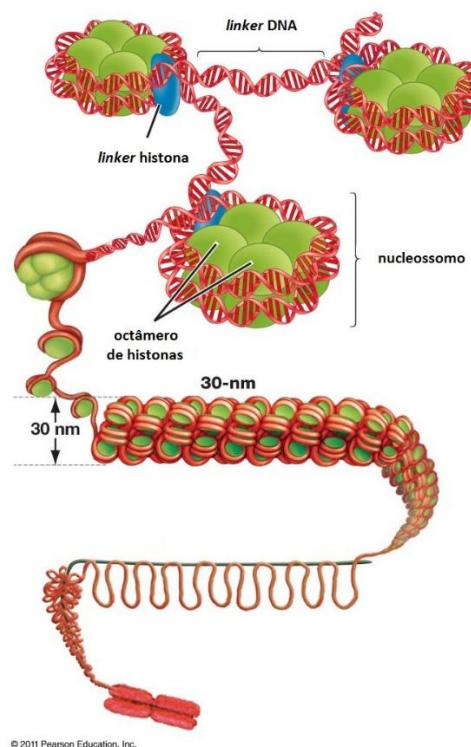
**Figura 2. Mapa dos sítios de interação de proteínas com o nucleossomo.** Nucleossomo com as histonas representadas em superfície colorida por carga eletrostática (azul: positivo; vermelho: negativo) e o DNA em representação de *cartoon*. Resíduos das histonas que fazem interação com proteínas, coloridos em preto ou cinza, dependendo do desfecho da cromatina, compactada ou relaxada, respectivamente. Adaptado de (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015)

### **Cromatina: Fibras de 10nm e 30nm**

A cromatina é compactada em diversos níveis hierárquicos, desde o nucleossomo até o cromossomo (Figura 3). Os nucleossomos são conectados por

pequenos segmentos de DNA (*linker* DNA), que podem ter seu tamanho variável (0-80pb) entre diferentes organismos e tipos celulares (WIDOM, 1992). A repetição desses nucleossomos, espaçados pelo *linker* DNA ao longo da dupla-fita constitui a fibra de cromatina de 10nm, também conhecida como “colar de contas” (“*beads on a string*”).

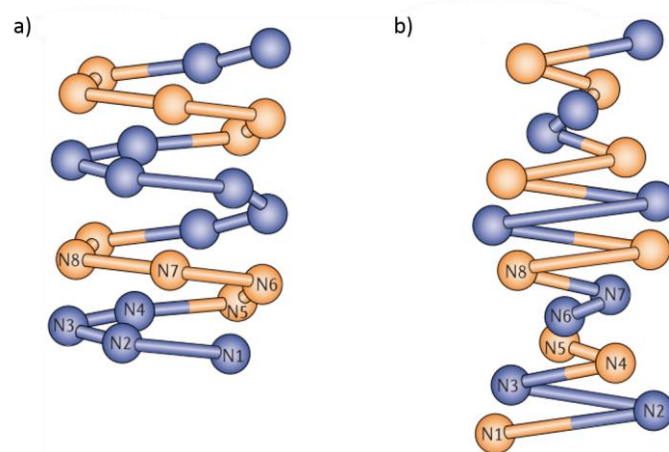
O próximo nível de compactação da cromatina é a estrutura de 30nm (ROBINSON et al., 2006), que nada mais é do que a forma condensada da fibra de 10nm. Sua formação é favorecida pelos seguintes fatores: i) presença de íons divalentes que se ligam ao DNA, reduzindo sua carga residual; ii) ligação da cauda da histona H4 ao nucleossomo adjacente, que promove a aproximação entre eles (DORIGO et al., 2003); iii) modificações pós-traducionais de histonas; iv) ligação de uma quinta proteína, a *linker* histona (H1) e v) interação de moléculas ligantes de nucleossomo (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015).



**Figura 3. Compactação da cromatina.** Nucleossomos, formados pelo octâmero de histonas e DNA, conectados pelo *linker* DNA, formando a estrutura de colar de contas. Observa-se também a ligação ilustrativa da *linker* histona e a compactação da fibra até a condensação cromossômica. Adaptado de (REECE et al., 2011).

Em 1974, foram publicadas as primeiras estruturas da fibra de cromatina aberta, extraídas de timo de rato e eritrócito de galinha, visualizadas por contraste positivo e negativo no microscópio eletrônico (OLINS; OLINS, 1974). Dois anos depois, foi proposto o primeiro modelo para estrutura da fibra compactada (FINCH;

KLUG, 1976). Finch e Klug propuseram o modelo chamado “solenoide”, em que os nucleossomos adjacentes são conectados pelo *linker* DNA que se dobra para o interior da fibra caracterizando interações entre os nucleossomos consecutivos (Figura 4a) (FINCH; KLUG, 1976). Após alguns anos, um segundo modelo, “zig-zag”, foi proposto baseado em observações microscópicas de nucleossomos isolados, no qual ocorre uma ligação reta dos nucleossomos adjacentes implicando em interações de nucleossomos alternados (WORCEL; STROGATZT; RILEY, 1981) (Figura 4b).



**Figura 4. Esquema dos modelos de fibra de 30nm.** a) Modelo caracterizado pelas interações entre os nucleossomos consecutivos (n1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6); b) Modelo zig-zag, demonstrando que as interações acontecem entre nucleossomos alternados (n1-3, 2-4, sucessivamente). Adaptado de (LUGER; DECHASSA; TREMETHICK, 2012).

O modelo zig-zag foi reafirmado em 2005, em estudo que demonstrou a estrutura cristalográfica de um tetranucleossomo (SCHALCH et al., 2005). Com os avanços na microscopia eletrônica, recentemente foi revelada, em baixa resolução, a estrutura de uma fibra longa de cromatina compactada na presença de *linker* histona, corroborado o modelo zig-zag e trazendo novos *insights* sobre a organização inter e intranucleossomal (SONG et al., 2014). Entretanto, o dinamismo da cromatina ainda deixa em aberto diversas questões sobre seu comportamento *in vivo*.

### Fatores determinantes da arquitetura da cromatina

A cromatina pode ser classificada em eucromatina e heterocromatina. A eucromatina é considerada a forma ativa, devido a sua estrutura estar mais relaxada (fibra de 10nm) e, dessa forma, mais acessível aos fatores de transcrição e maquinaria transcricional basal. Enquanto que a heterocromatina está mais condensada e, portanto,

associada ao silenciamento gênico e baixa atividade transcricional (GREWAL; ELGIN, 2007; HSU, 1962).

A regulação da estrutura da cromatina é um fenômeno extremamente dinâmico e envolve vários fatores e mecanismos. A presença de cátions mono ou divalentes é um destes fatores. Trabalho publicado em 2010 demonstrou diferentes graus de compactação das fibras de cromatina, por meio da ultra centrifugação analítica (AUC), frente à adição de diferentes cátions (KOROLEV et al., 2010). O artigo demonstrou que quanto maior a valência do cátion, menor a concentração de íons necessária para atingir a máxima compactação. Esse efeito é obtido pela neutralização da carga residual do DNA e facilitação da atração nucleossomo-nucleossomo e DNA-DNA. O magnésio é o cátion divalente mais comumente utilizado nos trabalhos para compactação de cromatina, sendo necessária uma concentração de apenas 1mM para atingir a máxima compactação das fibras (KOROLEV et al., 2010).

A cauda da histona H4 é outro fator determinante para a modulação da estrutura da cromatina. Já foi demonstrado que é possível atingir a compactação das fibras de cromatina com a deleção de qualquer cauda das histonas H2A, H2B e H3, com exceção da cauda da histona H4 (DORIGO et al., 2003). Sabe-se que a cauda da histona H4 se liga ao *patch* ácido no nucleossomo adjacente, promovendo a aproximação entre eles, auxiliando a compactação da fibra (KAROLIN et al., 1997).

No entanto, quando a cauda da histona H4 é acetilada ocorre neutralização de cargas, inibindo a ligação ao nucleossomo adjacente e, assim, causando um relaxamento da estrutura da cromatina (SHOGREN-KNAAK et al., 2006). Portanto, as modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas são também fatores que podem modular o empacotamento da cromatina e a ligação de proteínas regulatórias (ZENTNER; HENIKOFF, 2013).

Além disso, mostrou-se que a completa descompactação da cromatina só é atingida quando ocorre também a perda da *linker* histona (ROBINSON et al., 2008). Não se sabe ao certo o modo de ligação dessa histona, mas existem evidências de que a ligação ocorre na região de entrada e saída do DNA (região *dyad*) (SONG et al., 2014).

A incorporação de variantes de histonas nos nucleossomos é outro fator que proporciona diferentes propriedades biofísicas nas fibras de cromatina, podendo

ocasionar novas PTMs e regular a ligação de moléculas à fibra (PAPAMICHOS-CHRONAKIS; PETERSON, 2013).

Em contraste com as histonas canônicas, as variantes de histonas são sintetizadas e montadas em nucleossomos independentemente da replicação do DNA, o que sugere que a sua incorporação na cromatina pode ter impactos consideráveis tanto na geração como na manutenção epigenética de regiões específicas da cromatina (JIN et al., 2005). Além disso, os remodeladores de cromatina (enzimas dependentes de ATP) podem causar o reposicionamento de nucleossomos, evicção de histonas e incorporação de variantes (CLAPIER; CAIRNS, 2009).

Ademais, a ligação de moléculas ao nucleossomo pode também alterar essa dinâmica. Conforme já mencionado, a concentração dessas moléculas no meio pode modificar o desfecho da arquitetura da cromatina, uma vez que a ligação de determinada proteína ou peptídeo leva ao relaxamento ou compactação da fibra (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015). Portanto, é plausível considerar que pequenas moléculas e peptídeos presentes no compartimento nuclear possuam importante ação sobre a estrutura do nucleossomo e, conseqüentemente, sobre a dinâmica da cromatina.

Nossos estudos focaram em dois tipos de moléculas ligantes de nucleossomos, candidatas a alteração da arquitetura da cromatina: colesterol e peptídeos, que serão abordados com maior profundidade nas partes I e II respectivamente.

## **Objetivo geral**

Caracterizar e desenvolver moléculas ligantes de nucleossomo que possam regular a estrutura da cromatina.



## **PARTE I**

### **Ação do colesterol sobre a cromatina**

## 1. Introdução

### a) Colesterol

O colesterol é um álcool de cadeia longa, também considerado como esteroide, devido à presença do sistema tetracíclico, característico dessa classe (Figura 5). A molécula apresenta três regiões: uma cauda de hidrocarbonetos, uma região com quatro anéis de carbono e um grupo hidroxila. O grupo hidroxila é polar, já os anéis de carbono e a cauda de hidrocarbonetos são apolares. Por essa razão, o colesterol é considerado anfipático, ou seja, possui uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso) e outra região hidrofóbica (solúvel em solventes orgânicos) (ALBERTS et al., 1994).

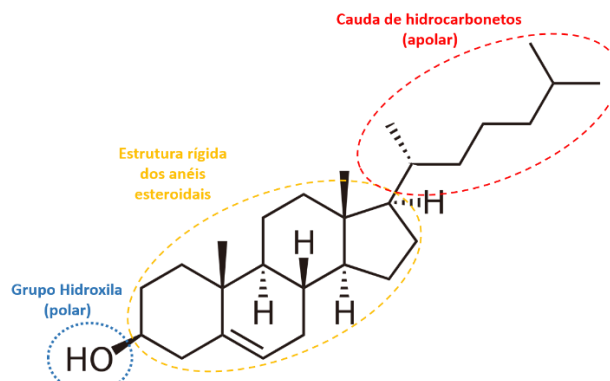


Figura 5. Estrutura química do colesterol.

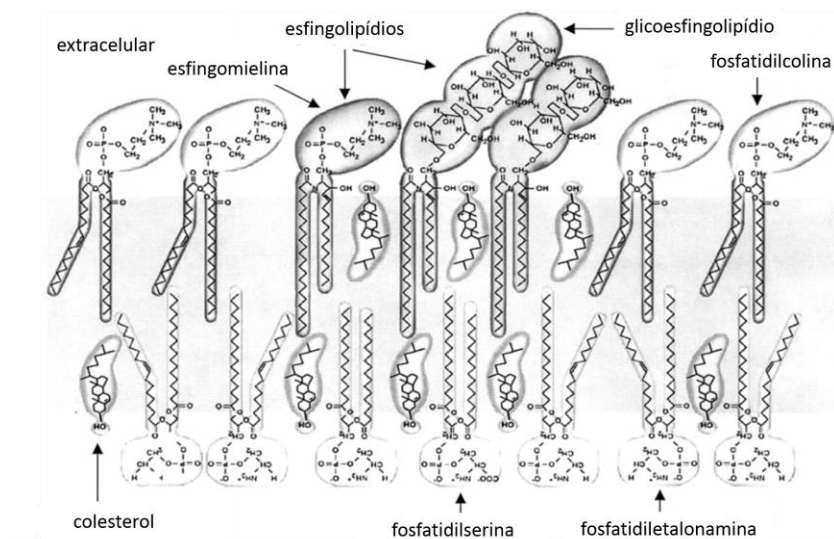
Os lipídeos, em geral, são caracterizados como insolúveis em água. O colesterol é solubilizado por fosfolipídios, tanto nas membranas, quanto em lipoproteínas no plasma (COOPER, 1978). Os lipídeos e os componentes das lipoproteínas afetam vários aspectos do comportamento celular, incluindo sobrevivência e diferenciação. No caso, o colesterol, uma molécula ubíqua na célula, apresenta alta relevância fisiológica por seu envolvimento em patologias graves, como a aterosclerose, e por ser crucial para a integridade da membrana celular (ALBERTS et al., 1994).

Sabe-se que o colesterol representa em torno de 20-30% de todo conteúdo lipídico presente nas membranas. Devido ao esqueleto de esteroide rígido, o colesterol é preferencialmente posicionado próximo a cadeias de hidrocarbonetos saturados de lipídeos vizinhos. O aumento da ordenação lateral dos lipídeos, que é causada pelo colesterol, afeta conseqüentemente as propriedades biofísicas da membrana, diminuindo a fluidez e reduzindo a permeabilidade das moléculas polares (SIMONS; VAZ, 2004).

Concentrações intermediárias de colesterol são encontradas nos endossomos e na região trans do complexo de Golgi, enquanto baixas quantidades de colesterol (5% do que é encontrado na membrana plasmática) estão nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (WÜSTNER; SOLANKO, 2015).

Três domínios têm sido propostos para organização do colesterol na membrana: i) baixa concentração de colesterol e rápida troca de fase fluida, onde o colesterol se encontra monomericamente distribuído de forma aleatória, podendo migrar rapidamente de um lado ao outro da bicamada; ii) fluido rico em colesterol menos dinâmico, mas ainda permutável, onde o colesterol está presente nas duas camadas e se alterna com os fosfolípidios; iii) domínio lento e sem migração, com colesterol praticamente puro (BURGER; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2000).

Existem ainda os chamados domínios de fase líquida ordenada ou “*lipid rafts*”, os quais são ricos em colesterol e esfingolípídios e apresentam inserções de proteínas específicas, influenciando na fluidez da membrana e no tráfego de proteínas, ocasionando uma sinalização celular específica (Figura 6) (SIMONS; IKONEN, 1997). O interesse por esses domínios se intensificou à medida que foram evidenciados vários estudos demonstrando a importância dessa sinalização de uma diversidade de patologias, como Alzheimer, Parkinson e HIV por exemplo (MICHEL; BAKOVIC, 2007).



**Figura 6. Modelo de organização lipídica em domínio de raft na membrana plasmática.** Adaptado de (BURGER; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2000).

O colesterol destaca-se também por ser precursor de hormônios esteroidais, como a progesterona, estrógeno e testosterona. Os níveis de hormônios esteróides no sangue variam com periodicidade específica ou em resposta a mudanças fisiológicas ou patológicas, e assim regulam diversos processos celulares. A concentração desses hormônios depende da síntese e excreção contínua de esteroides, os quais tem sua biossíntese iniciada pela hidrólise do colesterol (HANUKOGLU, 1992).

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático, por meio de síntese a partir de Acetil-CoA, ou derivado da dieta. A descrição do mecanismo de regulação do metabolismo do colesterol rendeu o prêmio Nobel de fisiologia e medicina aos pesquisadores Joe Goldstein e Mike Brown em 1985. Os pesquisadores identificaram o conjunto complexo de interações de moléculas coordenadas que regulam a importação e síntese do colesterol, além da determinação da função de proteínas crucias nesse processo.

A homeostase do colesterol é regulada pela proteína de ligação ao elemento de resposta à esterol (SREBP) no retículo endoplasmático (RE) (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). Em níveis normais de colesterol (5% do total de lipídeos da membrana do RE), a SREBP é complexada com duas proteínas: Insig-1 ou 2 e SCAP (proteína de ativação de clivagem de SREBP), sendo que, esta última possui um domínio de detecção de esterol. Quando o colesterol se encontra ligado à SCAP, a Insig1(2) bloqueia a ligação dessa proteína com Sec 24 (proteína de revestimento das vesículas), evitando que o complexo SCAP-SREBP-colesterol entre para as vesículas de transporte do RE. Uma vez que os níveis de colesterol caem, a proteína Insig1 se dissocia do complexo, que é transportado nas vesículas para o aparelho de Golgi. No aparelho de Golgi, a proteína SREBP é clivada e um de seus fragmentos, SREBPn (SREBP nuclear), é translocado ao núcleo onde ativa a transcrição de genes como o da proteína HMG-CoA redutase, enzima importante na cascata de síntese do colesterol, e do receptor de LDL, proteína que importa o colesterol para dentro das células (GOLDSTEIN; DEBOSE-BOYD; BROWN, 2006)

#### **b) Colesterol e cromatina**

Além da presença do colesterol nas organelas citadas anteriormente, sabe-se que esta molécula é transportada também para o núcleo. A presença de lipídeos no

núcleo foi originalmente descrita apenas como suporte estrutural do envelope nuclear. No entanto, esse conceito foi revisto quando foram reconhecidas importantes sinalizações, além do papel modulatório de lipídios e seus produtos metabólicos em vários compartimentos nucleares, como cromossomos e matriz nuclear (LEDEEN; WU, 2004; STRUCHKOV; STRAZHEVSKAYA; ZHADANOV, 2002).

O primeiro estudo que mostrou a presença de lipídeos no núcleo foi publicado em 1939 (STONEBURG, 1939). Nesse trabalho foram analisados núcleo de músculo de coração de boi, músculo de coxa de coelho, periferia de tumor e célula de pus retiradas de casos de empiema. Os autores demonstraram uma quantidade considerável de lipídeos no núcleo e destacaram a alta concentração de fosfolipídios e colesterol em todos os tecidos analisados (STONEBURG, 1939).

Após essa publicação, vários estudos surgiram evidenciando os diferentes tipos de lipídeos presentes no núcleo. Apesar disso, existia uma crítica quanto aos métodos utilizados na época, a respeito de possíveis contaminações da membrana nuclear e de outras estruturas durante o procedimento de extração (TATA; HAMILTON; COLE, 1972). No entanto, a crítica não se aplicava a estudos citoquímicos, nos quais mostrou-se a associação de fosfolipídios à cromatina (GAHAN et al., 1974; VIOLA-MAGNI; GAHAN; PACY, 1985).

A associação entre o colesterol e a cromatina foi publicada em 1983 em um trabalho que demonstrou a ligação específica de colesterol exógeno ligado à cromatina em células de fígado de camundongo (REGENASS-KLOTZ; HEINIGER, 1983). Essas células foram incubadas com diferentes concentrações de colesterol marcado com trítio ( $[^3\text{H}]$  colesterol), em vários intervalos de tempo. Posteriormente, a cromatina foi extraída e analisada por cromatografia. A ligação do colesterol à cromatina foi saturada em 100 pmol/mL, atingindo  $9.8 \times 10^3$  ( $\pm 0.5 \times 10^3$ ) moléculas de colesterol ligadas por núcleo. Com isso estimou-se uma constante de dissociação na ordem de  $10^{-9}$  M, resultado comparável à relação dos esteroides e receptores nucleares (REGENASS-KLOTZ; HEINIGER, 1983).

Após quase uma década, foi mostrada novamente a ligação de um colesterol exógeno à cromatina de células de neuroblastoma de camundongo (YAMASHITA; TSUJI, 1992). Esse trabalho demonstrou mudanças conformacionais na cromatina, através de dicroísmo circular, associado a um aumento dos níveis de transcrição.

A presença de colesterol endógeno foi demonstrada em 2002, em trabalhos que mostram o colesterol ligado à cromatina em células de fígado de camundongo e células de timo e eritrócito de rato (ALBI; MAGNI, 2002; STRUCHKOV; STRAZHEVSKAYA; ZHADANOV, 2002). O núcleo e a cromatina das células foram isolados, e a fração lipídica foi extraída e analisada por cromatografia. Albi e Magni demonstraram a existência de quantidades iguais de colesterol e esfingomielina ligados à cromatina, representando 9% do total de fosfolípidios. Por meio de experimentos com esfingomielinase, foi proposta a existência de duas formas de colesterol associado à cromatina, uma de colesterol livre e outra complexado à esfingomielina (ALBI; MAGNI, 2002).

Além disso, foram verificados os níveis de colesterol durante diferentes intervalos de tempo após uma hepatectomia nos camundongos. Após as primeiras horas, houve um aumento de colesterol acompanhado por um forte aumento da fração ligada à esfingomielina, seguido por uma diminuição progressiva, em contraste com o comportamento da quantidade de colesterol. Dezoito horas após a hepatectomia, quando hepatócitos começam a sintetizar DNA, a quantidade total de colesterol dobrou, enquanto que a fração livre aumentou quatro vezes, indicando um possível papel do colesterol na duplicação celular (ALBI; MAGNI, 2002).

O envolvimento do colesterol com a duplicação celular e seu aumento em células de tumor já havia sido reportado há muitos anos (RAO, 1986). No entanto, os trabalhos publicados não focavam em localização celular ou compreensão do mecanismo envolvido. Recentemente, a influência do colesterol sobre a proliferação celular foi confirmada em estudo que analisou a síntese de DNA e RNA em cultura de células de linfoblastoma humano (SUP-T1) suplementadas com colesterol em níveis considerados hipercolesterolêmicos por 48h (CODINI et al., 2016). Esse trabalho demonstrou índices 1.68 e 1.63 vezes maiores de síntese de DNA e RNA respectivamente, nas células tratadas com colesterol.

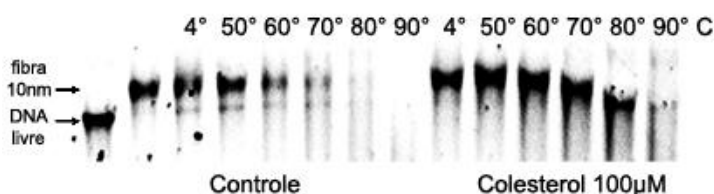
Além disso, os pesquisadores mostraram um aumento dos níveis de “Raf1” e “E-caderina”, moléculas envolvidas na migração e invasão de células do câncer. Houve também uma super expressão de genes de proteínas antioxidantes (SOD1, SOD2, CCS, GSR, GSS and CAT), as quais já haviam sido associadas a diversos tipos de cânceres. Demonstrou-se ainda a super expressão da enzima PNKP (*Polynucleotide*

*kinase/phosphatase*), envolvida no reparo de DNA, indicando uma possível proteção ao dano das células tratadas com colesterol (CODINI et al., 2016).

Ademais, sabe-se que o colesterol e a esfingomielina se acumulam em lesões ateroscleróticas, e o estresse oxidativo e mediadores inflamatórios podem alterar a acetilação de histonas. Portanto, sugeriu-se que o remodelamento da cromatina pode representar uma nova atividade aterosclerótica do colesterol (RAHMAN, 2003; ZAINA et al., 2005). Apesar disso, não foram encontradas publicações de estudos dessa natureza após esses anos.

Em face dos relatos apresentados, o grupo de pesquisa do prof. Guilherme Santos iniciou em 2011 diversos estudos para observar os efeitos do colesterol sobre as fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*.

Em 2013, este grupo conseguiu demonstrar que o colesterol auxilia na formação de fibras de cromatina de 10nm, antecipando o ponto de saturação de HO (octâmero de histonas) sobre o DNA (SILVA, 2013). Além disso, foi observado que fibras de 10nm em presença de colesterol, submetidas a testes de termoestabilidade, perdem gradualmente os nucleossomos, sem apresentar uma súbita precipitação, como ocorre no controle (Figura 7).



**Figura 7. Ensaio de termo estabilidade de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas *in vitro*.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Observa-se que as fibras incubadas com colesterol apresentam uma maior migração gradual conforme o aumento da temperatura, sugerindo a perda ordenada de nucleossomos. Enquanto no controle ocorre perda súbita e precipitação. Adaptado de (SILVA, 2013).

Este trabalho dá continuidade ao estudo iniciado em 2011, agregando novas análises sobre o efeito do colesterol sobre as fibras de cromatina de 10 e 30nm, reconstituídas *in vitro*.

## **2. Objetivos Específicos**

- Observar o efeito do colesterol na estabilidade e compactação das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*;
- Observar a ação do colesterol sobre mononucleossomos reconstituídos *in vitro*;
- Observar a ação do colesterol sobre a arquitetura da cromatina em células de mamífero.

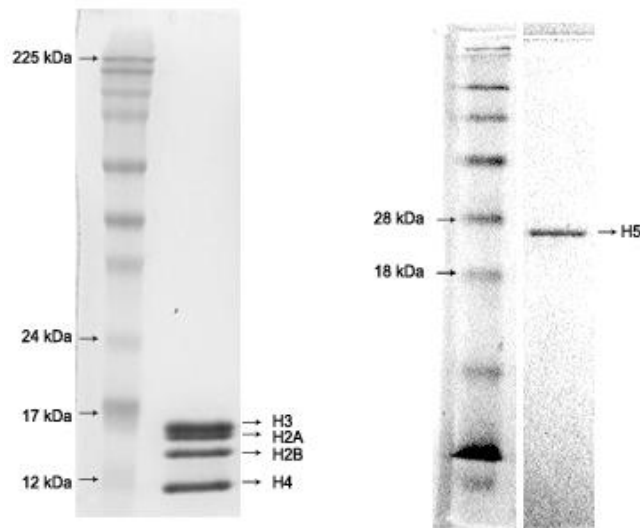


### 3. Materiais e Métodos

#### a) Histonas

As histonas foram extraídas de eritrócitos de galinha. Foram usadas histonas já extraídas e purificadas pelo prof. Guilherme Santos no Laboratório de Biologia Molecular do MRC (*Medical Research Council*), segundo protocolo descrito por Routh em 2009 (Routh, 2009).

As histonas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e estocadas em 50% de glicerol, agente crioprotetor, e em alta concentração de sal (3M NaCl), para manter a estabilidade das proteínas. A integridade dos estoques foi checada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (Figura 8).



**Figura 8. Integridade das histonas utilizadas.** SDS-PAGE 15% corado com solução de comassie blue.

#### b) Sequências de DNA

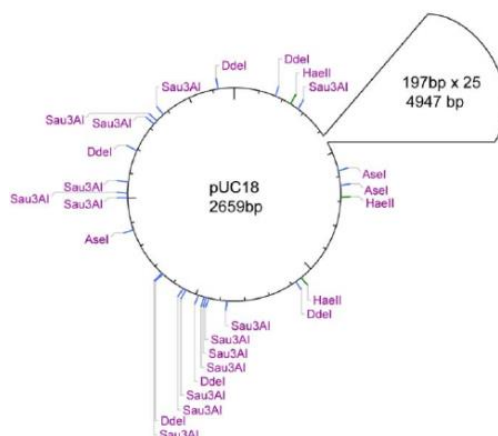
Foram utilizados arranjos de DNA para a formação de longas fibras de cromatina e mononucleossomos. O DNA utilizado é a sequência “601 Widom”, que possui 147pb. Este DNA, isolado em 1998 por Widom e Lowary, foi obtido através de um *pool* de moléculas sintéticas de DNA aleatórias (LOWARY; WIDOM, 1998). Desta forma, os autores identificaram a sequência de maior afinidade com o octâmero de histonas. Essa sequência de DNA permite obter uma correta estequiometria de HOs (octâmero de histonas) ligadas ao DNA. Os arranjos são sequências do “DNA 601”,

repetidas inúmeras vezes com diferentes comprimentos de *linker* DNA. Nesse trabalho utilizamos:

- 177.36 (147pb + 30pb *linker* DNA- repetidos 36 vezes)
- 167.80 (147pb + 20pb *linker* DNA- repetidos 80 vezes)

Esses arranjos foram cedidos pela pesquisadora Dra. Daniela Rhodes, de uma biblioteca de clones, do Laboratório de Biologia Molecular do MRC. Em resumo, o protocolo (HUYNH; ROBINSON; RHODES, 2005) utilizado para construção dos arranjos foi:

1. A sequência (601 DNA) foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de *primers* desenhados contendo sítios de restrição para EcoRI, EcoRV, XbaI e AvaI;
2. O “DNA 601” foi excisado com as enzimas de restrição EcoRI/XbaI e clonado em um vetor (pUC18);
3. Multimerização: os clones foram transformados e crescidos em DH5 $\alpha$  e *E.coli*, e posteriormente purificados e digeridos com a enzima AvaI. Os fragmentos de “DNA 601” foram unidos com a enzima T4 DNA ligase;
4. Os produtos foram fracionados por corrida eletroforética em gel nativo de agarose 1,2% e as bandas do gel de interesse (arranjos desejados) foram extraídas e purificadas;
5. Os arranjos foram então ligados em vetor pUC18 que possui resistência a ampicilina e regiões flanqueadoras com sítios para EcoRI/XbaI e EcoRV (Figura 9).



**Figura 9. Plasmídeo (pUC18) contendo o arranjo 197.25 e sítios de enzimas de restrição.** Adaptado de (ROUTH, 2009).

- Transformação e seleção bacteriana

Com os arranjos clonados, as células DH5 $\alpha$  foram transformadas com os plasmídeos por meio da técnica de choque térmico (Protocolo de Técnicas de Biologia Molecular do Laboratório de Farmacologia Molecular). Após esse procedimento foi feita a adição de 100 $\mu$ L de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e incubação a 37°C por 30 minutos, sob agitação constante, para replicação das bactérias. A seleção das bactérias transformadas (contém o gene de resistência a ampicilina) foi feita através do plaqueamento de 50 $\mu$ L do tubo da solução anterior em placa contendo meio LB sólido com 0,1mg/mL de ampicilina por 12 horas a 37°C.

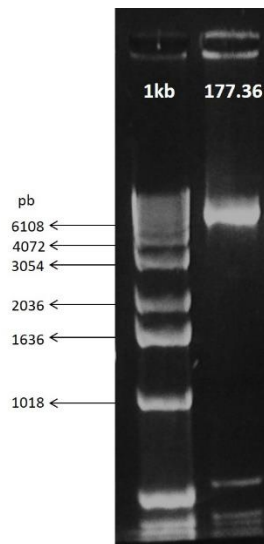
As colônias resistentes a ampicilina foram coletadas e crescidas em 5mL de meio de cultura LB contendo 60mg/mL de ampicilina (incubado a 37°C sob agitação constante). Passadas oito horas de crescimento bacteriano, transferiu-se o conteúdo para erlenmeyer contendo 1L de meio LB com ampicilina (mesma concentração usada anteriormente) e incubou-se novamente a 37°C sob agitação constante, por 12 horas.

- Extração e purificação do DNA

Após o crescimento foi feita a extração e purificação do DNA utilizando Max preparação de DNA plasmidial conforme protocolo adaptado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular.

- Digestão do DNA plasmidial
  - Sequências longas de DNA:

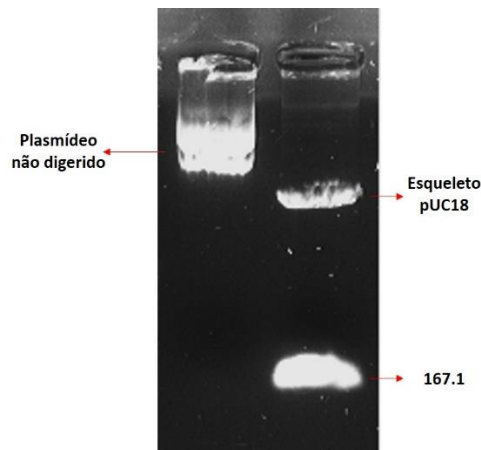
Depois da obtenção do DNA plasmidial puro, cada arranjo foi quantificado utilizando o NanoVue (GE Healthcare Life Sciences), e os fragmentos de DNA desejados foram excisados dos plasmídeos com o uso da enzima de restrição EcoRV (New England Biolabs) por 2h a 37°C. Posteriormente, o esqueleto do plasmídeo foi digerido com outras enzimas (DraI/HaeII/XbaI - New England Biolabs) por mais 2h a 37°C em fragmentos menores, para facilitar a separação dos longos fragmentos. Por eletroforese em gel nativo de agarose 1% foi possível visualizar as bandas e confirmar a digestão enzimática (Figura 10).



**Figura 10. Digestão do plasmídeo 177.36.**

- Sequências curtas de DNA:

Para obtenção das sequências curtas de DNA (167), o plasmídeo 167.80 foi digerido com a enzima *AvaI* (New England Biolabs) para liberação de 80 cópias de DNA 601 com 20pb de *linker* DNA por plasmídeo digerido (Figura 11). A reação foi feita a 37°C durante oito horas e o resultado foi comprovado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.



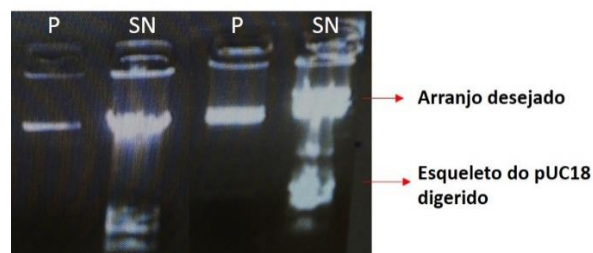
**Figura 11. Digestão do plasmídeo 167.80**

- Purificação dos arranjos de DNA

- Sequências longas de DNA:

A separação dos fragmentos longos desejados foi realizada utilizando 0,5-5% de PEG 6000 + 2,5M NaCl, que permite a precipitação apenas dos longos fragmentos de DNA. Foi feita incubação por 10 minutos no gelo após a adição do PEG 6000 + 2,5M NaCl e posterior precipitação por centrifugação a 4°C por 20 minutos com velocidade

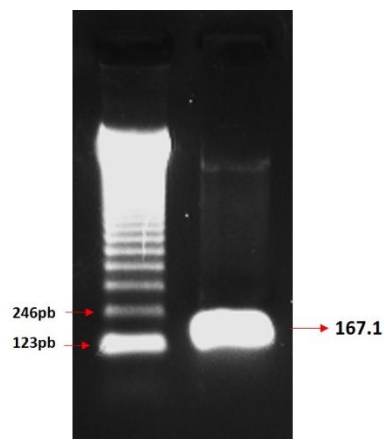
de 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado para outro tubo de centrifuga e o pellet ressuspendido em TE (Tris-HCl/EDTA). O pellet e o sobrenadante foram avaliados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. Na primeira rodada (adição de 5% de PEG) nenhum dos fragmentos precipitou. Assim, acrescentou-se 0,5% de PEG ao sobrenadante e repetiu-se o protocolo até atingir a concentração de PEG ideal para precipitar os longos fragmentos (Figura 12). Após a completa precipitação, juntaram-se todos os pellets, contendo os fragmentos desejados e foi feita purificação com fenol/clorofórmio, precipitação com etanol e a ressuspensão do DNA em TE.



**Figura 12. Exemplo de etapas de purificação dos longos fragmentos de DNA.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Legenda: P- pellet; S- sobrenadante.

- Sequências curtas de DNA:

Para purificação dos fragmentos curtos de DNA o procedimento foi o mesmo, no entanto a precipitação, nesse caso, foi do esqueleto do plasmídeo, enquanto os fragmentos desejados restaram no sobrenadante (Figura 13).



**Figura 13. DNA 167.1 purificado.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

- DNA competidor

O DNA competidor (crDNA) é uma sequência de 147pb aleatória, que utilizamos na reconstituição de cromatina *in vitro*, e que se liga ao HO com menor afinidade que a sequência 601. Assim, na reconstituição da cromatina, o crDNA previne

a supersaturação das fibras de cromatina reconstituídas com arranjos de DNA 601, “sequestrando” o excesso de histonas para formar o mononucleossomo. Isso garante que as fibras contenham quantidades estequiométricas de arranjo de DNA 601, HO e *linker* histona.

Essa sequência (147pb) foi amplificada por reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando *primers* desenhados para se anelar à seguinte região aleatória contida no vetor (pUC18):

5' ATTCATTAAT GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA  
AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT CACTCATTAG  
GCACCCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT  
TGTGAGC 3'

*Forward Primer:* 5'... ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG 3'

*Reverse Primer:* 5'...GCTCACAATTCCACACAACATACGCGCC 3'

Foi feita uma reação única, para amenizar eventuais erros, e dividida em torno de 60 reações de 50 µL cada, contendo: tampão PCR 1X (+KCl – Fermentas); 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25mM dNTPs (Fermentas); 51ng pUC18; 3µM *primers forward e reverse*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As reações foram realizadas simultaneamente com os seguintes ciclos programados no termociclador (BioRad – Thermal Cycler T100):

x65	{	5 minutos - 94°C	→ iniciação
		1 minuto - 95°C	→ desnaturação do DNA
		30 segundos - 52°C	→ anelamento dos <i>primers</i>
		30 segundos - 72°C	→ extensão
		1 minuto - 72°C	→ extensão final

O produto resultante foi analisado por gel nativo de agarose a 1% contendo brometo de etídeo e posteriormente quantificado no espectrofotômetro (Shimadzu UV1601).

### c) Colesterol

Foi utilizada uma solução aquosa de colesterol sintético 500X (SyntheChol™ NS0 Supplement – Sigma Aldrich). Este colesterol é patenteado pela Sigma, e apesar de nossos diversos pedidos, não nos foi fornecida a concentração exata. Assim, determinou-se a medida da concentração de colesterol total da solução por

método enzimático colorimétrico (ALLAIN et al., 1974), realizado no laboratório de bioquímica do HUB e no Laboratório Sabin, em três concentrações crescentes: 100X, 200X e 300X. Os resultados obtidos foram: 45mg/dL, 88mg/dL e 143mg/dL respectivamente. A solução estoque de 500X apresenta a concentração estimada de 225mg/dL. As concentrações utilizadas nesse trabalho variaram de 0,1X a 10X. Em molaridade, as concentrações predominantemente utilizadas nos ensaios foram de 1 $\mu$ M a 100 $\mu$ M. Além disso, também foi utilizado o colesterol em pó Sigma (C8667), diluído em etanol.

O colesterol fluorescente adquirido, TopFluor Cholesterol: 23-(dipyrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol - Avanti Number 810255, foi sintetizado pela empresa Avanti Polar Lipids. Diluiu-se o composto em etanol 100% para concentração de 500X, referente a 5,8mM e guardou-se em frasco protegido da luz a -20°C. O composto apresenta excitação em 495nm e emissão em 507nm.

#### **d) Reconstituição de fibras longas de cromatina e mononucleossomo**

- Fibra de cromatina de 10nm e mononucleossomos

A reconstituição de mononucleossomo e fibras de cromatina *in vitro* foi realizada conforme protocolo utilizado no laboratório da Dr. Daniela Rhodes (HUYNH; ROBINSON; RHODES, 2005).

A reconstituição de fibras de cromatina de 10nm se inicia com o preparo de uma solução master mix (MM), contendo arranjo de DNA 601 e crDNA na proporção de 1:0,5 ou 1:1. Em seguida, preparou-se as reações individuais em tubos de centrifuga siliconizados de (1,5mL), contendo o MM, o octâmero de histonas (HO) e tampão com alta concentração de sal (2M NaCl, 10mM TEA-HCl pH 7.4, 1mM EDTA) (Tabela 1). Na reconstituição feita com colesterol, o composto foi adicionado ao tampão de reação em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M). Todas as reações são feitas a 4°C.

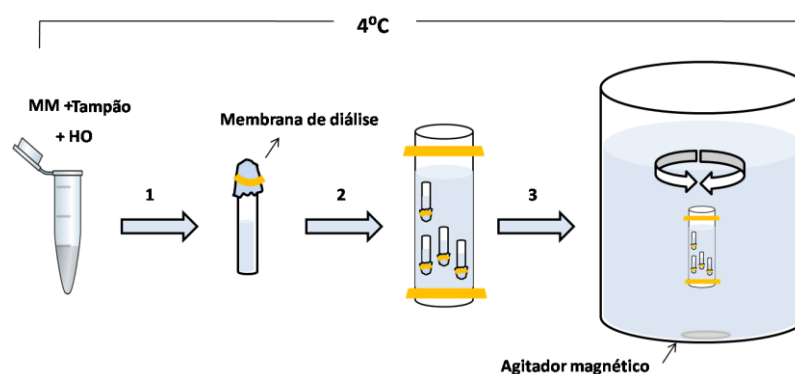
Para reconstituição dos mononucleossomos o procedimento é o mesmo, excetuando-se a adição do DNA competidor, que não é necessário.

**Tabela 1. Exemplo de titulação de octâmero de histonas para formação de fibras de cromatina.**

Amostra	Concentração (µg/µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	
MM (DNA:crDNA)	(1:0,5)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
HO	0,5	0	2	4	6	8	10	12	14	µL
Tampão de reação	-	78,5	76,5	74,5	72,5	70,5	68,5	66,5	64,5	

Cada reação foi transferida individualmente para pequenos tubos de vidro siliconados, que foram fechados com membrana de diálise com poros de 7 kDa (*Snake Skin Pleated Dialysis Tubing* – Thermo Sientific), para realização de uma diálise lenta.

Todos os pequenos tubos de vidros foram transferidos de cabeça para baixo, de forma que a solução ficasse em contato com a membrana, para um saco de diálise da mesma membrana anterior (*cut-off* de 7 kDa), contendo 30 mL de tampão em alta concentração de sal (2M NaCl, 10mM TEA-HCl pH7.4, 1,5mM EDTA). Este saco com os tubos foi posteriormente transferido para um béquer contendo um grande volume de tampão (4L) na ausência de sal (10mM TEA-HCl pH 7.4, 1,5mM EDTA) (Figura 14). Deixou-se dialisando sob agitação lenta a 4°C por 12-20hs. Após a diálise os pequenos tubos de vidro foram retirados do saco de diálise e analisados por eletroforese em gel nativo de agarose 0,8% e TBE 0,2X.

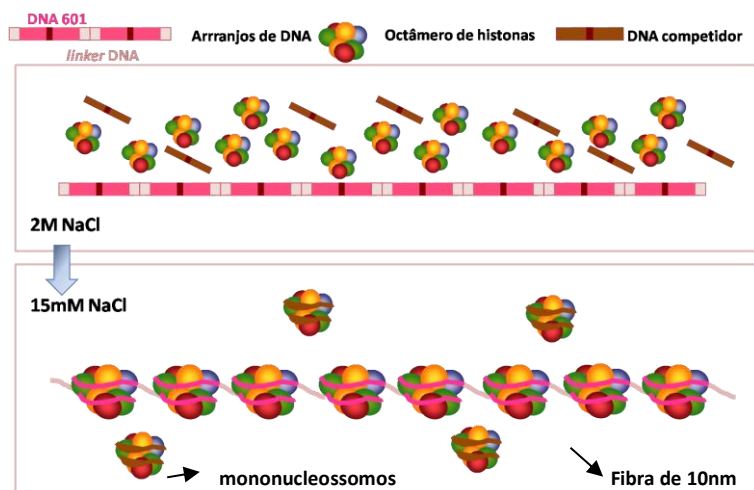


**Figura 14. Esquema ilustrativo das etapas realizadas na reconstituição in vitro de fibras de cromatina de 10nm.** Etapa 1: transferência das reações (contendo alta concentração de sal) para pequenos tubos de vidro siliconados fechados com membrana de diálise. Etapa 2: transferência dos tubos de vidro de cabeça para baixo para um saco de diálise em alta concentração de sal. Etapa 3: transferência do saco de diálise contendo os tubos de vidro para um béquer com tampão na ausência de sal. Diálise *overnight*, sob agitação lenta, a 4°C. (SILVA, 2013).

Os tubos de centrífuga e os de vidro, como dito, devem ser todos revestidos internamente com silicone, para evitar a perda de HO, que se adere facilmente a superfícies ásperas.



Os três “ambientes” de diálise e a agitação moderada são essenciais para que ocorra uma diálise lenta, o que promove a ligação do octâmero de histonas, de forma organizada e preferencial, aos sítios com forte posicionamento de nucleossomos ao DNA 601, além de impedir a ruptura do complexo conforme a concentração de sal diminui. Após a total diálise, o sistema encontra-se em equilíbrio, com todos os ambientes com a mesma concentração de sal (aproximadamente 15mM de NaCl) (Figura 15).



**Figura 15. Esquema ilustrativo da formação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída *in vitro*.** Após a diálise (15mM de NaCl) são formadas as fibras de 10nm e os mononucleossomos (SILVA, 2013).

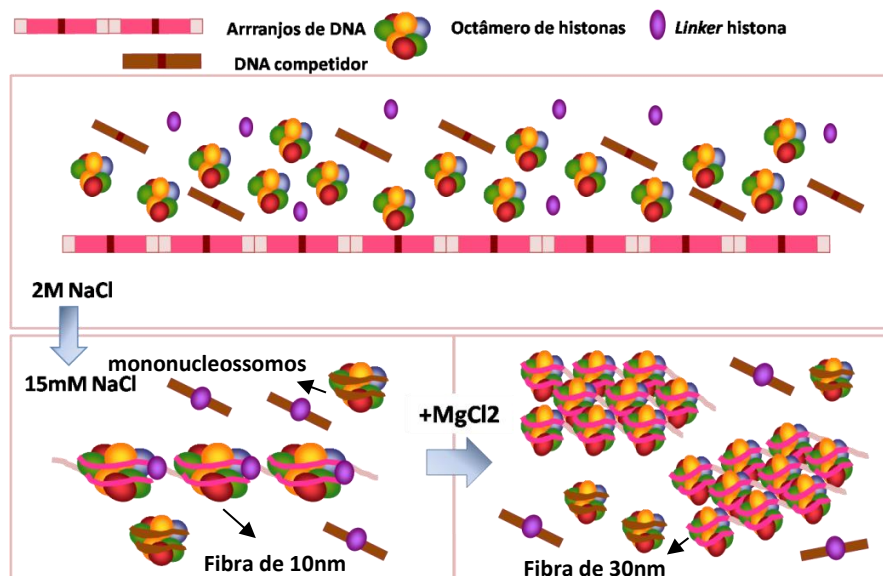
As amostras foram analisadas por eletroforese em gel nativo de agarose 0,8% para fibras de 10nm e acrilamida 6% para mononucleossomos. A corrida eletroforética deve ser realizada de 15-20 mA e máximo de 100v para que não ocorra o aquecimento do gel e as fibras de cromatina não se desfaçam. Além disso, o gel deve ser corado por 15 minutos com solução contendo brometo de etídio, devido à facilitação da ligação do brometo ao DNA que está mais inacessível. Foram carregados 8 µL de cada reconstituição com 2µL de tampão de amostra (20% glicerol, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1% *bromophenol blue*).

- Fibra de cromatina de 30nm

Para formação da fibra de 30nm, adicionamos a *linker* histona H5, extraída de eritrócitos de galinhas, à fibra de 10nm. Assim, após a determinação do ponto ideal para a formação da fibra de 10nm, faz-se necessário a titulação de H5, utilizando uma quantidade de HO fixa para todas as reações individuais (Tabela 2).

Amostra	Concentração (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	
Mix (DNA:crDNA)	(1:0,5)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
HO	0,5	10	10	10	10	10	10	μL
H5	0,1	0	1	1,5	2	2,5	3	
Tampão de reação	-	68,5	67,5	67	66,5	66	65,5	

A metodologia para reconstituição da fibra de 30nm é a mesma utilizada para formação da fibra de 10nm, que se baseia na diálise lenta de sal. Contudo, para a fibra de 30nm, após a primeira diálise (12-20h) os tubos foram transferidos para um segundo recipiente com 2L de tampão contendo 10mM TEA-HCl pH 7.4 e 1mM MgCl<sub>2</sub>, promovendo mais uma diálise de 12-20hs, também sob lenta agitação (sem o saco de diálise). Esse tampão é necessário, pois além da *linker* histona, são necessários cátions mono ou divalentes para a formação da fibra compactada (Figura 16).



**Figura 16.** Esquema ilustrativo da formação da fibra de 30nm. Necessidade de uma segunda diálise com tampão contendo MgCl<sub>2</sub> para compactação das fibras.

A eletroforese foi realizada nos mesmos padrões descritos anteriormente. Contudo, antes de carregar as amostras no gel é necessário fazer uma fixação de *cross-link* com glutaraldeído, reforçando a ligação da H5 à cromatina resistindo a migração eletroforética. As amostras foram incubadas vinte minutos no gelo com 0,1% de concentração final de glutaraldeído e o processo foi interrompido quando se adiciona o *loading buffer* contendo Tris-HCl (20% glicerol, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0,1% *bromophenol blue*) para corrida no gel, pois o Tris contido no tampão para a reação.

**e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio**

As fibras de cromatina de 10nm previamente reconstituídas *in vitro* (50nM) foram incubadas com veículo ou colesterol (0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M) por 30 minutos no gelo. Após essa incubação foram adicionadas diferentes concentrações de magnésio (3; 4,5; e 6 mM) por 15 minutos no gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet foi separado do sobrenadante e ressuspenso em água com o mesmo volume anterior. Para avaliação do resultado, o pellet e o sobrenadante foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

A análise de densitometria das bandas no gel foi realizada no programa ImageJ 1.49v.

**f) Digestão enzimática de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas *in vitro* com MNase (Micrococcal Nuclease)**

As fibras de cromatina de 10nm foram reconstituídas *in vitro* na presença e ausência de colesterol conforme descrito anteriormente. Após análise dos melhores pontos em que as fibras estavam formadas, incubou-se as amostras (fibras reconstituídas com e sem colesterol) com MNase (0,08unidades) a 37°C. Retirou-se alíquotas (12 $\mu$ L) das amostras com diferentes tempos de digestão: 0, 1, 2, 4 e 8 minutos, parando a reação com 10mM de EDTA.

A análise do resultado foi feita através da visualização das bandas em gel de agarose 1% submetido a eletroforese com tampão TBE 0,2X (Tris-Borato-EDTA) corado com brometo de etídeo.

**g) Ensaio de ligação de colesterol fluorescente a fibras de cromatina de 10nm**

Para avaliar a ligação do colesterol às fibras de cromatina utilizou-se o colesterol fluorescente TopFluor (descrito anteriormente).

Primeiramente as fibras de 10nm foram reconstituídas *in vitro* e avaliadas no gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo. Após a escolha do melhor ponto de formação, incubou-se as fibras (50nM) com colesterol marcado 1 $\mu$ M por 12 horas em temperatura ambiente e protegido da luz.

Passadas as 12h de incubação, as fibras foram novamente dialisadas em tampão final da reconstituição (10mM Tris-HCl pH 7.4; 1,5mM EDTA, 15mM NaCl) em temperatura ambiente por três horas, para retirar o excesso de colesterol. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado no Typhoon 9200, utilizando o laser de 532nm, com os filtros de 610nm para visualização do brometo etídeo e 526nm, para visualização do colesterol marcado,

#### **h) Visualização das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro* por microscopia eletrônica**

Fibra de cromatina de 10 e 30nm reconstituídas *in vitro* foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão por contraste negativo com acetato de uranila 1,5% da seguinte maneira: uma gota de oito  $\mu$ L de amostra permaneceu por três minutos em contato com a grade de carbono e o excesso foi removido com papel de filtro. Foi então adicionado acetato de uranila em três etapas de 30 segundos cada, removendo-se o excesso com papel de filtro após cada etapa.

Inicialmente, as grades de carbono foram submetidas a uma descarga elétrica de alta voltagem utilizando o sistema easiGlow (PELCO), para que sua superfície se tornasse hidrofílica, permitindo um melhor espalhamento da amostra. Para as fibras de 30nm foi feita a fixação com glutaraldeído, descrita anteriormente, antes de aplicar o acetato de uranila.

A visualização foi feita no microscópio eletrônico de transmissão JEM 3010 no LNNano do CNPEM- Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em Campinas.

A quantificação das espécies encontradas na amostra foi feita manualmente através da média da contagem (3x) de 50 imagens obtidas de diferentes campos da grade.

#### **i) Visualização de núcleo de células tratados com colesterol**

Células Hela foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco- contendo 10% de soro bovino fetal e antibióticos Penicilina – 100U/mL Estreptomcina - 100 $\mu$ g/mL) e mantidas em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingiram 90% de confluência.

As células foram então coletadas e o núcleo foi extraído conforme descrito por Gaffney e colaboradores (GAFFNEY et al., 2012). Brevemente, o pellet de células foi ressuspenso em tampão de lise (10 mM Tris [pH 7.4], 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espermidina) e incubado no gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000rpm e lavada em tampão de lavagem (10 mM Tris [pH 7.4], 15 mM NaCl, 60mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espermidina). Após uma nova centrifugação o núcleo das células (48x10<sup>6</sup>) foi ressuspenso em 4mL de tampão (10 mM Tris [pH 7.4], 15 mM NaCl, 60mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espermidina, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) e dividido em quatro grupos: controle e incubados com concentrações crescentes de colesterol (1, 10 e 100µM) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os núcleos tratados foram então preparados para a microscopia eletrônica conforme descrito por Nunes e colaboradores com pequenas adaptações (NUNES et al., 2013). Em resumo, os núcleos foram fixados em tampão Karnovsky (2% Glutaraldeído + 2% Paraformaldeído + 3% sacarose + 5 mM CaCl<sub>2</sub> em 0.1 M de tampão cacodilato de sódio pH 7.2) *overnight* a 4°C. A seguir os núcleos foram centrifugados e lavados duas vezes com 0.1 M de tampão cacodilato de sódio. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferrocianeto de potássio (10 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> em 0.2 mol L<sup>-1</sup> de cacodilato de sódio). O material foi lavado com água destilada e corado por 12h com acetato de uranila 0,5% a 4°C *overnight*. As amostras foram então desidratadas em gradiente de acetona (50-100%) por 10min cada etapa e emblocado em resina Spurr's. Cortes ultrafinos foram realizados e observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1011) operado a 80kV, localizado no Instituto de Biologia da UnB.

Análises morfométricas das imagens, como área total e área de heterocromatina por exemplo, foram realizadas pela empresa Pix Image Techonoly. Foram analisadas 19 imagens do grupo controle e grupo tratado com colesterol 100µM.

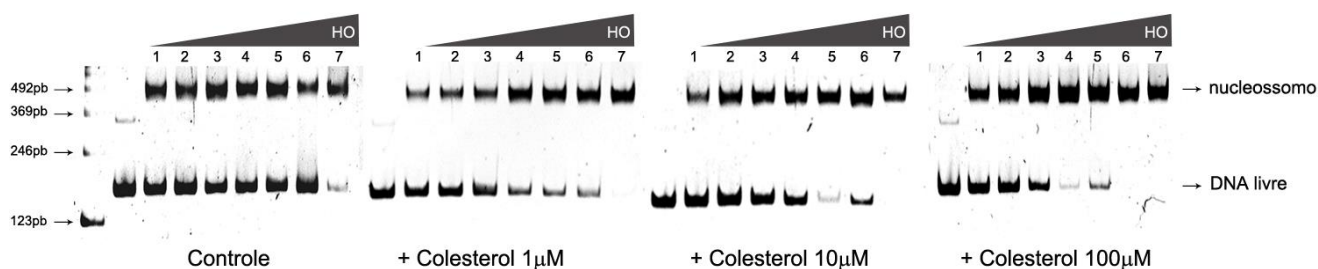
## 4. Resultados

### a) Colesterol auxilia na formação de mononucleossomos reconstituídos *in vitro*

Com o intuito de observar o efeito do colesterol sobre a formação de mononucleossomos, utilizamos o DNA 601, de 167pb, e HO de eritrócitos de galinha para a reconstituição *in vitro*, na ausência e presença de diferentes concentrações de colesterol.

Como observarmos na Figura 17, o colesterol causou a antecipação do ponto de saturação para formação do mononucleossomo, por essa razão precisou-se de menos HO para formação do complexo.

Notou-se que, mesmo na menor concentração de colesterol (1 $\mu$ M), este efeito foi observado, indicado pelo aumento da intensidade da banda correspondente ao mononucleossomo e pela diminuição da banda do DNA livre. Além disso, observou-se o efeito mais pronunciado com a maior concentração utilizada (100 $\mu$ M) (Figura 17).

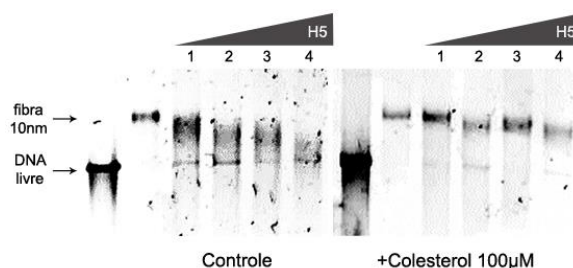


**Figura 17. Efeito dose-resposta do colesterol sobre o mononucleossomo.** DNA: 167.1. Gel de acrilamida 6% corado com brometo de etídeo. Gel representativo de seis experimentos realizados de forma independente, demonstrando a antecipação da formação do mononucleossomo em presença de colesterol em uma concentração mínima de 1 $\mu$ M, evidenciada pela diminuição da intensidade da banda de DNA livre a partir da raia 5 comparado ao controle. O efeito mais pronunciado do colesterol para formação do mononucleossomo se deu em uma concentração de 100 $\mu$ M (observar a diminuição do DNA livre a partir da raia 4). Legenda: 1= 1.3; 2= 1.5; 3= 1.8; 4= 2.0; 5= 2.2; 6= 2.5; 7= 2.7 $\mu$ M de HO.

### b) Colesterol auxilia na formação de fibras de 30nm

No trabalho apresentado em 2013 (SILVA, 2013), observou-se que o colesterol também promove a antecipação do ponto de saturação de diferentes arranjos de DNA com HO para a formação da fibra de 10nm reconstituídas *in vitro*. Aqui, avaliamos o efeito do colesterol sobre a formação das fibras de 30nm. Para isto, reconstituímos essa fibra *in vitro* em presença ou ausência de colesterol.

Os géis, apresentados na Figura 18, mostram que o colesterol também auxilia na formação da fibra compactada, apresentando uma melhora significativa na intensidade e formato das bandas.

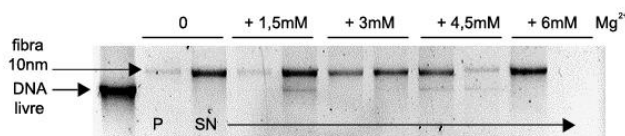


**Figura 18. Formação da fibra de cromatina compactada em presença de colesterol.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Gel representativo de três experimentos realizados de forma independente. Legenda: 1= 1.5; 2= 3.1; 3= 4.6; 4= 6.2µM de H5.

### c) Colesterol auxilia na compactação de fibras de 10nm induzida por magnésio

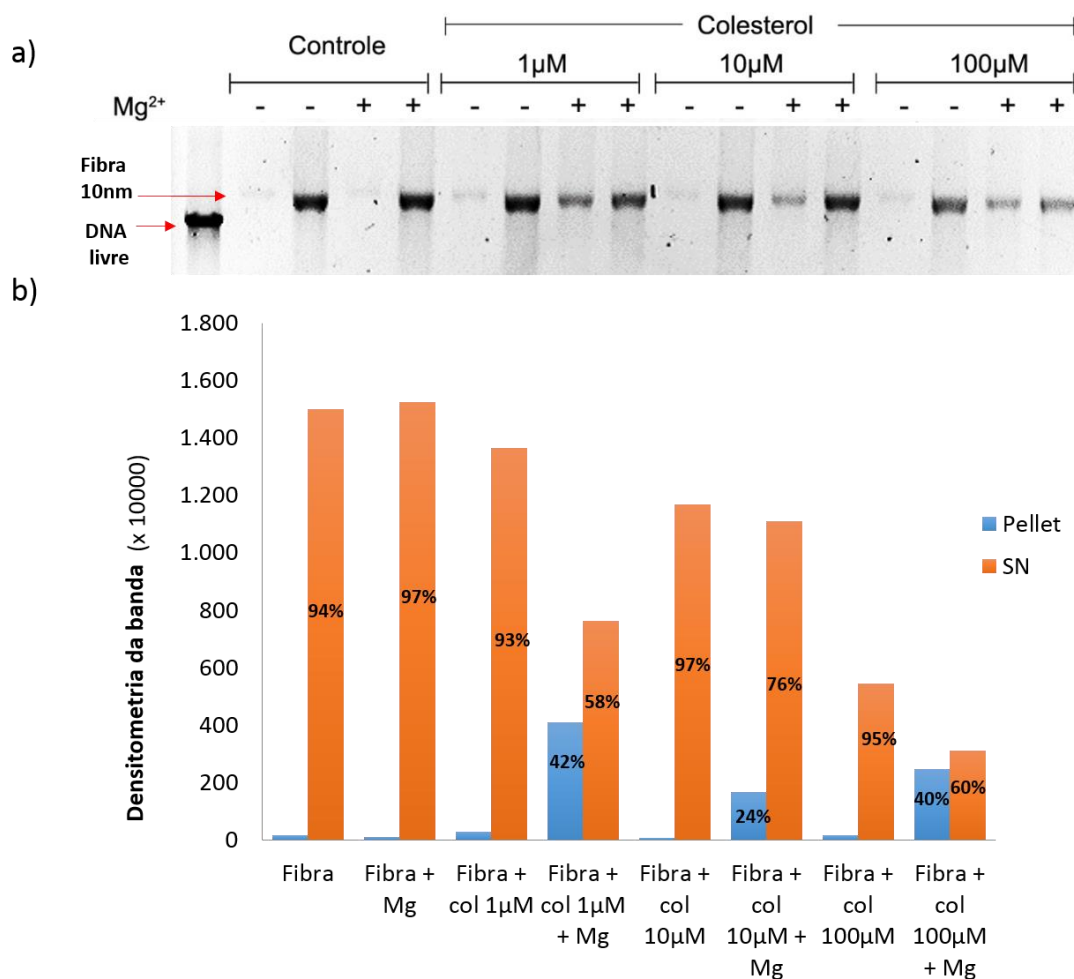
O efeito do colesterol em promover a compactação das fibras de cromatina foi também avaliado utilizando-se as fibras de 10nm para obtenção da fibra de 30nm. Para isso, realizamos o ensaio com íons de magnésio, fator conhecido por auxiliar na compactação da cromatina, devido a neutralização da carga do DNA e facilitação da atração entre nucleossomos adjacentes. Para isto, as fibras de 10nm, em presença ou ausência de colesterol, foram incubadas com magnésio e centrifugadas conforme descrito no “Material e Métodos – seção e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio” (Página 43). Ressaltamos que as fibras compactadas ficam no pellet (P) e as relaxadas no sobrenadante (SN).

Primeiramente, determinamos a concentração ideal de  $Mg^{2+}$  para obtenção da fibra compactada. Conforme observamos no gel da Figura 19, metade das fibras da amostra estavam compactadas (banda do pellet – P) com 3mM de magnésio. Portanto, essa concentração foi escolhida para avaliar o efeito do colesterol.



**Figura 19. Efeito dose-resposta de magnésio sobre a compactação de fibras de cromatina de 10nm.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Legenda: P= pellet; SN= sobrenadante. Observamos a intensidade da banda do pellet e sobrenadante bem semelhante com 3mM de magnésio. Com o aumento gradual da concentração de  $Mg^{2+}$ , a intensidade da banda do sobrenadante diminui concomitante ao aumento da banda do pellet. Em concentração de 6mM de  $Mg^{2+}$ , observamos que toda fibra de cromatina aparece somente no pellet.

Após determinar a concentração de  $Mg^{2+}$  a ser utilizada, as fibras de 10nm foram incubadas com colesterol e posteriormente com magnésio, conforme descrito no “Materiais e Métodos - seção: e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio” (página 43). Foi observado que o colesterol, já em menor concentração ( $1\mu M$ ) aumentou a quantidade de fibras compactadas presentes no pellet (Figura 20a). A análise da densitometria das bandas revelou que 42% das fibras apresentavam-se na forma compactada, na presença de  $1\mu M$  de colesterol (Figura 20b).

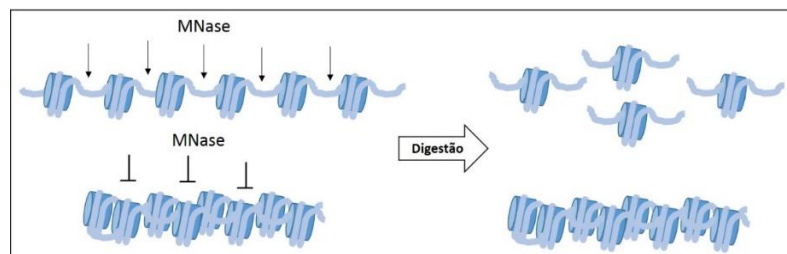


**Figura 20. Efeito do colesterol sobre a compactação das fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Legenda: P= pellet; SN= sobrenadante; col = colesterol. Gel representativo de dois experimentos realizados de forma independente. a) Com a presença de colesterol observou-se o aumento da intensidade da banda do pellet e a diminuição do sobrenadante em todas as concentrações em relação ao controle (sem magnésio); b) Densitometria das bandas no gel acima. Observamos no gráfico o aumento das bandas do pellet (fibras compactadas –azul) em presença do colesterol mesmo em menor concentração ( $1\mu M$ ).



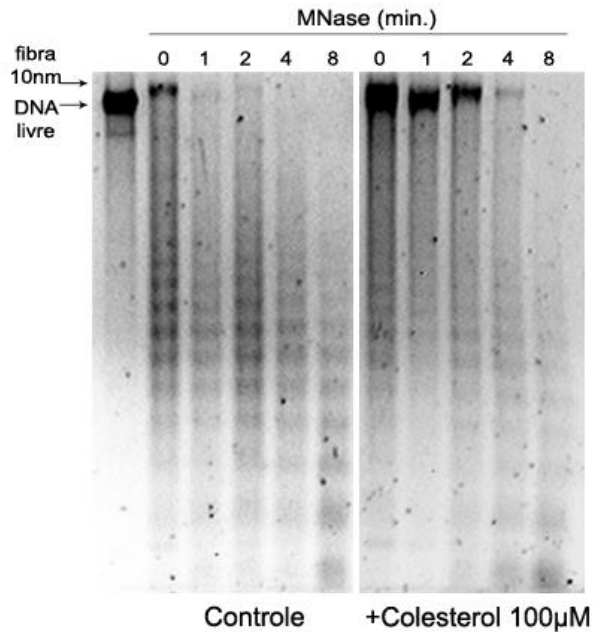
**d) Colesterol protege as fibras de cromatina de 10nm de digestão enzimática com MNase**

Para também analisar o estado da estrutura da fibra de 10nm, realizamos o ensaio de digestão enzimática com a enzima Nuclease Microcócica (MNase, do Inglês Micrococcal Nuclease). Essa enzima digere regiões internucleossomais, *linker* DNA. Portanto, um padrão diferente de cortes significa impedir o acesso da enzima a essas regiões. No modelo *in vitro* que utilizamos, as condições são controladas, constituindo-se somente de histonas e DNA. Assim, as reações não apresentam outras proteínas, tais como fatores de transcrição, os quais poderiam ocupar sítios internucleossomais e bloquear a ação da enzima MNase. Esse ensaio pode sugerir uma maior compactação quando não ocorre a digestão no *linker* DNA (Figura 21).



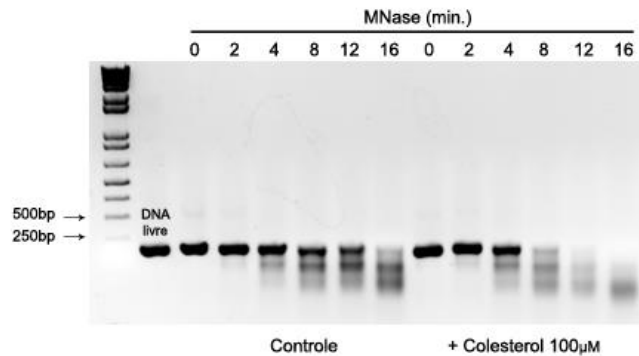
**Figura 21. Esquema ilustrativo do acesso a digestão com a enzima MNase.**

Na Figura 22 fica claro que o padrão de bandas resultantes da digestão das fibras reconstituídas na presença de colesterol é muito diferente. Observa-se a presença de grande quantidade de fibra não digerida nos tempos zero, um e dois minutos comparado com o controle. Sugere-se, portanto, que o colesterol protegeu a fibra dos cortes enzimáticos (Figura 22).



**Figura 22. Ensaio de MNase de fibras de cromatina de 10nm na ausência e presença de colesterol.** Arranjo: 177.36. Géis de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Gel representativo de dois experimentos realizados de forma independente. Observamos a presença de grande quantidade de fibra não digerida nos tempos 0, 1 e 2 minutos comparado com o controle.

A Figura 23 apresenta o gel da digestão enzimática de DNA livre, incubado com colesterol, demonstrando que a ação da enzima não é prejudicada pela presença do colesterol.



**Figura 23. Digestão com MNase de DNA livre na presença e ausência de colesterol.**

#### e) **Colesterol se liga às fibras de cromatina reconstituídas *in vitro***

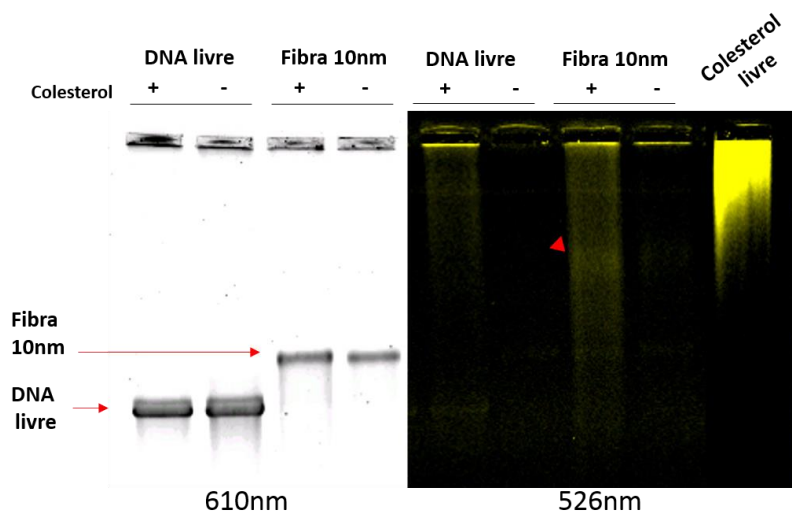
Para confirmar se os efeitos observados anteriormente sobre as fibras de cromatina foram devidos à ligação direta do colesterol ao mononucleossomo e às fibras de cromatina, realizamos novos ensaios com o colesterol fluorescente TopFluor. As

fibras foram incubadas com concentrações crescentes de colesterol marcado por 12 horas e dialisadas por mais três horas para retirar o excesso de colesterol.

Observamos uma grande precipitação de colesterol e fibras em concentrações acima de 10 $\mu$ M. Assim, os resultados apresentados aqui são somente com a concentração de 1 $\mu$ M.

Na Figura 24 apresentamos o gel visualizado no comprimento de onda relativo ao brometo de etídeo (610nm) à esquerda e a fluorescência do colesterol (526nm) à direita. Observamos a formação de uma segunda banda, indicado pela seta vermelha, com menor migração do que a banda relativa à fibra de 10nm, visualizada pelo brometo de etídeo.

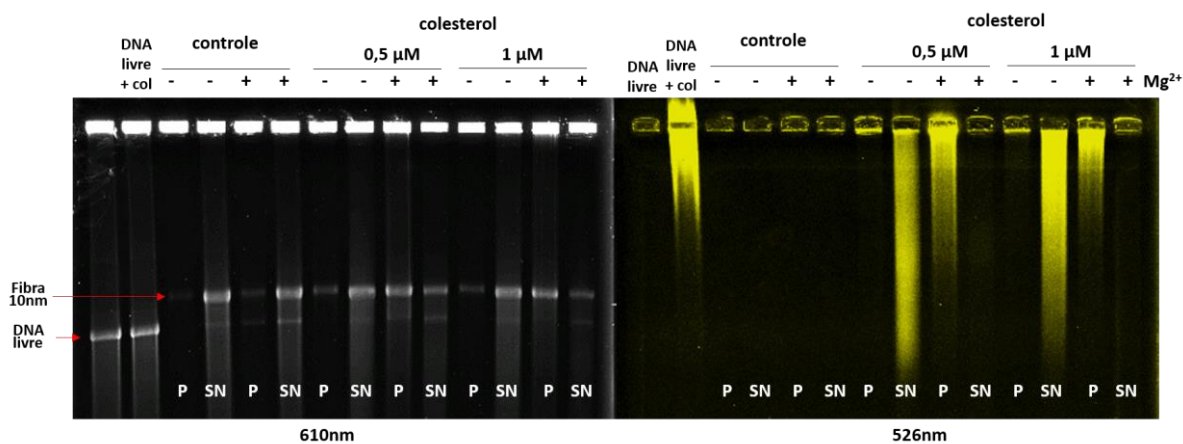
Essa banda é visualizada somente com o comprimento de onda relativo à fluorescência do colesterol (526nm), indicando que esta banda é referente ao colesterol associado às fibras. Entretanto, não observamos a presença de fibras nesta mesma altura quando visualizado para o comprimento de onda do brometo de etídeo. Além disto, as bandas referentes as fibras de 10nm não apresentaram fluorescência correspondente ao colesterol marcado.



**Figura 24. Ensaio de ligação do colesterol marcado com as fibras de cromatina de 10nm.** Arranjo 177.36. Sinais de (-) e (+) indicam a ausência ou presença de incubação com colesterol marcado. Gel visualizado no Typhoon com o filtro de 610nm à esquerda, para visualização do brometo de etídeo, e o de 526nm, para visualização do colesterol, à direita.

Realizamos também o ensaio de compactação induzido por magnésio na presença de colesterol marcado. Podemos verificar, na Figura 25, que a medida que adicionamos o magnésio à reação observamos o rastro de fluorescência relativo ao

colesterol nas raias correspondes ao Pellet, confirmando que o colesterol se liga às fibras de cromatina e auxilia na compactação.

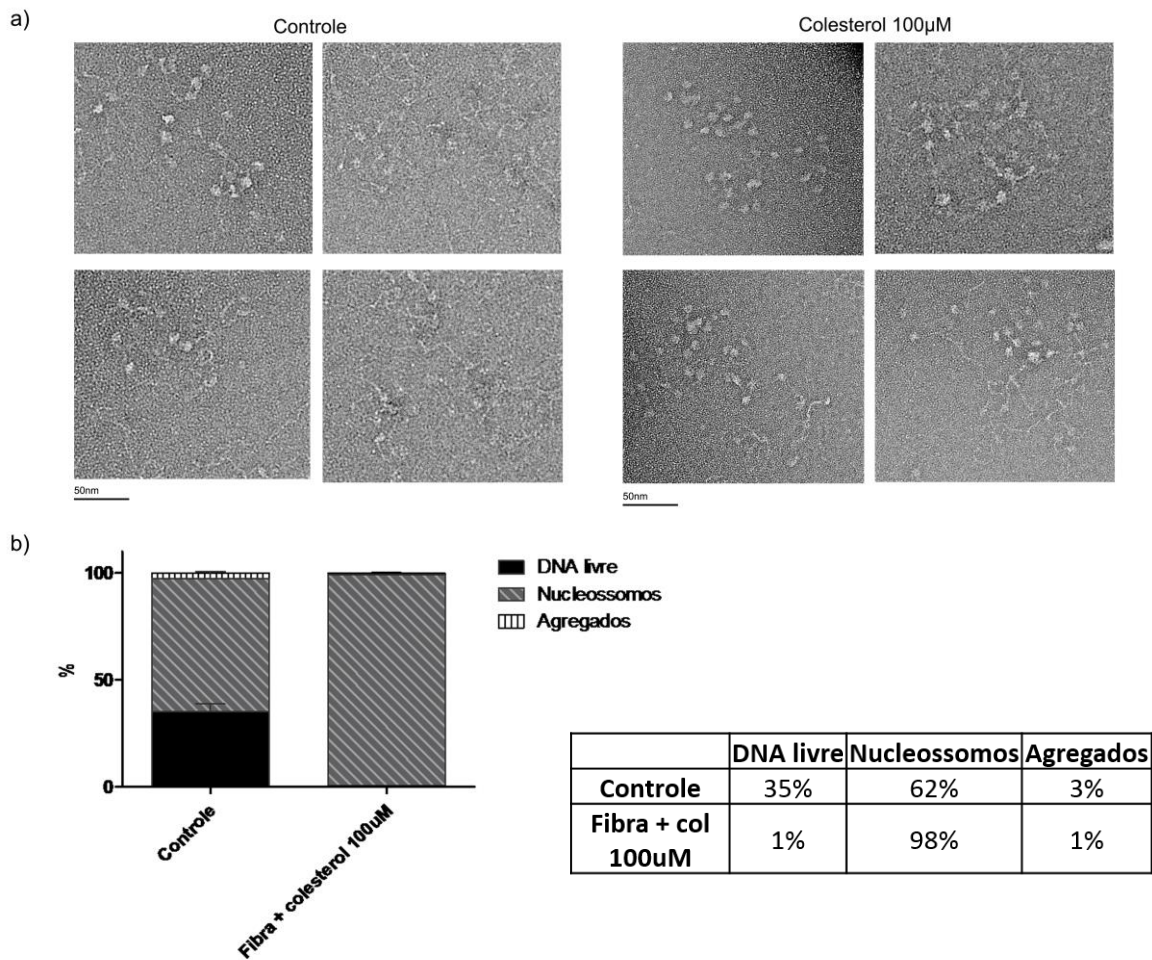


**Figura 25. Ligação do colesterol às fibras de cromatina de 10nm e indução de compactação por magnésio.** Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Gel visualizado no Typhoon com o filtro de 610nm à esquerda, para visualização do brometo de etídeo, e de 526nm, para visualização do colesterol à direita. Legenda: P= pellet; SN= sobrenadante. Observamos o rastro de fluorescência do colesterol se deslocando para o Pellet na presença do magnésio, confirmando sua ligação às fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*.

#### f) Microscopia Eletrônica (ME) das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*: colesterol auxilia a formação das fibras de 10 e 30nm

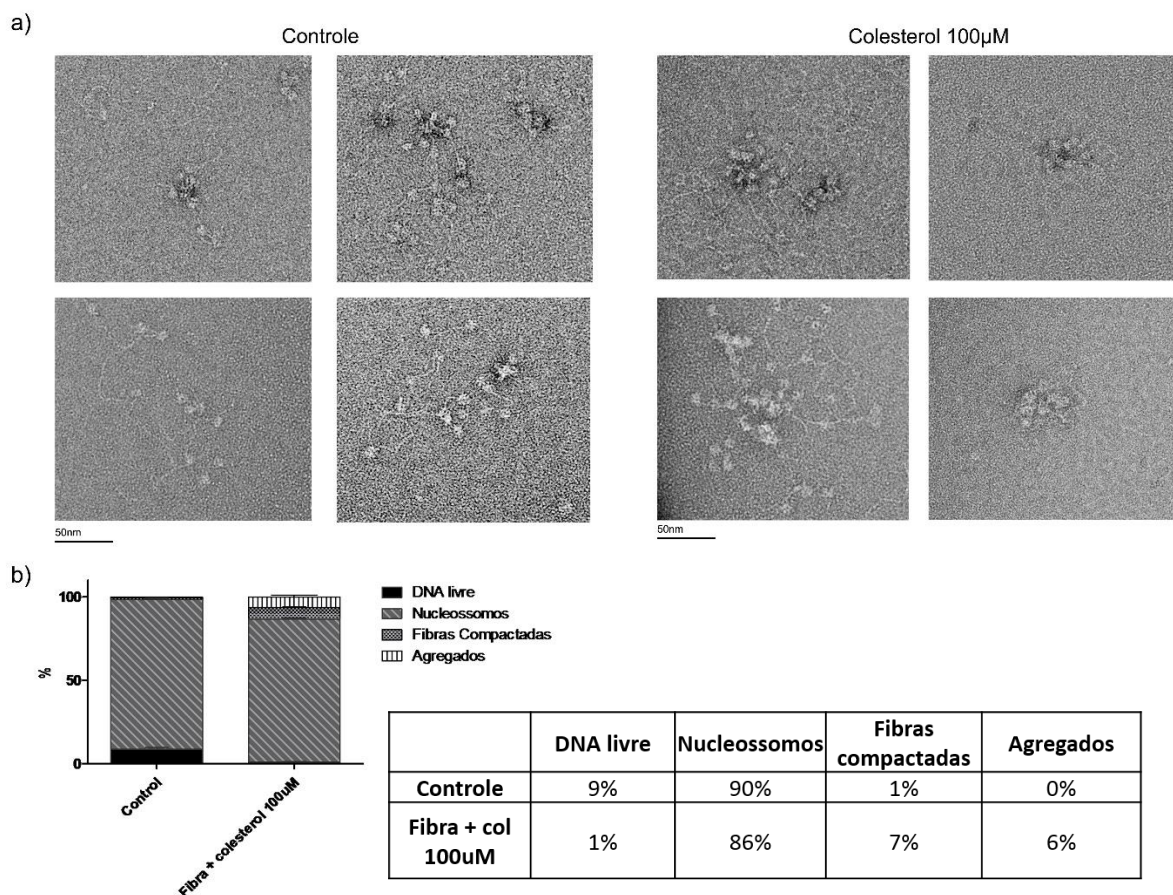
Para observar o efeito do colesterol sobre o estado das fibras de cromatina em baixa resolução, utilizamos a Microscopia Eletrônica de transmissão com contraste negativo, conforme “Materiais e Métodos – seção h) Visualização das fibras de cromatina reconstituídas *in vitro* por microscopia eletrônica” (Página 44).

Nesse caso, notamos a presença de grande quantidade de DNA livre na amostra de fibras controles (ausência de colesterol), conforme Figura 26a. Na presença do colesterol observamos menor quantidade de DNA livre presente na amostra (Figura 26b).



**Figura 26. Fibras visualizadas por contraste negativo com acetato de uranila 1,5%.** a) Imagens representativas das fibra de cromatina de 10nm reconstituídas na ausência de colesterol (controle) à esquerda e à direita imagens representativas das fibra de cromatina de 10nm reconstituídas na presença de 100µM de colesterol; b) quantificação dos materiais presentes na amostra.

As imagens apresentadas na Figura 27a, mostram as fibras compactadas. Observamos, de forma geral, maior concentração de fibras compactas nas amostras em presença de colesterol (Figura 27b), demonstrando que essa molécula auxilia no processo de compactação.

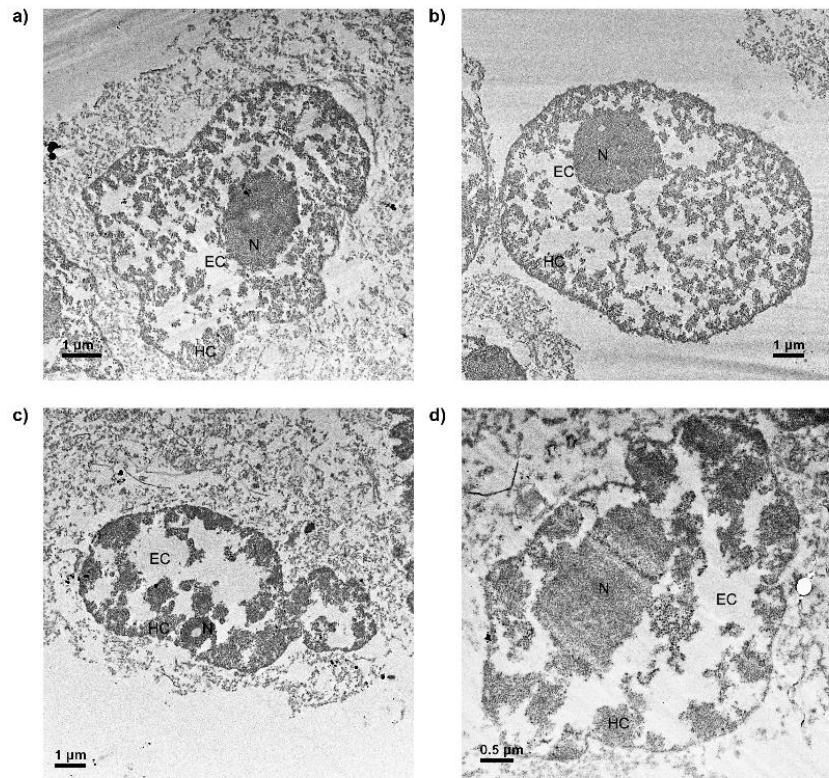


**Figura 27. ME de fibras de cromatina de 30nm reconstituídas *in vitro*.** Fibras visualizadas por contraste negativo com acetato de uranila 1,5%. a) Quadro representativo de imagens obtidas de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas na ausência de colesterol (Controle) à esquerda e à direita na presença de colesterol 100µM; b) quantificação dos materiais presentes na amostra.

### g) Colesterol não altera a morfologia do núcleo de células HeLa

Para observar o efeito do colesterol em células de mamífero, núcleo de células HeLa foram tratados com colesterol e visualizados por microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção i) Visualização de núcleo de células tratadas com colesterol” (Página 44).

A Figura 28 demonstra imagens representativas de resultados do núcleo das células com concentrações crescentes de colesterol. Análises de morfometria dos núcleos foram realizadas entre o controle e o grupo tratado com 100µM de colesterol e nenhuma diferença estatística ( $p < 0.05$ ) foi encontrada.



**Figura 28. Núcleo de células Hela tratados com veículo e diferentes concentrações de colesterol.** a) controle: núcleo tratado com veículo; b) núcleo tratado com 1 μM de colesterol; c) núcleo tratado com 10 μM de colesterol, d) núcleo tratado com 100 μM de colesterol. N: núcleo; EC: eucromatina; HC: heterocromatina.

## 5. Discussão e conclusão

O estudo da estrutura da cromatina é essencial para entender os processos fundamentais da biologia molecular. No entanto, não somente a estrutura da cromatina é alvo de muitos estudos, mas a dinâmica de sua regulação, também. A cromatina e sua unidade básica, o nucleossomo, têm sido produzidos *in vitro* por alguns laboratórios no mundo.

Esta estratégia tem o intuito de estudar a dinâmica da arquitetura da cromatina sem a interferência de agentes externos, como as moléculas ligantes de nucleossomo (NBMs). Esse tipo de estudo auxilia os pesquisadores a identificar fenômenos *in vitro* que possam ocorrer no nível celular, contribuindo para o entendimento dos mecanismos determinantes da regulação da expressão gênica e da manutenção do genoma.

Neste trabalho, utilizamos um modelo artificial de reconstituição da cromatina *in vitro*, o que nos permitiu manter todas as condições controladas e alterá-las conforme o objetivo almejado. O DNA utilizado foi a sequência 601 Widom, pela qual o octâmero de histonas possui forte afinidade (LOWARY; WIDOM, 1998). Essa sequência é utilizada por muitos pesquisadores para responder inúmeras perguntas e obter a estrutura atômica de nucleossomos em alta resolução, como a estrutura do complexo NCP:RCC1 e o tetranucleossomo, por exemplo (MAKDE et al., 2010; SONG et al., 2014).

A grande vantagem de se trabalhar com essa sequência é o fato de ela permitir a correta estequiometria de DNA e de octâmero de histonas que possibilita a formação das fibras *in vitro*. Além disso, utilizamos histonas extraídas de eritrócito de galinha, por serem, principalmente, uma fonte abundante de material, por possuírem sequência de resíduos de aminoácidos muito similar à humana e modificações pós-traducionais naturais.

A metodologia de reconstituição *in vitro* de fibras de cromatina foi bem estabelecida pelo grupo do Professor Guilherme Santos nos anos anteriores, conforme verifica-se no trabalho de Silva (2013). Neste trabalho, estendemos o êxito também para a reconstituição de mononucleossomos, os quais serviram de base para muitos de nossos resultados apresentados nesse documento.



Muitas substâncias orgânicas e inorgânicas interagem com os nucleossomos para definir os processos de montagem e dobramento da cromatina. O colesterol, um lipídio celular abundante, está entre as moléculas que interagem com a cromatina eucariótica *in vivo*. Contudo, muito pouco se sabe sobre o mecanismo e papel biológico das interações do colesterol com a cromatina. Além disso, o colesterol possui grande relevância clínica por estar associado a diversas doenças.

Resultados prévios (SILVA, 2013) sugeriram que o colesterol auxilia na formação das fibras de cromatina de 10nm. Neste trabalho, observamos efeito similar do colesterol sobre o mononucleossomo e fibras de 30nm reconstituídas *in vitro*.

De modo interessante, o colesterol auxiliou na formação das fibras de 30nm. Observamos na Figura 18 bandas mais homogêneas e intensas na presença do colesterol, sugerindo que este auxilia na compactação das fibras reconstituídas *in vitro*.

O ensaio de precipitação com magnésio, concomitantemente ao da digestão enzimática com MNase, sugerem que o colesterol auxilia também no dobramento das fibras de 10nm, facilitando as interações internucleossomais. Seria interessante determinar os graus de compactação das fibras utilizando a ultracentrifugação analítica. Contudo, devido a limitações técnicas, não foi possível realizar esse ensaio.

Em colaboração com o Professor Werner Treptow e com o aluno Vinícius Fernandes, da Universidade de Brasília, foram realizados ensaios *in silico* para observar o comportamento da molécula de colesterol sobre o mononucleossomo (FERNANDES, 2016). Os resultados mostraram que o colesterol provoca uma redução de  $17 \pm 3$  moléculas de água por sítio de ligação do colesterol encontrado. Sugerindo, portanto, que de fato o colesterol possui um efeito desidratante sobre o nucleossomo, promovendo o deslocamento de moléculas de águas estruturais e causando mudanças estruturais locais, o que pode explicar as alterações sobre a compactação das fibras observadas *in vitro*.

Considerando que as fibras de cromatina estão em uma concentração aproximada de 50nM, estimamos uma relação de 2.000 moléculas de colesterol por fibra de cromatina na maior concentração utilizada nesse trabalho (100 $\mu$ M). Sugerindo, portanto, a ligação de 55 moléculas de colesterol por nucleossomo (fibra com 36 nucleossomos). Conforme já relatado, Davey e colaboradores (2002) demonstraram 121 moléculas de águas estruturais importantes na interação das histonas com DNA nos

nucleossomos. Dessa forma, sugerimos que o colesterol pode expurgar moléculas de água e auxiliar contatos de regiões hidrofóbicas, facilitando a compactação das fibras.

Os ensaios com colesterol marcado, sugerem que esta molécula é capaz de se ligar às fibras de cromatina de 10nm, induzindo interações entre as fibras, o que é possível de ser observado pela banda de maior massa molecular no gel de agarose (destacada pela seta vermelha na Figura 24). Entretanto, não observamos essa mesma banda com brometo de etídeo. Acreditamos que isso se deve à maior sensibilidade de detecção da fluorescência do colesterol em relação ao brometo de etídeo.

Além disso, também não foi possível observar a fluorescência relativa ao colesterol na mesma altura das fibras de 10nm (Figura 24). Esse resultado pode ter ocorrido devido à diálise realizada após a incubação, que retirou o excesso de colesterol, indicando, conseqüentemente, uma baixa afinidade do colesterol pelas fibras. A baixa afinidade observada nesse ensaio, foi corroborada pelos estudos de dinâmica molecular realizados por Fernandes (2016), no qual identificou-se seis sítios de ligação do colesterol ao nucleossomo com Kd variando de 10 a 200 $\mu$ M, dependendo do sítio (FERNANDES, 2016).

Em ensaio de indução da compactação com magnésio (Figura 25), observamos rastros de fluorescência. Neste caso, a diálise após a incubação não foi realizada. Portanto, o excesso de colesterol livre e fracamente ligado à cromatina permaneceu na amostra. Nota-se que a molécula de colesterol livre migra no gel (Raia 2 na Figura 25) diferentemente do colesterol na presença da cromatina, sugerindo que o colesterol se associou às fibras.

Observa-se também que o rastro de colesterol ultrapassa a altura relativa às fibras de 10nm coradas com brometo de etídeo. Sugerimos que isso tenha ocorrido em razão da migração do colesterol livre no gel, que foi carregado pelas fibras de cromatina e devido a baixa afinidade e condições adversas (corrente eletroforética), se dissocia das fibras e migra livremente no restante do gel.

Ademais, é importante ressaltar que o colesterol marcado apresenta o grupo Bodipy (boro-dipirometeno), o que pode alterar sua afinidade pelo nucleossomo e fibras de cromatina. Apesar disso, esse tipo de colesterol (TopFluor) é comumente utilizado em ensaios *in vivo* e *in vitro* com impacto considerado aceitável na estrutura nativa dos lipídeos (MARKS; BITTMAN; PAGANO, 2008; SOLANKO et al., 2015).

Corroborando os achados relatados, a visualização das fibras por microscopia eletrônica revelou uma menor quantidade de DNA livre nas amostras tratadas com colesterol, o que indicou uma maior quantidade de fibras formadas, tanto de 10nm quanto de 30nm, reiterando que o colesterol auxilia a formação desses complexos *in vitro* nas concentrações utilizadas.

Além disso, visualizamos uma maior quantidade de agregados em presença do colesterol (Figura 27b) nas amostras de fibras compactadas (presença de *linker* histona e magnésio). Reiterando o fenômeno observado no ensaio de precipitação com magnésio, no qual obtivemos uma perda de amostra no gel (retida no poço), caracterizada pela diminuição da intensidade dos pixels na análise da densitometria das bandas (Figura 24b) com 100 $\mu$ M de tratamento.

Já o resultado do ensaio com o núcleo de células tratadas com colesterol não demonstrou diferenças entre os grupos analisados. Trabalho recente (CODINI et al., 2016), realizado com cultura de células de linfoblastoma humano (SUP-T1), demonstrou pequenas mudanças na morfologia da membrana plasmática, entretanto, o núcleo das células permaneceu inalterado (CODINI et al., 2016).

Apesar da metodologia utilizada nesse trabalho para a realização desse ensaio ser distinta daquela utilizada por Codini e colaboradores (2016), obtivemos resultado semelhante às análises morfométricas realizadas. Ressaltamos que o tratamento com colesterol foi realizado diretamente no núcleo, pois objetivamos demonstrar o efeito direto do colesterol sobre a cromatina, sem a interferência de possíveis sinalizações celulares, geradas pelo colesterol nas células.

Embora o resultado no ensaio baseado em células não tenha corroborado os achados *in vitro*, é importante salientar que as mudanças na estrutura da cromatina podem não ser percebidas nas células, uma vez que foram realizadas análises gerais do estado da cromatina no núcleo. Acreditamos que o colesterol possa atuar em determinados sítios alterando a dinâmica da cromatina local.

Ademais, nossos colaboradores, Werner Treptow e Vinicius Fernandes, realizaram experimentos de *docking* molecular, baseados em estrutura sobre a interação de nucleossomos com outros lipídeos, que sugerem que hormônios esteroides, ácidos biliares e ácidos graxos também podem se associar a nucleossomos em locais comuns ao colesterol (dados ainda não publicados).

Desta forma, nossos resultados sugerem que moléculas lipídicas, como o colesterol, podem ser consideradas ligantes de nucleossomos (NBMs) que influenciam na estrutura da cromatina.

## **PARTE II**

### **Ação de peptídeos desenhados *in silico* sobre a cromatina**

## 1. Introdução

### a) NBMs (Moléculas ligantes de nucleossomo)

Conforme relatado anteriormente, o nucleossomo possui carga geral positiva, devido às histonas presentes no complexo. No entanto, sua superfície apresenta a região conhecida como *patch* ácido, composta por oito resíduos de aminoácidos de carga negativa. Essa região é um sítio muito importante para ligação de diversas proteínas ou peptídeos.

Até o momento, nove estruturas de complexos proteína/peptídeo:nucleossomo, que fazem interação com *patch* ácido, foram publicadas: i) cauda da histona H4 (KAROLIN et al., 1997); ii) LANA, peptídeo do Antígeno Nuclear Associado à Latência do Herpes vírus Associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) (BARBERA et al., 2006), iii) IL-33 (Interleucina 33) (ROUSSEL et al., 2008), iv) RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) (MAKDE et al., 2010), v) HMGN2 (*High Mobility Group Nucleosome binding protein 2*) (KATO et al., 2011), vi) Sir3 (*Silent Information Regulator 3*) (ARMACHE et al., 2011), vii) CENP-C (*Centromere Protein C*) (KATO et al., 2013), viii) PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) (MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014), ix) SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase*) (MORGAN et al., 2016).

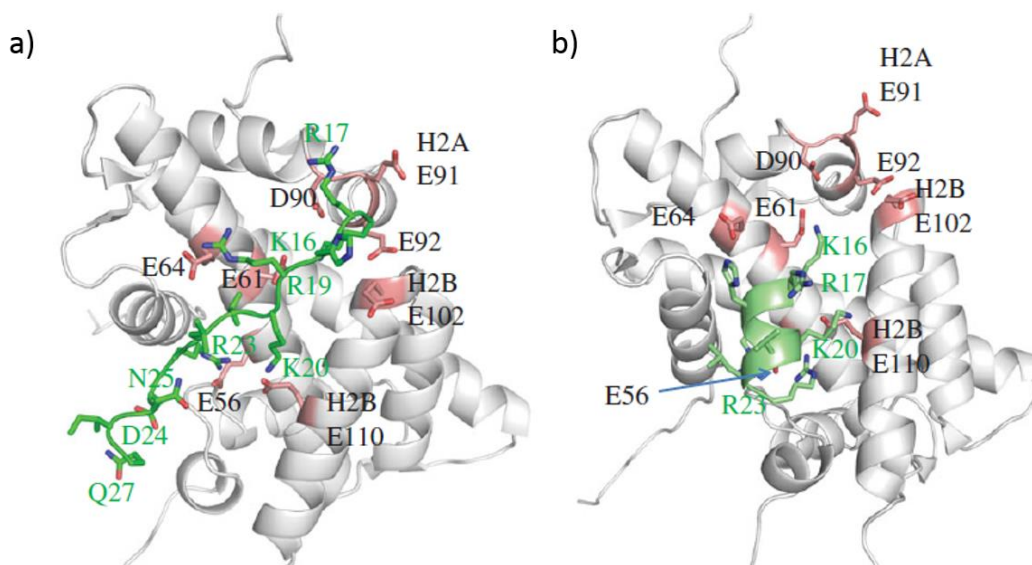
#### i. Cauda da histona H4

A interação da cauda da histona H4 com o *patch* ácido no nucleossomo adjacente foi observada por Luger e colaboradores (1997) na primeira estrutura cristalográfica de alta resolução de um nucleossomo (KAROLIN et al., 1997). Após esse trabalho, vários estudos foram realizados demonstrando a importância dessa interação para a compactação da cromatina, além da observação de que a acetilação da lisina 16 (K16) é um fator chave para esse processo (DORIGO et al., 2003; KAN; CATERINO; HAYES, 2009).

Embora a densidade eletrônica obtida no cristal do nucleossomo publicada em 1997 tenha sido difusa entre os resíduos de aminoácidos 16 a 19 da cauda da H4, os pesquisadores afirmam que essa região (K16 a N25) faz múltiplas ligações de hidrogênio e pontes salinas entre as cadeias laterais básicas dos resíduos de aminoácidos

K16, R19, K20 e R23 da cauda da H4 com as cadeias laterais ácidas de H2A (E56, E61, E64, D90, E91, E92) e H2B (E110) (KAROLIN et al., 1997).

Arya e Yang (2011) corroboraram esses resultados, por meio de simulações de dinâmica molecular e docking da cauda da H4 sobre o nucleossomo. Além disso, esses pesquisadores demonstram que os resíduos 16 a 22 tendem a formar uma  $\alpha$ -hélice que se encaixa perfeitamente no *patch* ácido (YANG; ARYA, 2011) (Figura 29).



## ii. LANA

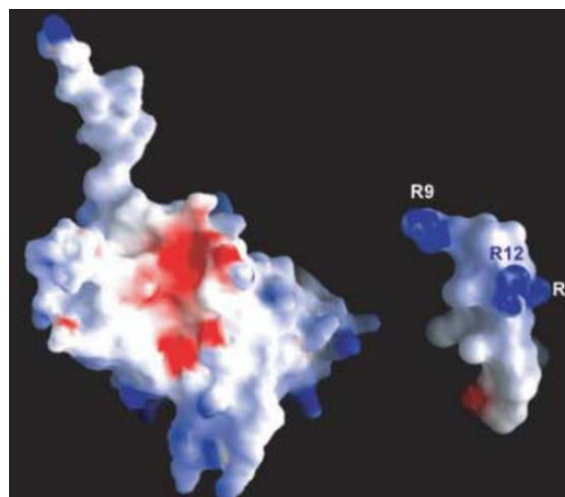
O Sarcoma de Kaposi é uma neoplasia de endotélio causada pela infecção do herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) (CHANG et al., 1994). É um vírus que comumente infecta pacientes portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

O antígeno nuclear associado à latência (LANA) é uma proteína multifuncional constantemente expressa em todas as doenças malignas associadas ao KSHV. LANA exerce papel fundamental na manutenção do DNA episossomal durante a divisão celular e na modulação da transcrição através da interação com diversas proteínas, como a p53 por exemplo (HU; GARBER; RENNE, 2002).

LANA é uma proteína nuclear de 1162 resíduos de aminoácidos que pode ser dividida em três domínios principais: a região C-terminal, que contém um motivo de leucinas, necessário à interação com outras proteínas celulares (FRIBORG et al., 1999); um domínio central que contém três blocos de resíduos aminoácidos repetidos; e a região N-terminal que contém um sinal de localização nuclear (NLS) e uma sequência motivo, onde acontece a ligação do LANA ao cromossomo mitótico (PIOLOT; TRAMIER; COPPEY, 2001).

Para a determinação da exata região de interação do LANA com o cromossomo, realizou-se uma série de ensaios bioquímicos nos quais os pesquisadores mostraram a forte ligação da porção N-terminal do LANA às histonas H2A/H2B (BARBERA et al., 2006). A seguir foi obtida a estrutura cristalográfica do LANA, compreendendo os resíduos de aminoácidos de 1-23 da porção N-terminal, com o nucleossomo.

A uma resolução de 2.9 Å, foi possível observar que o peptídeo forma um grampo que interage exclusivamente com o *patch* ácido no nucleossomo (BARBERA et al., 2006). A análise das superfícies moleculares do peptídeo e do dímero de H2A/H2B demonstrou um encaixe e uma complementariedade de cargas perfeitos, indicando que a porção N-terminal do LANA evoluiu de forma a reconhecer essa região do NCP com alta especificidade (Figura 30) (BARBERA et al., 2006).



**Figura 30. Regiões de interação do LANA com dímero H2A/H2B.** Dímero de H2A/H2B à esquerda e peptídeo do LANA à direita, coloridos por superfície eletrostática (vermelho negativo e azul positivo), demonstrando a complementariedade de cargas para interação e formação do complexo. Destacados os resíduos de aminoácidos mais importantes para ligação de LANA ao dímero: R7, R9 e R12. Adaptado de (BARBERA et al., 2006).



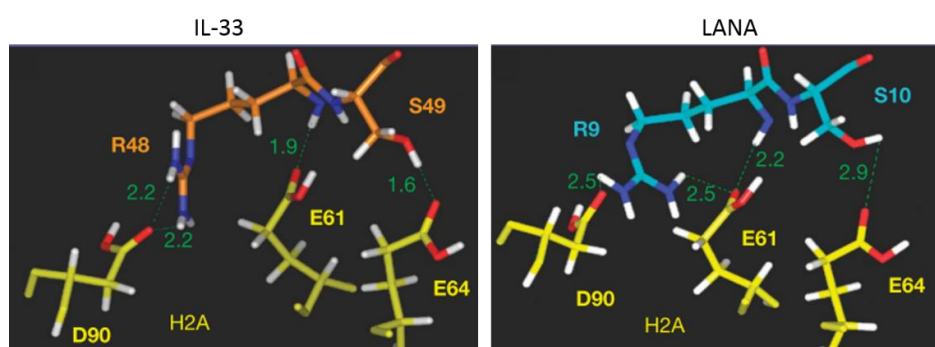
O conceito da superfície nucleossomal como plataforma de interação para proteínas já existia. No entanto, a publicação do complexo LANA/NCP foi a primeira a comprovar essa hipótese, demonstrando ainda o *patch* ácido como alvo.

### iii. IL-33

A interleucina 33 pertence à família da IL-1 e estimula a produção de citocinas do tipo 2 pelas células T, mastócitos, eosinófilos e basófilos (SCHMITZ et al., 2005). A demonstração da associação da IL-33 com a cromatina e sua propriedade de regulação transcricional despertou o interesse a respeito dessa interação (CARRIERE et al., 2007). Após um ano, foi então publicado um estudo apresentando a estrutura atômica da IL-33 com NCP obtida por modelagem computacional (ROUSSEL et al., 2008).

Por meio de ensaios de mutagenese identificou-se os resíduos essenciais (aminoácidos 40-58) da IL-33 para interação com o cromossomo, os quais estavam inseridos no chamado domínio de ligação à cromatina (CBM - *chromatin-binding motif*) (ROUSSEL et al., 2008). De maneira interessante, foi demonstrado um motivo conservado de resíduos (MXLRSG) que fazem a interação de IL-33 e LANA, sugerindo um modelo de ligação similar desses peptídeos ao NCP.

A partir dessa observação, os pesquisadores realizaram modelagens moleculares baseados na estrutura do LANA/NCP. O modelo sugere que CBM-IL-33 pode adotar a forma de grampo, assim como o LANA, fazendo com que os resíduos R48-S49 interajam com o *patch* ácido no NCP (Figura 31). Além disso, foram realizados ensaios de mutações no *patch* ácido para validação do modelo (ROUSSEL et al., 2008).



**Figura 31. Comparação da forma de interação de IL-33 e LANA com dímerno de H2A/H2B.** Modelo de ligação de IL-33 com dímerno de H2/H2B comparado à interação demonstrada por Barbera e colaboradores (BARBERA et al., 2006). Adaptado de (ROUSSEL et al., 2008).

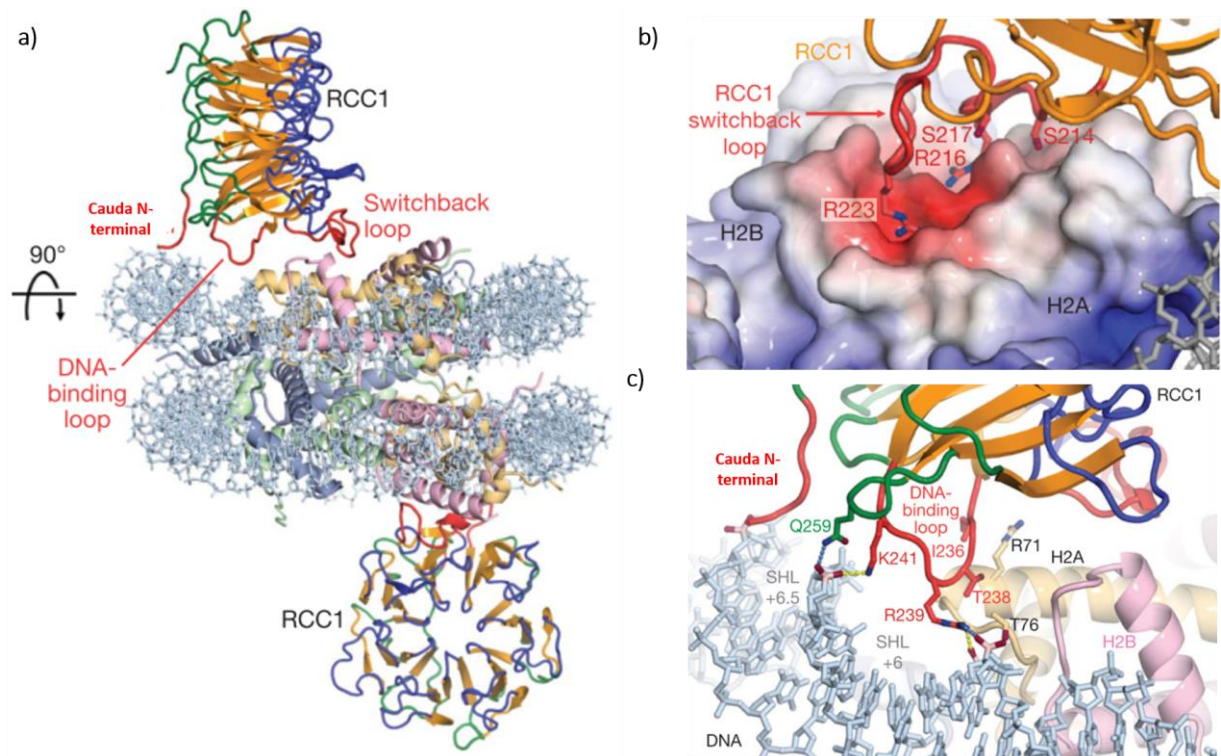
#### iv. *RCC1*

A estrutura cristalográfica do RCC1/NCP, foi a primeira de uma proteína intacta complexada ao nucleossomo (MAKDE et al., 2010). O RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) se liga ao nucleossomo e recruta e ativa a proteína Ran GTPase, criando um gradiente de concentração de Ran ao redor dos cromossomos (KALAB; HEALD, 2008). Este gradiente é essencial em diversos processos celulares, como a regulação do transporte núcleo-citoplasma e a formação do fuso mitótico e do envelope nuclear, após a mitose (ASKJAER et al., 2002).

O RCC1 é constituído de um domínio  $\beta$ -*propeller* de sete folhas repetidas (resíduos 51-68) e uma cauda N-terminal desordenada (RENAULT et al., 1998). A estrutura cristalográfica de 2.9Å do complexo RCC1/nucleossomo, publicada em 2010, revelou que três quartos das interações são entre o domínio  $\beta$ -*propeller* de RCC1 com o nucleossomo e as histonas H2A e H2B, e o restante envolve o contato com o DNA nucleossomal (Figura 32a) (MAKDE et al., 2010).

Um ponto interessante é relacionado à interação de RCC1 com as histonas, que acontece pela ligação do “*switchback loop*” ao *patch* ácido, através das argininas 216 e 223 principalmente (Figura 32b), sendo essas interações muito similares àquelas realizadas pela arginina 9 do LANA (BARBERA et al., 2006; MAKDE et al., 2010).

De forma inesperada foi demonstrada também a ligação do chamado “*DNA binding loop*” ao DNA nucleossomal (Figura 32c). Esta é relativamente modesta, se comparada à interação que acontece com o *patch* ácido, segundo os autores. Além disso, de acordo com a literatura, a cauda N-terminal do RCC1 também interage com o DNA. No entanto, não foi demonstrada essa ligação, devido ao alto grau de desordem dessa região (MAKDE et al., 2010).



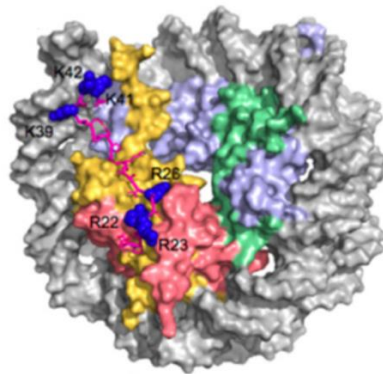
**Figura 32. Complexo RCC1/nucleossomo.** a) Duas moléculas de RCC1 interagem de forma equivalente ao nucleossomo. Interação do RCC1 com as histonas, H2A(amarelo)/H2B (rosa), pelo “switchback loop” e com o DNA (azul claro) pelo *DNA-binding loop*; b) zoom da interação do “switchback loop”, através dos resíduos S214, S217, R223 e R216, com o *patch* ácido, formado pelas histonas H2A/H2B representado em superfície eletrostática; c) zoom da interação de RCC1 com o DNA nucleossomal: i) *DNA-binding loop* interage com o DNA nas regiões SHL+6 e +6.5 através dos resíduos I236, R239, K241 E Q259, ii) possível interação da cauda N-terminal. Adaptado de (MAKDE et al., 2010).

#### v. *HMGN2*

*HMGN2* pertence à família das proteínas *HMGN (High Mobility Group Nucleosomal)*, que possui diversas funções celulares, como modular a transcrição e o reparo de DNA (POSTNIKOV; BUSTIN, 2010). As proteínas dessa família apresentam um domínio comum em sua estrutura: um sinal de localização nucleossomal, um domínio longo conservado de ligação ao nucleossomo (NBD) e uma porção C-terminal, menos conservada, composta de resíduos negativos (POSTNIKOV; BUSTIN, 2010).

A compreensão do modo de interação dessas proteínas com o nucleossomo é um desafio, devido à desordem intrínseca do NBD, o que dificulta muito a cristalização do complexo. Em 2011, Kato e colaboradores publicaram a estrutura do complexo *HMGN2/nucleossomo*, através da técnica de “methyl-TROSY” por ressonância magnética nuclear (RMN). Por meio do monitoramento dos grupos metila dos resíduos de valina, leucina e isoleucina, sugeriu-se que *HMGN2* interage com o nucleossomo no

*patch* ácido principalmente por três argininas (R22, R23 e R26). Ensaios de mutação e calorimetria foram realizados e comprovaram esses achados. Além disso, os autores identificaram uma possível interação de HMGN2 com o DNA na região da *dyad*. Podemos observar o *docking* realizado, mostrando o complexo e suas interações, na Figura 33 (KATO et al., 2011).



**Figura 33. Docking da estrutura do HMGN2-NBD complexado ao NCP.** Estrutura do NBD representada em *sticks* rosa pink e as cadeias laterais dos resíduos R22, R23, R26, K39, K41 e K42 representadas em esferas azuis. Nucleossomo representado em superfície (cinza: DNA; H2A: rosa, H2B: amarelo, H3: verde e H4: azul). Adaptado de (KATO et al., 2011).

#### vi. *Sir3*

As proteínas silenciadoras da família “Sir” (*Sir- silent information regulator*) estão envolvidas na regulação da expressão gênica, organizando a heterocromatina nos telômeros (PALLADINO et al., 1993) e DNA ribossomal (SMITH; BOEKE, 1997) em *Saccharomyces cerevisiae*. Os mecanismos envolvidos no silenciamento gênico são muito semelhantes nas leveduras e mamíferos, por isso o estudo das proteínas reguladores de informação silenciosa é importante e fundamental para a compreensão desses processos em mamíferos (RUSCHE; KIRCHMAIER; RINE, 2003).

Já havia sido demonstrado que a proteína Sir3 é capaz de se ligar aos nucleossomos na cromatina e induzir a compactação das fibras *in vitro* (GEORGEL et al., 2001; MCBRYANT et al., 2008). A maioria das mutações que afetam o silenciamento são encontradas na porção N-terminal no domínio BAH (*bromo-associated domain*) da proteína Sir3 (Sir3BAH) (BUCHBERGER et al., 2008; SAMPATH et al., 2009).

A estrutura cristalográfica deste domínio complexada ao nucleossomo revelou múltiplas interações, envolvendo todas as histonas do octâmero e ainda o DNA

nucleossomal (ARMACHE et al., 2011). 28 resíduos fazem a interação de BAH com o nucleossomo, sendo que 17 destes já haviam sido identificados em *screens* genéticos.

Além disso, sabia-se que pelo menos 30 mutações, encontradas nas histonas, podem afetar o silenciamento. Essa estrutura permitiu a descrição atômica de 14 destes resíduos (ARMACHE et al., 2011). O domínio BAH interage com a cauda da H4, se liga a resíduos da superfície de H3 e H4 e também interage com o *patch* ácido por meio de *loops*, que se formam devido às interações envolvidas (Figura 34).



**Figura 34. Interações entre BAH-Sir3 e o nucleossomo.** Bah-Sir3 representando em *cartoon* laranja demonstrando os loops que se formam na interação com o NCP (representado em *cartoon* nas cores: cinza- DNA, H2A- rosa, H2B- amarelo, H3- azul e H4- verde. Adaptado de (ARMACHE et al., 2011).

## vii. CENP-C

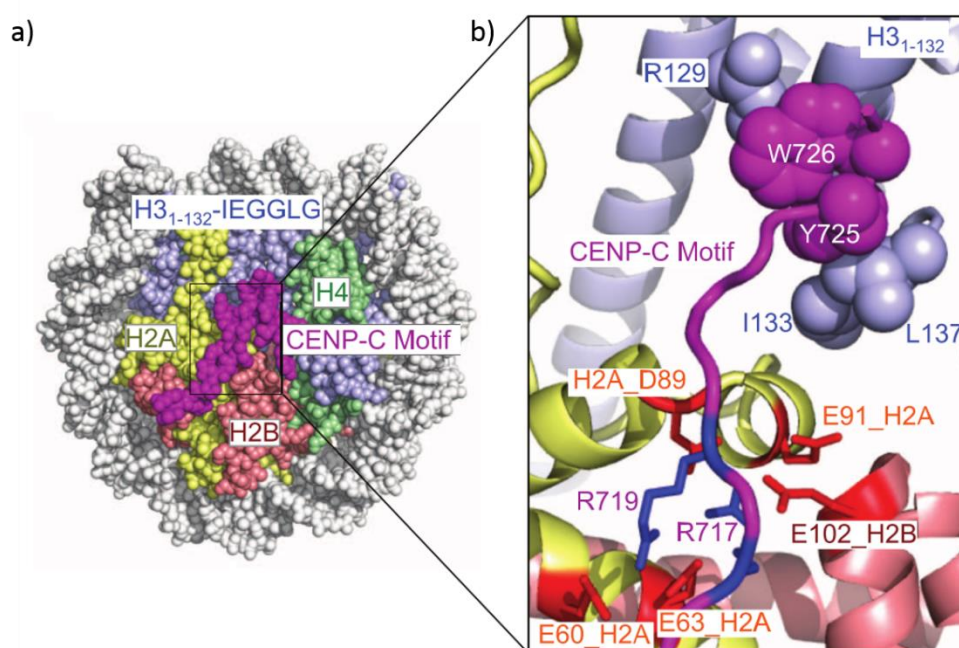
CENP-C (*Centromere protein C*) é um componente fundamental dos centrômeros. Os centrômeros são sítios cromossomais específicos essenciais na segregação dos cromossomos durante a divisão celular. Sua estrutura consiste em um domínio de emparelhamento, que mantém a coesão entre cromátides irmãs; um domínio central, que contém DNA centromérico específico; e o cinetócoro, um complexo DNA/proteína que fornece o local de ligação dos microtúbulos do fuso e regula o movimento dos cromossomos para os polos do fuso (EARNSHAW; RATRIE; STETTEN, 1989).

A cromatina centromérica possui a variante CENP-A, ao invés da H3, e é complexada a 16 proteínas, sendo uma delas o CENP-C (VERDAASDONK; BLOOM,

2011). O CENP-C possui quatro regiões funcionais, sendo a região central responsável pela ligação ao nucleossomo, contendo CENP-A. Essa ligação foi mais claramente demonstrada pela cristalização do complexo CENP-C/NCP, publicada em 2013 (KATO et al., 2013).

Inicialmente, foram realizados estudos de RMN e *screening* de mutações, utilizando um peptídeo contendo uma sequência motivo de CENP-C e um nucleossomo quimérico. Esse nucleossomo contém uma sequência motivo de CENP-A, em substituição à H3, na região C-terminal, o que permitiu a identificação de resíduos essenciais para formação do complexo (KATO et al., 2013).

O cristal do complexo CENP-C/NCP quimérico demonstrou a ligação de CENP-C a resíduos da H3 quimérica e ao *patch* ácido por meio de duas argininas (R717 e R719) (KATO et al., 2013), de modo similar ao que já havia sido visto para LANA (BARBERA et al., 2006), RCC1 (MAKDE et al., 2010) e BAH-Sir3 (ARMACHE et al., 2011) (Figura 35).



**Figura 35. Estrutura de CENP-C/NCP quimérico.** a) Estrutura do complexo CENP-C/NCP representado em superfície de esferas (CENP-C: roxo; DNA: cinza, H2A: amarelo, H2B: rosa, H3: azul, H4: verde) demonstrando a interação alongada do peptídeo com as histonas; b) zoom da interação de CENP-C (representando em roxo na forma de *cartoon*) com as histonas (representado em *cartoon*, sendo H2A amarelo, H3B vermelho e H3 azul). Destaca-se a interação das argininas R719 e R717 com os resíduos de aminoácidos do *patch* ácido e regiões próximas (H2A: E60, E63, D89, E91 e H2B: E102 coloridos em vermelho para destaque), além da interação de WT25 e Y726 (esferas roxas) de CENP-C com os resíduos de aminoácidos I133, L137 e R219 (esferas azuis) da H3 quimérica (H3<sub>1-132</sub>-IEGGLG). Adaptado de (KATO et al., 2013).

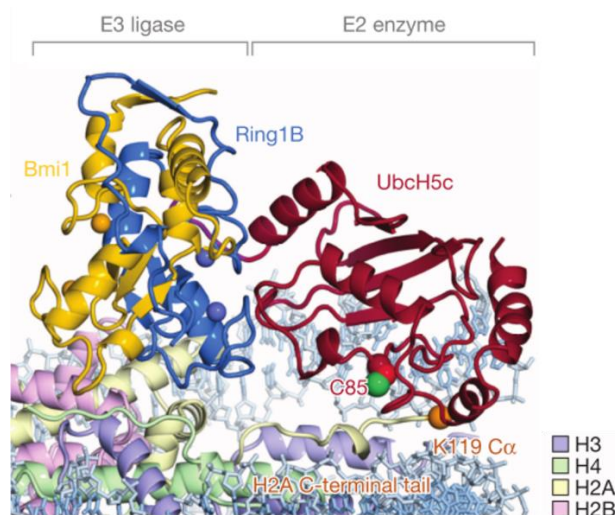
### **viii. PRC1**

PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) pertence à família do grupo *Polycomb* (PcG), cujas proteínas são conhecidas por sua atividade de repressão transcricional. A associação deste grupo de proteínas com diversos tipos de cânceres e o reconhecimento de seu papel chave na regulação epigenética de auto renovação de células tronco e linhagens de desenvolvimento, despertaram um grande interesse de estudos nessa área (CREA et al., 2012).

Este grupo de proteínas forma pelo menos dois tipos de complexos multiméricos, PRC1 e PRC2. PRC2 catalisa a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3), a qual é reconhecida por proteínas do cromodomínio (CHD) de PRC1. Esta por sua vez catalisa a mono ubiquitinação de H2A (H2AK119u1), o que demonstrou ser crucial para a repressão de diversos genes em células tronco embrionárias (ENDO et al., 2012).

A ubiquitinação de proteínas é realizada por uma cascata de enzimas E1, E2 e E3. De forma resumida, o processo inicia-se pela ativação de E1, que transfere o grupo ubiquitina para a enzima E2, que é reconhecida pela enzima E3 ligase, que já está associada à proteína alvo. A ubiquitina é então transferida ao grupo amina de um resíduo de lisina da proteína alvo (PICKART, 2001).

Em 2014, foi cristalizado o módulo de ubiquitinação de PRC1, um complexo de enzimas E2-E3, composto pelo UbcH5c e o heterodímero Ring1B-Bmi1 RING, ligado ao NCP (MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014). Essa estrutura revelou que as três proteínas de PRC1 fazem contato com as quatro histonas do nucleossomo. O domínio RING de Ring1B se liga ao *patch* ácido ancorado pela arginina 98 e o domínio RING de Bmi1 interage com uma superfície ácida menor entre H3/H4. Já a enzima E2 UbcH5c se liga ao DNA nucleossomal em duas posições, além de estar próximo a K119 (Figura 36).



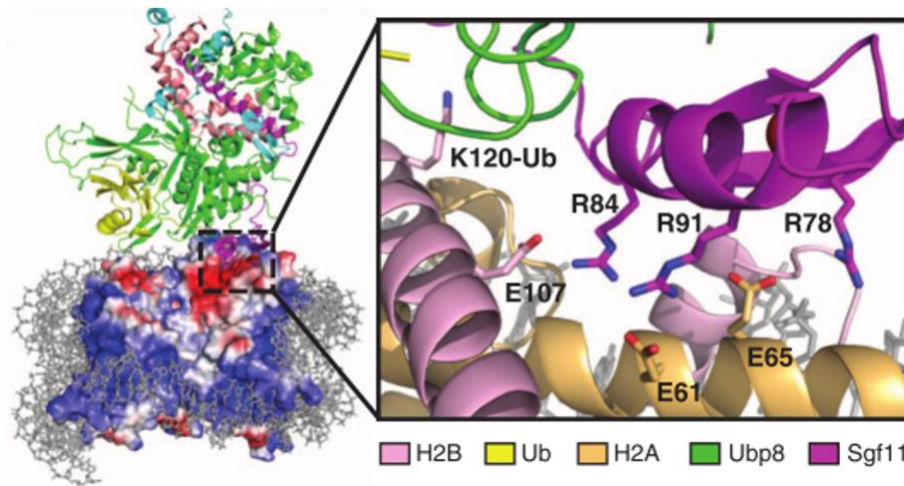
**Figura 36. Interação do módulo de ubiquitinação de PRC1 com o nucleossomo.** Representação em *cartoon* do modo de ligação de PRC1 ao NCP, demonstrando a cisteína (C85), sítio ativo de UbcH5c próximo a lisina 119 (K119) de H2A. Adaptado de (MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014).

#### ix. SAGA

SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase*) é o maior complexo de histona acetil transferase, que ativa a transcrição de genes do estresse em fungos (KOUTELOU; HIRSCH; DENT, 2010). Este complexo é muito conservado entre fungos e humanos. É composto de 19 subunidades, sendo a Gcn5 o sítio catalítico para acetilação da H3 (GRANT et al., 1997). Outro importante módulo do complexo é o responsável pela deubiquitinação, conhecido como Dub, composto pelas proteínas Ubp8, Sus1, Sgf11, e Sgf73, sendo que a Ubp8 catalisa a deubiquitinação da H2B (HENRY et al., 2003).

Recentemente, determinou-se a estrutura cristalográfica do módulo DUB de SAGA complexado ao nucleossomo (MORGAN et al., 2016). Como nas estruturas anteriormente publicadas, identificou-se três argininas (R78, 84 e 91) que fazem a interação de Sgf11 ao *patch* ácido (Figura 37). Além disso, foi visualizada a ligação do sítio ativo de Ubp8 na porção C-terminal de H2B, que continha o resíduo (K120) ubiquitinado (MORGAN et al., 2016).





**Figura 37. Interação de SAGA-DUB com nucleossomo.** Interação do nucleossomo, representando por superfície eletrostática (vermelho: negativo, azul: positivo), com o complexo SAGA-DUB. Zoom da interação destacando-se as argininas (R78, R84 e R91) que fazem interação com o *patch* ácido e a lisina K120 de H2B próximo a subunidade Ubp8. Adaptado de (MORGAN et al., 2016).

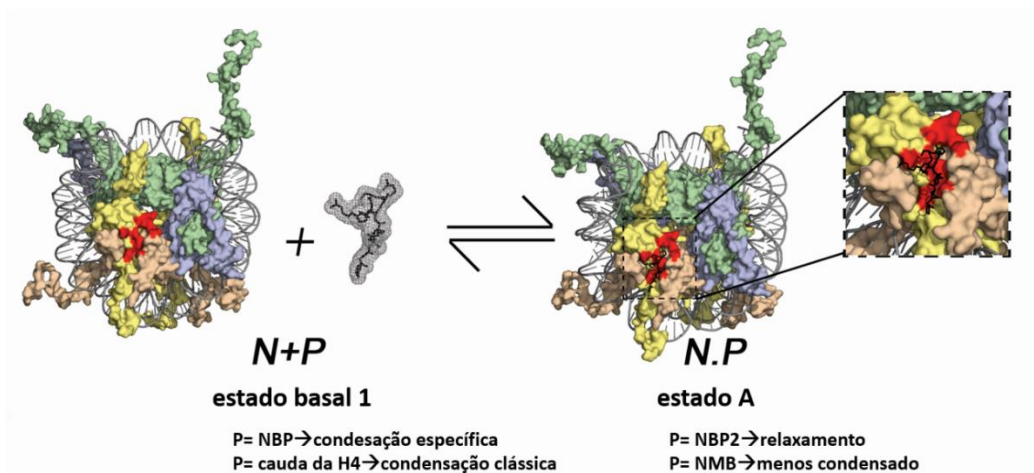
### b) Superfície do nucleossomo e dinâmica da cromatina

A interação das moléculas ligantes de nucleossomos e cauda da histona H4 na superfície nucleossomal, incluindo o *patch* ácido, modulam a estrutura da cromatina. Assim, o equilíbrio entre esses fatores irá determinar o desfecho final: compactação ou relaxamento. Hansen e colaboradores (2013) propuseram um elegante modelo de regulação da estrutura de alta ordem da cromatina pelas proteínas ligantes de nucleossomos (*nucleosome binding proteins* – NBPs) (KALASHNIKOVA et al., 2013).

Nesse modelo, os autores sugerem que o estado clássico da cromatina compactada ocorreria na ausência de NBPs, o que facilitaria a ligação da cauda da histona H4 ao *patch* ácido fazendo com que os nucleossomos adjacentes se aproximassem. Neste caso, o estado compactado ou relaxado da cromatina é dependente da concentração de NBPs que induz uma conformação específica da cromatina. Ainda neste modelo, a conformação relaxada, fibra de 10nm, aparece quando o *patch* ácido, região preferencial de ligação das NBPs, encontra-se livre, ocasionando a repulsão entre os nucleossomos devido à alta carga negativa desta região (KALASHNIKOVA et al., 2013).

Em um artigo de opinião recentemente publicado pelo nosso grupo (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015), estendemos este modelo hipotético para acomodar a situação na presença de moléculas exógenas ligantes de nucleossomo (*exogenous*

*nucleosome binding molecules* - eNBMs). Sugerimos um estado adicional menos condensado da cromatina, onde o *patch* ácido encontra-se neutralizado pela ligação de eNBMs, causando o bloqueio da ligação da cauda da H4 e outras NPBs (Figura 38).



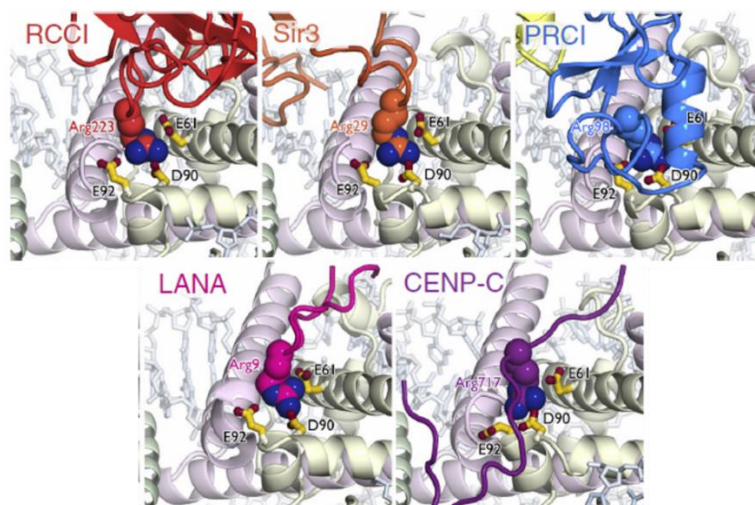
**Figura 38. Hipótese de mudanças na arquitetura da cromatina na ligação de NBP e eNBMs.** Generalizando o equilíbrio dinâmico entre o nucleossomo e NBMs ou NPBs resulta em qualquer um dos dois estados (estado basal 1 e estado A), semelhante à clássica interação droga-receptor. Dado N, um nucleossomo, e P, uma proteína ou molécula, por  $N + P =$  nucleossomo desocupado. Quando a concentração de P muda, desloca o equilíbrio para N.P. Para  $P = P1$ ,  $A = X$ ; Para  $P = P2$ ,  $A = Y$ ; Para  $P =$  cauda H4,  $A = Z$ ; Para  $P = M$ ,  $A =$  estado basal 2, onde  $P1 = NBP1$ ,  $P2 = NBP2$ , H4 cauda = N-terminal De H4,  $M = NBM$ , e X, Y, Z = estados distintos. X é um estado condensado específico, Y é um estado relaxado específico e Z é um estado condensado clássico. O estado basal 1 refere-se ao estado de cromatina relaxado e estado basal 2 refere-se a um estado específico, menos condensado, imposto pela oclusão do *patch* ácido. Adaptado de (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015).

Pode-se considerar que o nucleossomo possui três superfícies de ligação distintas: um disco central de histonas com um diâmetro de cerca de 65 Å; uma “casca” externa de DNA; e as caudas das histonas, que se espalham para fora do NCP. Cada uma destas superfícies de ligação oferece possibilidades de reconhecimento específico da cromatina por proteínas e enzimas (MCGINTY; TAN, 2016).

O núcleo central de histona exibe cerca de 27.000Å<sup>2</sup> de área de superfície acessível, repleta de cantos e protuberâncias que fornecem superfícies complementares interessantes para a interação de proteínas. Destaca-se nessa superfície, o *patch* ácido, por apresentar a carga negativa mais proeminente e ser alvo de um motivo estrutural comum de ligação das proteínas/peptídeos: um ancoramento de argininas, que se ligam na cavidade gerada pelos resíduos E61, D90 e E92 da H2A (Figura 39).

Essa cavidade possui um tamanho que permite a interação de diversas estruturas, incluindo loops, como acontece na ligação do RCC1 e Sir3, grampos, como LANA, e conformações mais estendidas, como HMG2 e CENP-C (MCGINTY; TAN,

2014). Além disso, pode também comportar estruturas secundárias, como a cauda da H4 ( $\alpha$ -hélice) (YANG; ARYA, 2011).



**Figura 39. Sítio de ancoragem de argininas no patch ácido.** Cavidade formada pelos resíduos E61, D90 e E92 da H2A no *patch* ácido, onde acontecem as interações das argininas dos peptídeos/proteínas descritos na literatura. Adaptado de (MCGINTY; TAN, 2016).

Os resíduos que fazem a interação com o *patch* ácido e desfecho que a formação do complexo com o nucleossomo causa na cromatina estão sumarizados na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3. Mapa de interação dos peptídeos/proteínas com *patch* ácido e desfecho da cromatina.**

	Resíduos H2A									Resíduos H2B	Desfecho da cromatina	
	Y50*	V54*	E56	Y57*	E61	E64	D90	E91	E92			E102
<b>Cauda da H4</b>			R19, R23		K16	K16, R17, H18	K16		K16	K16	K20, R23	compactação
<b>LANA</b>	M6, L8	M6, L8	R9	M6, L8	R9	S10	R9		R9		R7	compactação
<b>IL-33</b>	M45	M45		M45	R48, S49	S49	R48		R48			compactação
<b>RCC1</b>					R216, R223	R216, S214, S217	R223		R216, R223	R216, R223		relaxamento
<b>HMGN2</b>					R23, S24, R26	R23, S24	R26	R22, R26	R26			relaxamento
<b>Sir3</b>					R32	R32	R32		R32		R32	compactação
<b>CENP-C</b>					R717		R525	R717, R719		R717, R719		compactação
<b>PRC1</b>					K97, R98	K97	R98		R98			compactação
<b>SAGA</b>					R78, R84, R91							compactação

\*Resíduos não polares que formam o *pocket* hidrofóbico. Fontes: (ARMACHE et al., 2011; BARBERA et al., 2006; KATO et al., 2011; KOUTELOU; HIRSCH; DENT, 2010; MAKDE et al., 2010; MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014; ROUSSEL et al., 2008; TRAZZI et al., 2009; YANG; ARYA, 2011).

Há dois anos, foi publicado um estudo que realizou um *screening* de mais de 350.000 compostos (pequenas moléculas) com o objetivo de inibir a ligação do LANA ao *patch* ácido (BEAUCHEMIN et al., 2014). Entretanto, nenhum dos compostos passou pela contraprova nos ensaios de competição com LANA. Os autores sugerem que uma biblioteca de compostos mais complexos, como peptídeos possa deslocar o LANA do nucleossomo com maior eficiência (BEAUCHEMIN et al., 2014).

Assim, em 2012, o grupo do Prof. Guilherme Santos desenvolveu um peptídeo, desenhado *in silico*, com o objetivo de alvejar a superfície nucleossomal com fins terapêuticos. O pedido de patente deste peptídeo, nomeado GMIP1 (*Genetic Modified Inducible Peptide*), junto a outras variantes, foi depositado em março de 2015 no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual).

### c) GMIP1

O desenho *in silico* de GMIP1 foi realizado em colaboração com o pesquisador Paulo Sérgio de Oliveira e sua equipe, e a aluna Manuela Leite, da Universidade de Brasília, no Laboratório de Bioinformática do LNBio, em Campinas. Esse peptídeo foi desenhado baseado em estruturas cristalográficas das proteínas disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*) até o ano de 2012.

Por meio do programa KVFinder (OLIVEIRA et al., 2014) foram determinadas as cavidades existentes baseadas na interação do peptídeo LANA, RCC1 e Sir3 com o nucleossomo. A partir dessa análise, verificou-se que a interação do RCC1 com o nucleossomo seria a mais adequada para o desenho do peptídeo, por apresentar uma melhor acomodação na superfície do nucleossomo.

Como já revisado anteriormente, RCC1 apresenta duas porções distintas de ligação ao nucleossomo, uma ligante do *patch* ácido e outra que interage com o DNA. Para unir estas duas porções, foi adicionado um espaçador de três alaninas.

Ensaio de dinâmica molecular do GMIP1, com 10ns, revelou uma conformação preferencial de alfa-hélice na porção 1, o que pode ser uma grande vantagem para o desenho de peptídeos miméticos.

Em continuidade ao trabalho, foram realizados diversos ensaios *in vitro* e baseados em células, com a hipótese de que GMIP1 possa ser uma nova eNMB.

## 2. Objetivos específicos

- Estabelecer a constante de dissociação da ligação de GMIP1 ao mononucleossomo;
- Verificar o efeito de GMIP1 sobre a estabilidade de mononucleossomos reconstituídos *in vitro*;
- Verificar o efeito do GMIP1 sobre a compactação de fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*;
- Verificar a capacidade de penetrabilidade celular de GMIP1; e
- Verificar o efeito fisiológico do GMIP1 em ensaios baseados em células de mamíferos.

### 3. Materiais e Métodos

#### a) **Histonas, sequências das DNA, e reconstituição de mononucleossomos e fibras de cromatina**

Conforme descrito no “Materiais e Métodos” da parte I (Páginas 33 à 39).

#### b) **Peptídeos ligantes de nucleossomo**

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram: GMIP1, LANA e cauda da histona H4. Todos foram sintetizados e purificados pela empresa GenScript, nos Estados Unidos, apresentando um grau de pureza >98%, com as seguintes sequências primárias (sentido C-terminal para N-terminal):

- GMIP1: RTIAAALSERSISGEGRR (19 resíduos de aminoácidos)
  - Massa molecular: 2043.31g/mol
  - Ponto isoelétrico teórico: 11.52
- LANA: MAPPGMRLRSRSTGAPLTRGSC (23 resíduos de aminoácidos)
  - Massa molecular: 2359.77g/mol
  - Ponto isoelétrico teórico: 12.00
- Cauda da histona H4: CRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL (21 resíduos de aminoácidos)
  - Massa molecular: 2163.62g/mol
  - Ponto isoelétrico teórico: 11.76

Além disso, a porção N-terminal de GMIP1 foi marcado com a fluorescência TAMRA (excitação em 546nm e emissão em 579nm) e sintetizado e purificado pela empresa PepMic (China) com grau de pureza 95%.

Os peptídeos foram dissolvidos em Tris 10mM pH 7.4 e armazenados a -20°C. Análises cromatográficas e espectrometria de massas de todos os peptídeos foram reavaliadas e confirmadas no Instituto de Química na Universidade de Brasília.

#### c) **Ensaio de ligação de peptídeos a mononucleossomos reconstituídos *in vitro***

- Ensaio de ligação de peptídeos e nucleossomos por mudança de migração eletroforética

Os mononucleossomos foram reconstituídos *in vitro* (0,4μM) e posteriormente incubados com concentrações graduais de peptídeos (1 a 10μM) por duas horas em

temperatura ambiente. Após essa incubação, as amostras foram dialisadas em tampão final da reconstituição (10mM Tris pH 7.4; 1,5mM EDTA; 15mM NaCl) por duas horas em temperatura ambiente, para retirada de possíveis ligações inespecíficas dos peptídeos ao nucleossomo.

O resultado foi avaliado por migração eletroforética em gel de acrilamida 8% corado com brometo de etídeo.

- Visualização de proteínas e peptídeos excisados do gel de acrilamida

Com o intuito de comprovar a ligação dos peptídeos ao mononucleossomo, as bandas do complexo (peptídeo:nucleossomo) presentes no gel de acrilamida 8% descrito acima, foram recortadas com bisturi e depositadas em um tubo de 1,5mL. O gel foi macerado manualmente dentro do tubo contendo quantidade suficiente de tampão (Tris 10mM pH 7.4 e 1mM EDTA) para cobrir os pedaços de gel. A amostra foi centrifugada por cinco minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e separado em outro tubo para concentração da amostra no Centrivap Concentrador (Labconco) por 20 minutos a 65°C.

As amostras concentradas foram submetidas a migração eletroforética em gel desnaturante de acrilamida 4-20% por uma hora e 45 minutos com tampão Tris-Glicina 1x.

- Ensaio de ligação de peptídeos fluorescentes com mononucleossomo

Os peptídeos foram marcados com o fluoróforo Dylight 488 NHS Ester (Thermo Scientific n. 46402), que possui excitação em 493nm e emissão em 518nm. O reagente foi dissolvido em DMSO para concentração de 10mM e armazenado a -20°C protegido da luz.

A reação de marcação foi realizada misturando 200µg do peptídeo diluído em tampão fosfato 50mM pH 6.5 com 500µg de Dylight (em DMSO). Incubou-se as amostras por 24 horas a 4°C protegido da luz. O grupo N- hidroxisuccinimidil (NHS) éster, conjugado a fluorescência, se liga ao grupo amina exposto da porção N-terminal do peptídeo, realizando assim a marcação.

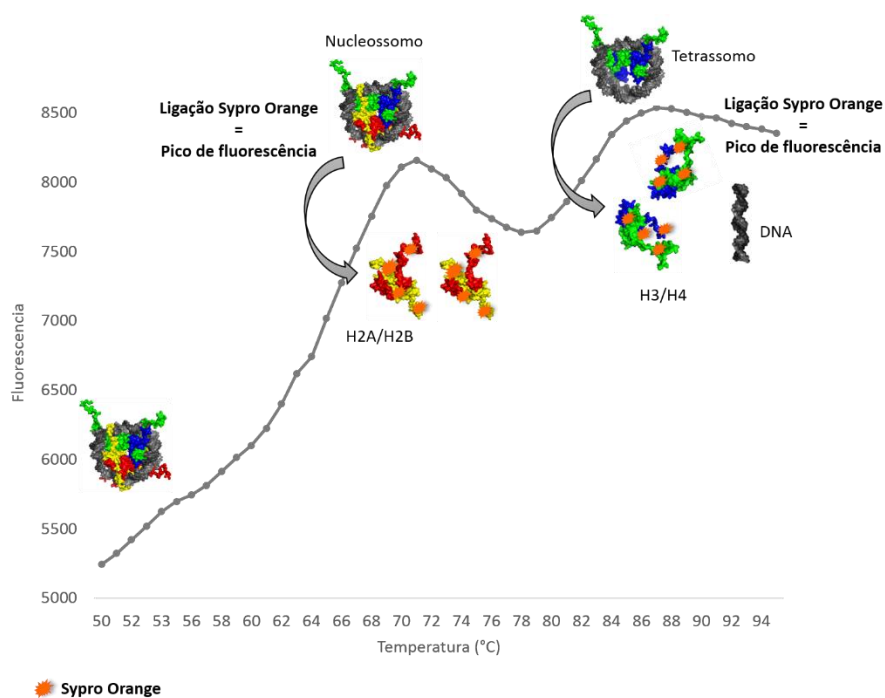
O ensaio de ligação ao mononucleossomo foi realizado por meio da incubação dos mononucleossomos reconstituídos *in vitro* (0,4µM) com os peptídeos marcados em

concentrações graduais (1 a 10 $\mu$ M), por duas horas, em temperatura ambiente, protegido da luz. Após essa incubação, as amostras foram dialisadas em tampão final da reconstituição (10mM Tris ph 7.4; 1,5mM EDTA, 15mM NaCl) overnight em temperatura ambiente, para retirada de excesso e de ligações inespecíficas do peptídeo ao nucleossomo.

Posteriormente foi feita a análise através de corrida eletroforética em gel de acrilamida 8%, TBE 0,5X, corado com brometo de etídeo e visualizado no Typhoon 9200 com excitação do laser de 532nm, com os filtros para os comprimentos de onda de 526nm, referente a fluorescência do peptídeo, e de 610nm, referente a fluorescência do brometo de etídeo, ou seja, do mononucleossomo.

#### d) Ensaio de deslocamento térmico (*Thermal shift*)

O ensaio de deslocamento térmico foi utilizado para avaliar a estabilidade de mononucleossomos na presença dos peptídeos. Neste ensaio utilizamos um corante fluorescente (SYPRO Orange) que se liga a superfícies hidrofóbicas. A fluorescência do corante é reprimida pela água. Quando proteínas são submetidas a altas temperaturas, o corante se associa às superfícies desnaturadas expostas e emite a fluorescência (Figura 40).



**Figura 40.** Esquema ilustrativo do *thermal shift* de nucleossomos. Com aumento gradual de temperatura, observamos a desnaturação do nucleossomo caracterizada pela saída dos dímeros de H2A/H2B no primeiro pico de fluorescência e o tetrâmero de H3/H4 no segundo pico (TAGUCHI et al., 2014).



Incubou-se os mononucleossomos (previamente reconstituídos *in vitro* com concentração 0,4 $\mu$ M) com os peptídeos (GMIP1 ou LANA – 70 $\mu$ M) por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se DTT (Ditiotreitol) e o corante fluorescente SYPRO Orange (Sigma Aldrich S5692 – 5000X). A reação final, volume 20 $\mu$ L, contém 0,4 $\mu$ M de mononucleossomo; 10mM Tris pH 7.4; 1,5mM EDTA; 15mM NaCl; 1mM DTT e 5X SYPRO Orange.

A seguir, realizou-se a desnaturação térmica com temperaturas de 25° a 95°C a cada minuto, sendo a fluorescência detectada a cada grau em um termociclador de PCR em tempo real (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems), utilizando-se o filtro 3 no equipamento.

**e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio**

As fibras de cromatina de 10nm, previamente reconstituídas *in vitro* (50nM), foram incubadas com veículo ou peptídeos (150 $\mu$ M) por duas horas, em temperatura ambiente. Após essa incubação, foi adicionado 3mM de magnésio por 15 minutos no gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet foi separado do sobrenadante e ressuspenso em água com o mesmo volume anterior. Para avaliação do resultado, o pellet e o sobrenadante foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

A análise de densitometria das bandas no gel foi realizada no programa ImageJ 1.49v.

**f) Visualização de GMIP1 marcado em células por microscopia de fluorescência confocal**

Para visualização das células por microscopia confocal, as placas de 24 poços receberam lamínulas redondas de vidro com 15mm de diâmetro do fundo das placas. Estas lamínulas foram previamente lavadas com HCl 1M *overnight* a 55°C e, posteriormente, enxaguadas com água destilada exaustivamente, tratadas com etanol 70% e esterilizadas com exposição à luz UV por duas horas.

Foram plaqueadas 200.000 células Hela sobre as lamínulas na placa. As células foram mantidas em meio de cultura (DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco-

contendo 10% de soro bovino fetal e antibióticos Penicilina – 100U/mL Estreptomcina - 100µg/mL) em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para melhor aderência.

Após esse período, retirou-se o meio de cultura e tratou-se as células com GMIP-TAMRA ou veículo por 24 horas nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1µM. Após o tempo de tratamento, as amostras foram lavadas em PBS 1X por três vezes (cinco minutos cada) e fixadas com formaldeído 3,7% em PBS por 10 minutos. Após a fixação, as amostras foram lavadas em PBS 1X por três vezes (cinco minutos cada) e incubadas com DAPI (300ng/mL) por cinco minutos para marcação do núcleo. Finalmente, as amostras receberam mais três etapas de lavagem com PBS 1X e as lâminulas foram então retiradas e montadas sobre lâminas de vidro. As lâminas foram visualizadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS SP5 (Leica) localizado o Instituto de Biologia da UnB.

- Determinação do mecanismo de entrada de GMIP1

Para verificar o mecanismo de entrada de GMIP1 por endocitose, realizou-se duplo plaqueamento das células (Hela e Raw 264.7) conforme descrito acima. Após as 24 horas de aderência, os poços foram lavados duas vezes em meio sem soro e mantidas em PBS 1X pré-aquecido a 37°C por 15 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>.

Uma das placas foi retirada e mantida fora da estufa por 10 minutos a 4°C. Após esse período, tratou-se ambas as placas (37°C e 4°C) com 1µM de GMIP1-TAMRA ou veículo por diferentes tempos: 5, 15, 30 e 60 minutos. Após cada período de tratamento as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 1 hora. A seguir realizou-se as mesmas etapas descritas anteriormente até a montagem das lâminas.

#### **g) Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

Para avaliar o efeito do peptídeo em células, realizou-se o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O sal de brometo MTT contém o anel de tetrazólio, que é clivado por enzimas presentes nas mitocôndrias das células viáveis, formando cristais de formazam, de coloração azul. Essa coloração é mensurada pela leitura da absorbância no comprimento de onda 570nm. Portanto, a quantidade de células viáveis é proporcional aos cristais formados.

Os ensaios foram realizados em duplicata e a quantidade de células semeadas (repetidos seis vezes) em placa de 96 poços foram:

- Células Hela: 4.000 células/poço;
- Células C3H10T1/2: 3.000 células/poço;
- Células CCD1059: 5.000 células/poço;
- Células Raw 264.7: 6.000 células/poço.

Os tratamentos com peptídeos ou veículo (Tris 10mM pH 7.4) foram adicionados junto ao meio de cultura (DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco contendo 10% de soro bovino fetal e antibióticos Penicilina – 100U/mL Estreptomcina - 100µg/mL) em diferentes concentrações: 1, 50 e 100µM, por 48h. As células foram mantidas em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as 48h, o meio foi aspirado e então as células foram incubadas com 50µL de meio DMEM, contendo 1mg/mL de MTT (dissolvido em PBS 1X), por quatro horas na incubadora. Passadas as quatro horas, a dissolução dos cristais foi realizada, acrescentando-se 150µL de álcool isopropílico acidificado (0,04M de HCl em álcool isopropílico). Manteve-se as placas em agitação constante por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após a completa dissolução e homogeneização dos cristais, foi realizada a leitura de absorbância em 570nm em um leitor de placas Beckman Coulter DTX800.

A interpretação dos resultados foi feita comparando-se as absorbâncias das células não tratadas àquelas que receberam tratamento. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5.0, utilizando-se o teste one way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni.

#### **h) Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$ em cultura de células induzida por LPS**

As células Raw 264.7 foram semeadas (250.000 células/poço), em triplicata, em placa de seis poços, contendo meio DMEM (adicionado de 10% de soro bovino fetal e antibióticos) e LPS 1µg/mL ou veículo (PBS 1X). O LPS estimula a inflamação devido a sua ligação à receptores de membrana, como o CD14 nos macrófagos, o que promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$ .

As células foram mantidas na incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após três horas, as células foram tratadas com peptídeos (GMIP1 e LANA- 1, 10 e 50µM) ou veículo (Tris 10mM pH 7.4) por 24 horas e mantidas nas mesmas condições anteriores. A expressão do gene que codifica o TNFα foi avaliada por meio da extração do RNA total seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-PCRq) realizada em triplicata.

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol (Life Technologies – n. 15596-018), seguindo protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA foi tratado com 1u/µL de DNase I (Sigma Aldrich) por 15 minutos, para eliminar possíveis contaminações por DNA genômico. A reação foi estancada com a adição do tampão de inativação contendo EDTA (50mM).

A quantificação e pureza do RNA extraído foi avaliada por espectrometria, utilizando o NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences), pela medida da absorbância em 260 e 280nm. Razões entre 260/280nm de 1,7 a 2,2 foram consideradas adequadas. A integridade do RNA foi avaliada (subunidades 18S e 28S) por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) corado com brometo de etídeo.

Os *primers* utilizados que codificam TNFα e subunidade 18S (gene constitutivo) foram obtidos da IDT (Integrated DNA Technologies) e validados previamente pela prof. Dra. Michella Coelho, apresentando eficiência entre 100 e 105%. A transcrição reversa (RT) e a amplificação por PCR quantitativa (PCRq) foram realizadas em um único passo utilizando-se o kit Power SYBR® Green RNAt0-CT 1-Step (Applied Biosystems, Foster City), seguindo as instruções do fabricante. Todos os experimentos de RT-PCRq foram realizados no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems e os dados obtidos foram analisados com o programa Software StepOne v2.1.

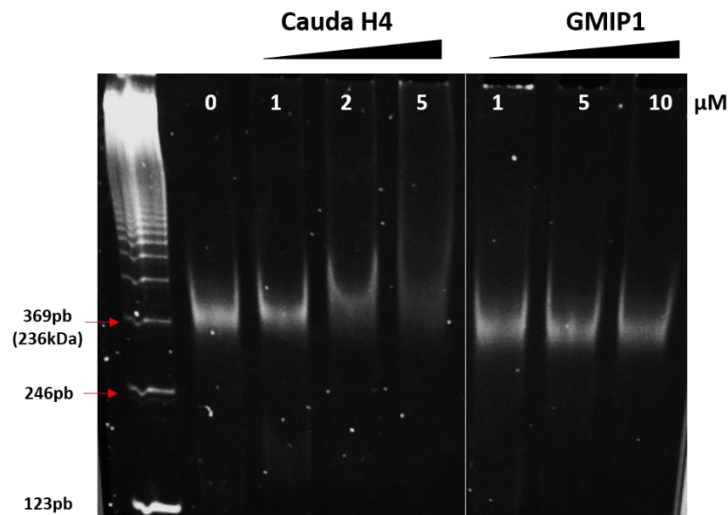
## 4. Resultados

### a) GMIP1 se liga ao mononucleossomo *in vitro*

Para determinar a afinidade de ligação do GMIP1 ao mononucleossomo foram realizados ensaios de ligação com mononucleossomos reconstituídos *in vitro*.

Primeiramente, o mononucleossomo foi incubado com concentrações crescentes de GMIP1 e peptídeo da cauda da H4 (controle), conforme descrito no “Materiais e Métodos - seção c) Ensaio de ligação de peptídeos a mononucleossomos reconstituídos *in vitro*” (Página 78).

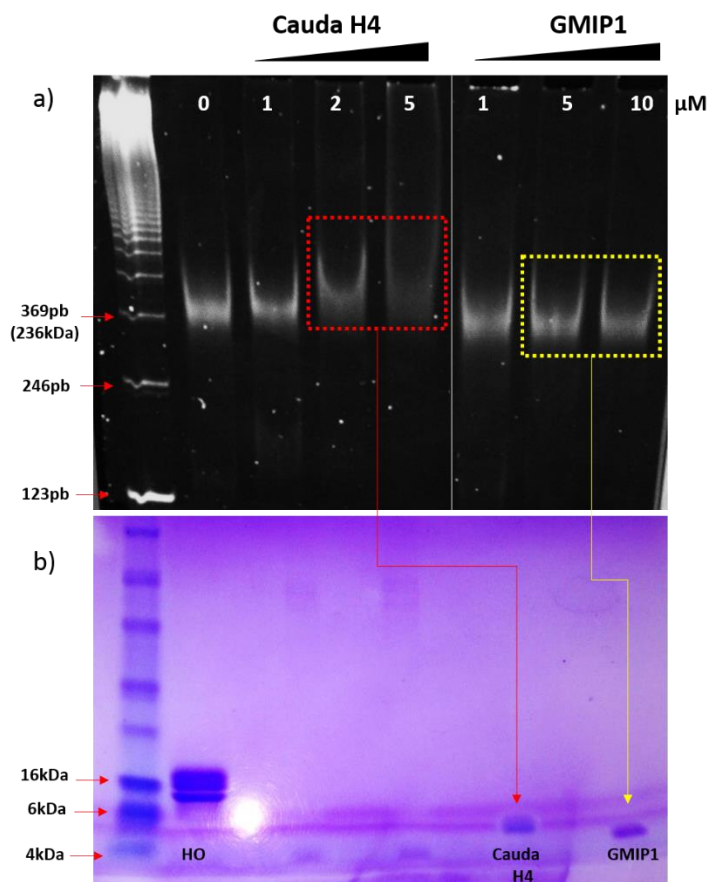
Para observação de um possível deslocamento de bandas, as amostras foram submetidas à migração eletroforética em gel de acrilamida 8%. No entanto, levando em conta o pequeno tamanho do peptídeo (~2 kDa), a mudança de migração eletroforética do complexo peptídeo:mononucleossomo em relação ao controle é muito sutil (Figura 41). Esse deslocamento pode ser observado claramente com o peptídeo da cauda da histona H4 (2 $\mu$ M), o qual foi utilizado como controle positivo, o que sugere uma maior afinidade deste peptídeo pelo mononucleossomo.



**Figura 41.**Ensaio de ligação de GMIP1 e cauda da H4 ao mononucleossomo. Arranjo: 167.1. Gel de acrilamida 8% corado com brometo de etídeo. Gel representativo de três experimentos realizados de forma independente. Observamos no gel uma mudança de migração eletroforética a partir de 2 $\mu$ M com a cauda da histona H4, servindo como controle positivo. Não é possível observar o deslocamento da migração com GMIP1.

Devido à dificuldade em observar o *shift*, realizamos novos ensaios de ligação e posteriormente recortamos as bandas do gel e as purificamos para visualização em gel

desnaturante, conforme descrito no “Materiais e Métodos- seção c) Ensaio de ligação de peptídeos a mononucleossomos reconstituídos *in vitro*” (Página 78) (Figura 42).



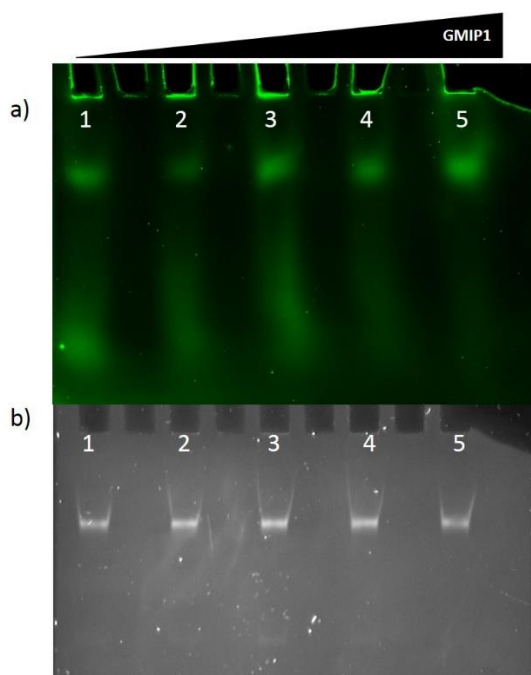
**Figura 42. Ensaio de ligação dos peptídeos ao mononucleossomo.** a) Arranjo: 167.1. Gel de acrilamida 8% corado com brometo de etídeo, destacando as bandas que foram excisadas do gel para posterior eluição e desnaturação. b) Gel desnaturante de acrilamida 14% corado com Comassie Blue. Observamos o controle positivo na primeira raia (HO estoque concentrado), e nas últimas raias as bandas referentes aos peptídeos, demonstrando a existência da formação do complexo NCP:peptídeos.

Observamos na Figura 42b, as bandas dos dois peptídeos no gel, indicando que estes se ligaram ao mononucleossomo. Não foi possível observar as bandas referentes ao octâmero de histonas nas raias do complexo (NCP:Peptídeo). Acreditamos que isso se deve ao fato de a concentração final de HO ser baixa e, ainda, agravada pela baixa especificidade do corante em relação as histonas, uma vez que o corante utilizado (Comassie blue) possui alta afinidade por resíduos de aminoácidos, que contém anéis aromáticos, grupos raros nas histonas.

Para reforçar nossos achados, GMIP1 e cauda da H4 foram marcados com um fluoróforo (Dylight), conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção c) Ensaio de ligação de peptídeos a mononucleossomos reconstituídos *in vitro*” (Página 78), e incubados com o mononucleossomo. A Figura 43 mostra o mesmo gel através da

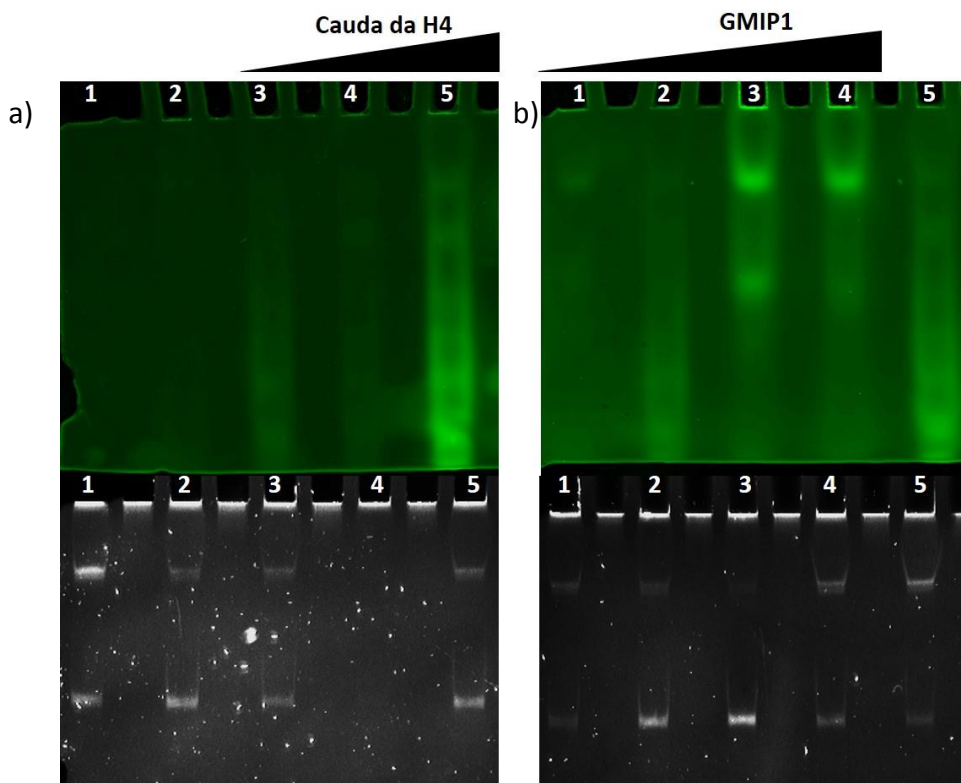
excitação com o laser de 532nm, utilizando dois filtros de emissão diferentes: a) 526nm, para visualização do peptídeo fluorescente; b) 610nm, para visualização do brometo de etídeo, o qual indica o mononucleossomo formado.

Observamos a ligação do peptídeo ao nucleossomo indicado pela banda fluorescente no mesmo local da banda relativa ao mononucleossomo, corado com brometo. Podemos observar, ainda, o aumento gradual da intensidade da fluorescência relativa a ligação ao mononucleossomo com a titulação do peptídeo, e a concomitante diminuição da intensidade da banda relativa a ligação do peptídeo ao DNA livre.



**Figura 43. Ligação de GMIP1 fluorescente ao mononucleossomo.** Gel de acrilamida 8% visualizado pela pelo filtro de comprimento de onda 526nm, relativo ao peptídeo fluorescente. Raias 1-5: adição de concentrações crescentes de GMIP1 marcado, sendo 1= 7 $\mu$ M; 2= 8 $\mu$ M; 3= 10 $\mu$ M; 4= 11 $\mu$ M; 5= 12 $\mu$ M. b) Gel de acrilamida 8%, corado com brometo de etídeo e visualizado pelo filtro de emissão de comprimento de onda 610nm, relativo ao brometo de etídeo ligado ao DNA, sugerindo indiretamente o mononucleossomo formado.

Além disso, realizamos um teste adicionando à reação peptídeo não marcado (frio), o que comprovou a especificidade de ligação ao mononucleossomo (Figura 44b, raia 5). Observamos novamente a ligação do peptídeo ao nucleossomo, comprovada pela fluorescência no mesmo local onde é vista a banda com brometo de etídeo. Quando foi adicionado o peptídeo não marcado, a intensidade da fluorescência da banda, referente à ligação ao mononucleossomo, diminui de forma significativa. Ao mesmo tempo, a banda referente a ligação do peptídeo ao DNA livre aumenta, indicando o deslocamento de parte dos peptídeos marcados do sítio de ligação no mononucleossomo.



**Figura 44. Especificidade de ligação de GMIP1 ao nucleossomo.** a) Gel de acrilamida 8% visualizado pelo filtro de emissão do comprimento de onda 526nm, referente ao peptídeo fluorescente acima e pelo filtro de comprimento de onda 610nm, referente ao brometo de etídeo ligado ao DNA, sugerindo o mononucleossomo formado, no gel de baixo. Raia 1: mononucleossomo. Raia 2: controle negativo, no qual foi incubado somente a fluorescência com mononucleossomo. Raias 3-5: adição de concentrações crescentes de cauda da H4, sendo raia 3: 5 $\mu$ M; raia 4: 10 $\mu$ M e raia 5: 20 $\mu$ M; b) Gel de acrilamida 8% visualizado pelo filtro de emissão do comprimento de onda 526nm, referente ao peptídeo fluorescente acima e filtro de comprimento de onda 610nm, referente ao brometo de etídeo ligado ao DNA, sugerindo o mononucleossomo formado, no gel de baixo. Raias 1-4: adição de concentrações crescentes de GMIP1, sendo raia 1: 5 $\mu$ M; raia 2: 7 $\mu$ M e raia 3: 10 $\mu$ M; raia 4: 12 $\mu$ M. Raia 5: 10 $\mu$ M de GMIP1 + 10 $\mu$ M de GMIP1 frio, indicando a especificidade de ligação ao mononucleossomo.

Apesar de não obtermos uma curva dose-resposta ideal, observamos a ligação do GMIP1 ao mononucleossomo na ordem de micro molar. Vale ressaltar que a ligação de GMIP1 ao nucleossomo foi maior que a da cauda da H4, demonstrado pelas ligações inespecíficas da cauda da H4 ao DNA livre (Figura 44a, raia 4) na mesma concentração (10 $\mu$ M) em que visualizamos uma banda bem clara de ligação ao mononucleossomo (Figura 44b, raia 3).

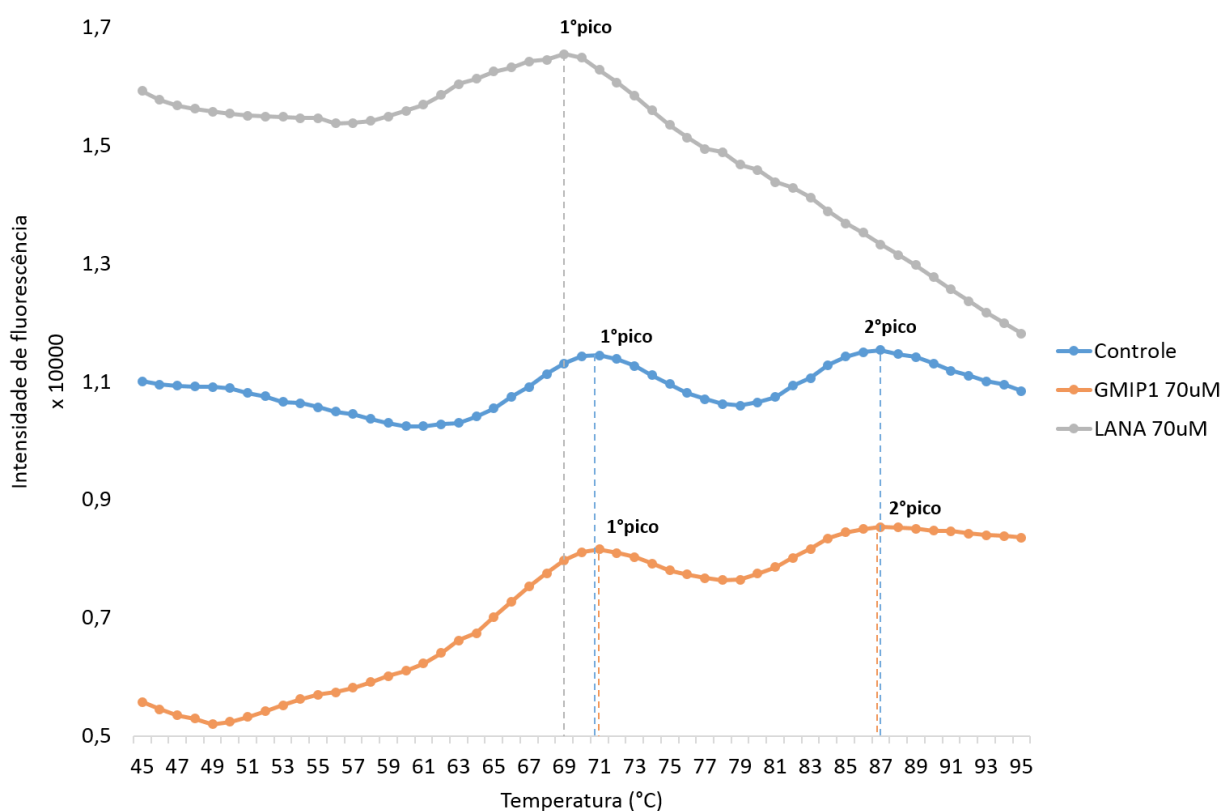
#### **b) GMIP1 não afeta a estabilidade do mononucleossomo**

Para observar se o GMIP1 afeta a estabilidade do mononucleossomo, realizamos o ensaio de deslocamento térmico (*termal shift*). O complexo



(NCP:peptídeo) foi submetido ao aumento gradual de temperatura e a fluorescência foi detectada em um termociclador de PCR em tempo real.

A figura abaixo (Figura 45) mostra os resultados obtidos. Primeiramente reproduzimos a curva obtida por Tagushi e colaboradores (2014), onde o primeiro pico em 70°C representa a dissociação do dímero de H2A/H2B no nucleossomo, e o segundo a 87°C em que o complexo é totalmente desfeito (Figura 45- linha azul).



**Figura 45. Ensaio de deslocamento térmico de mononucleossomos com peptídeos.** Legenda: mono= mononucleossomo. Curva azul referente ao controle, mononucleossomo. Curva cinza, referente ao complexo LANA:nucleossomo. Curva em laranja, referente ao complexo mononucleossomo:GMIP1.

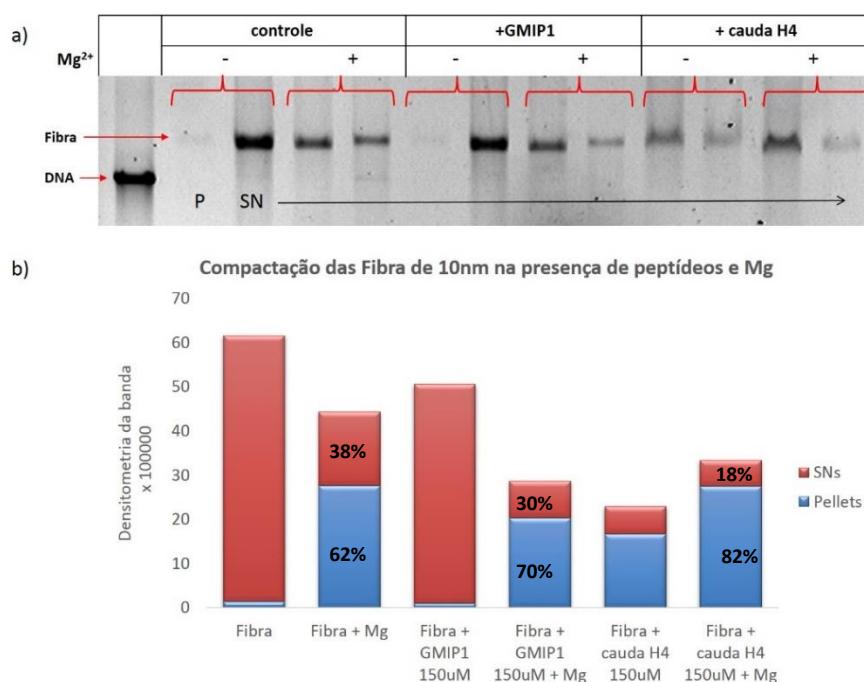
Podemos observar uma grande diferença entre a curva obtida do complexo mononucleossomo:LANA (Figura 45 – linha cinza) e mononucleossomo:GMIP1 (Figura 45 – linha laranja). A ausência do segundo pico na curva referente ao mononucleossomo:LANA indica que a desestabilização do nucleossomo aconteceu de maneira única e antecipada, sem a perda gradual dos componentes. Já o resultado obtido com o complexo mononucleossomo:GMIP1 foi semelhante ao controle, demonstrando que a ligação de GMIP1 não afeta a estabilidade do nucleossomo quando comparado ao controle, mononucleossomo na ausência de peptídeo ligante.

### c) GMIP1 auxilia a compactação de fibras de cromatina de 10nm induzidas por magnésio

Para analisar a compactação de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas *in vitro* realizamos ensaios de compactação da cromatina em presença do  $Mg^{2+}$ , conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção e) Ensaio de compactação de fibras de cromatina de 10nm induzida por magnésio” (Página 81).

Podemos observar no gel da Figura 46a que GMIP1 possui um efeito sutil sobre a compactação das fibras em relação ao controle, na ausência de peptídeo. A análise da densitometria das bandas (Figura 46b) revela que GMIP1 aumentou a proporção entre fibras compactadas (P) e relaxadas (SN), 70:30 (P:SN), quando comparado ao controle, 62:38. Isto sugere que GMIP1 tende a induzir a compactação de longas fibras de cromatina.

Surpreendentemente, o peptídeo da cauda da histona H4 (controle positivo) induziu a compactação das fibras, mesmo na ausência de magnésio (Figura 46). Essa análise corrobora os resultados anteriores, sugerindo mais uma vez que a ocupação de diferentes regiões por NBMs (*nucleosome binding molecules*), neste caso peptídeos, possuem funções distintas de modificação da arquitetura da cromatina.

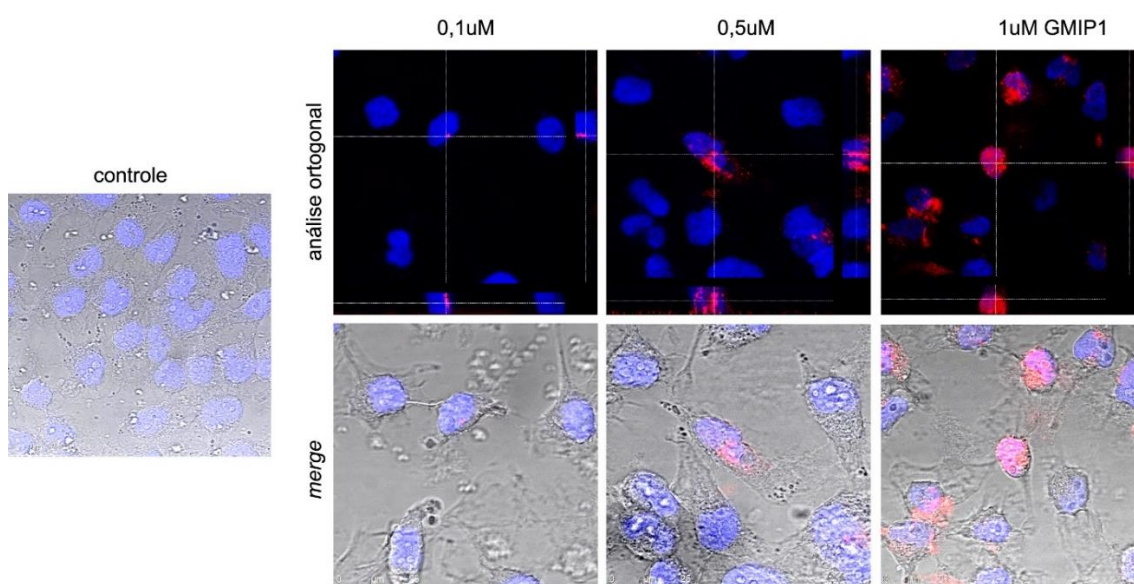


**Figura 46. Ensaio da compactação de fibras de cromatina de 10nm reconstituídas *in vitro* induzida por magnésio.** a) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Arranjo: 177.36. b) Gráfico relativo a densitometria das bandas do gel acima. Observamos que GMIP1 teve resultado semelhante ao controle, com uma leve tendência a aumentar a proporção de fibras compactadas. O peptídeo da cauda da H4 auxiliou na compactação das fibras mesmo na ausência de magnésio.

#### d) GMIP1 penetra o núcleo de células de mamífero

Após a observação de que GMIP1 se liga ao mononucleossomos *in vitro*, realizamos a incubação de células HeLa com o peptídeo fluorescente para verificar sua capacidade de penetrar as células e, possivelmente, co-localizar com o núcleo.

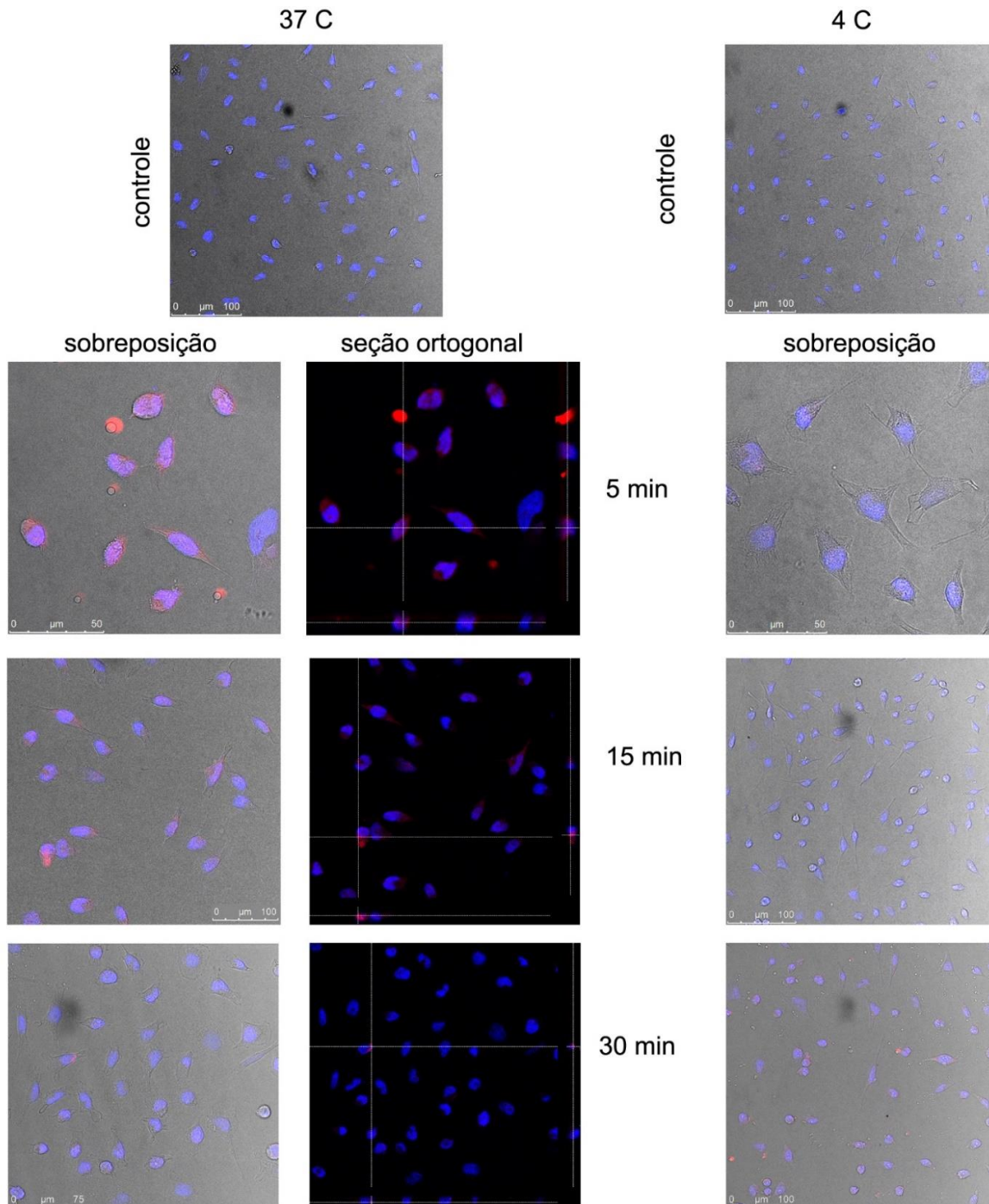
Podemos observar, na Figura 47, que após 24 horas GMIP1-TAMRA encontra-se co-localizado com o núcleo, revelado pela análise ortogonal realizada nas imagens obtidas. Observamos essa co-localização nas imagens na figura 46 na parte superior, onde são mostrados os campos do núcleo (DAPI- azul) e de GMIP1-TAMRA (vermelho) sobrepostos, com a secção ortogonal realizada em um ponto demonstrada pelo pontilhado branco. No canto direito e inferior de cada quadro apresentamos a seção ortogonal visualizada da direita para esquerda, e de baixo para cima respectivamente. Além disso, percebemos aumento gradual de peptídeos dentro do núcleo com as maiores concentrações utilizadas.



**Figura 47. GMIP1-TAMRA penetra no núcleo de células HeLa.** Células HeLa tratadas com concentrações graduais de GMIP1-TAMRA visualizadas por microscopia de fluorescência confocal. Legendas: Azul- DAPI (núcleo); Vermelho- GMIP1-TAMRA. A esquerda: controle com sobreposição de todas as fluorescências utilizadas; à direita acima: imagem obtida pela análise ortogonal com a vista do corte realizado, sendo visualizado no lado direito o corte da direita para esquerda e abaixo a seção visualizada de baixo para cima.

Com o intuito de determinar se o peptídeo entra por endocitose, realizamos um ensaio a 37° e 4°C, conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção f) Visualização de GMIP1 marcado em células por microscopia de fluorescência confocal” (Página 81), uma vez que a diminuição da temperatura interrompe esse tipo de mecanismo (PUNNONEN; RYHÄNEN; MARJOMÄKI, 1998). Podemos observar na Figura 48

que nos tempos mais curtos, 5 e 15 minutos, há uma grande quantidade de peptídeo a 37°C, tanto no citoplasma, quanto no núcleo, caracterizado pela análise ortogonal realizada. Já em temperatura baixa somente visualizamos a presença de GMIP1 com 30 minutos de tratamento.

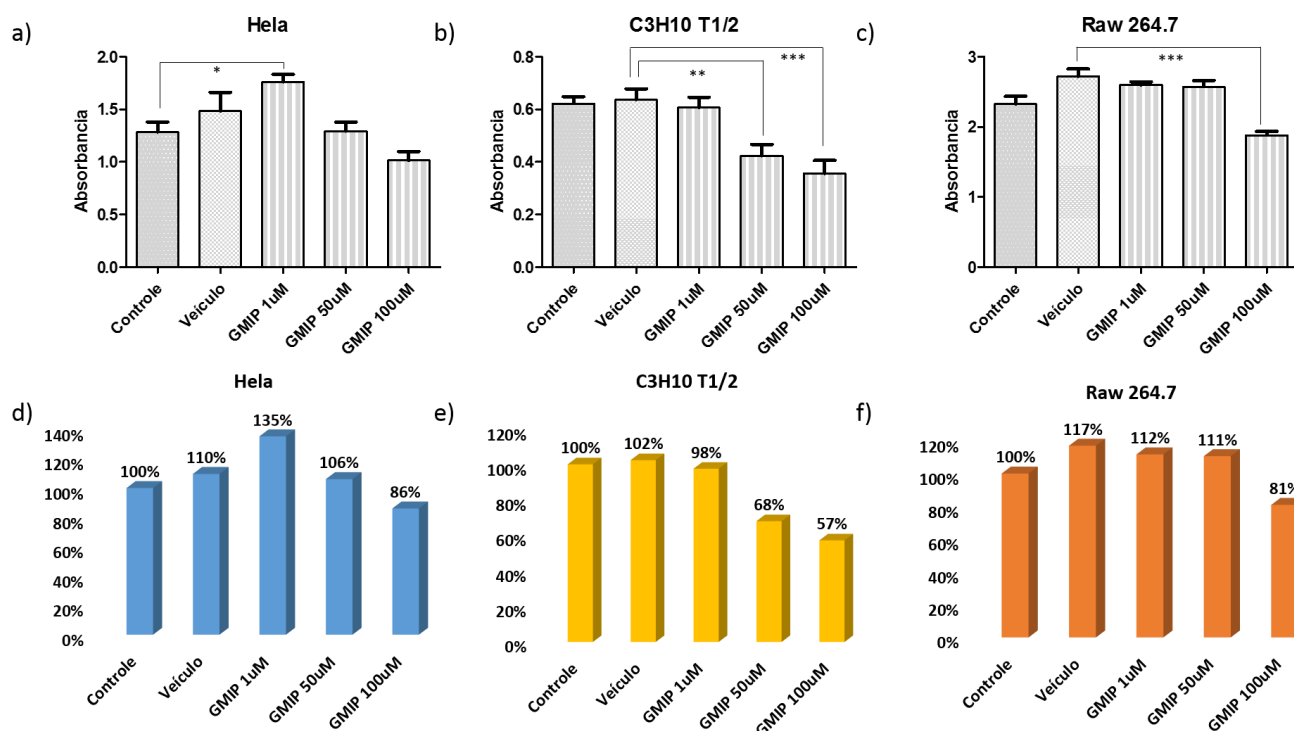


**Figura 48. Análise de células HeLa tratadas com 1µM GMIP1-TAMRA à 37°C e 4°C.** Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. À esquerda painel com células tratadas a 37°C e a direita à 4°C. Os painéis contém o controle centralizado acima e abaixo dividido em duas colunas, sendo à esquerda a sobreposição de todas as fluorescências analisadas e a direita a seção ortogonal realizada com as fluorescências relativas ao núcleo (DAPI- azul) e GMIP-TAMRA (vermelho) sobrepostas.

### e) GMIP1 diminui a viabilidade celular (MTT)

Com o objetivo de observar a ação de GMIP1 e LANA sobre a viabilidade celular em linhagens de células de mamíferos, utilizamos células humanas normais (CCD-1059) e tumorais (C3H10T1/2, e Hela) e células de camundongo tumorais (Raw 264.7). Foi realizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção g) Ensaio de viabilidade celular” (Página 82), que se baseia na quantificação de cristais de formazam, produto obtido pela redução do MTT pelas células viáveis.

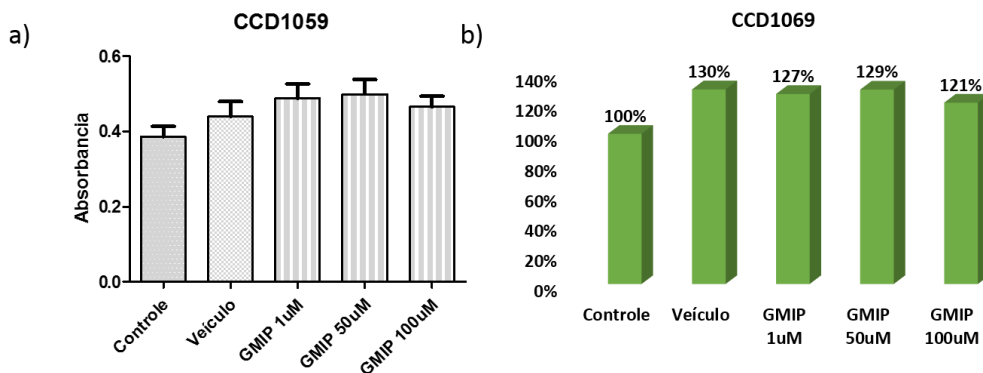
Observamos uma diminuição da proliferação celular em todas as linhagens tumorais tratadas com GMIP1, a partir de 50 $\mu$ M, conforme demonstram os gráficos abaixo (Figura 49).



**Figura 49. Ensaio de viabilidade de células tumorais tratadas com GMIP1.** a) Células Hela (linhagem de células epiteliais humano derivado de adenocarcinoma) tratadas com GMIP1; b) células C3H10T1/2 (linhagem de fibroblastos humano derivadas de sarcoma) tratadas com GMIP1; c) células Raw 264.7 (linhagem de macrófagos de camundongo derivadas de leucemia) tratadas com GMIP1; d), e), f) representação dos dados em porcentagem. Todas as linhagens foram tratadas em concentrações graduais de GMIP1 (0, 1, 50 e 100 $\mu$ M) por 48h (n=2). Os resultados apresentaram p<0,05 para a análise de variância One-way ANOVA e para pós-teste Bonferroni.

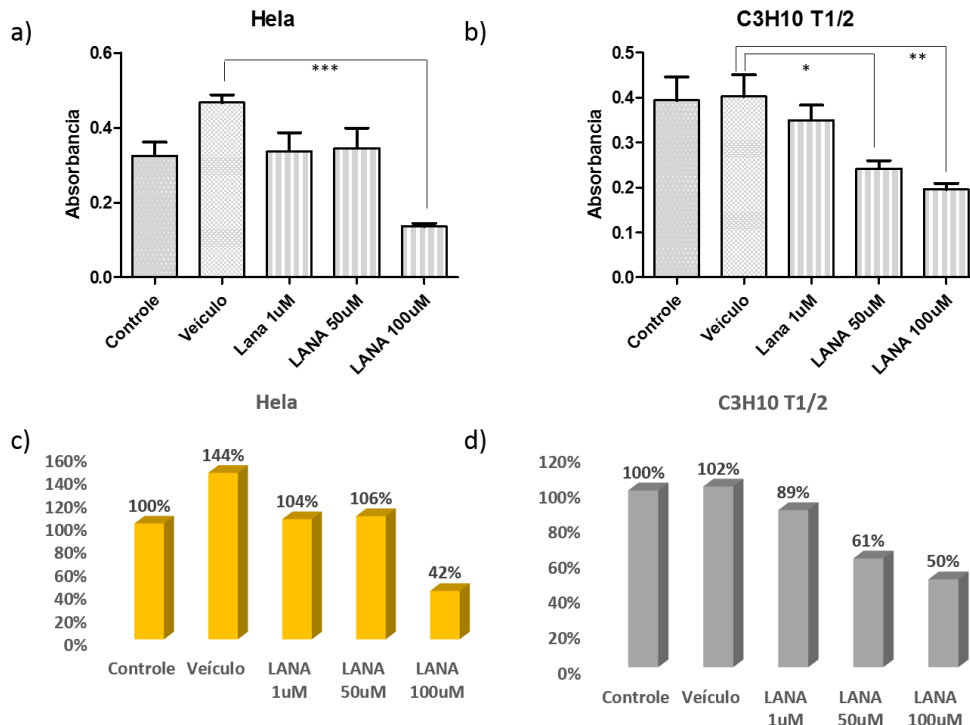
Células normais também foram tratadas com GMIP1 e, apesar de o resultado não ter apresentado significância estatística, observamos que o peptídeo teve a

tendência de aumento de viabilidade celular, ao invés de diminuição, nesse tipo de células (Figura 50).



**Figura 50. Análise de viabilidade de células normais tratadas com GMIP1.** a) Células CCD1059 (linhagem de fibroblastos humano normal); b) representação dos dados em porcentagem. As células foram tratadas em concentrações graduais de GMIP1 (0, 1, 50 e 100 $\mu$ M) por 48h (n=2). Os resultados apresentaram p=0,15 para a análise de variância One-way ANOVA.

Além disso, realizamos o tratamento de duas linhagens tumorais humanas (Hela e C3H10 T1/2) com LANA. Nota-se que obtivemos resultados semelhantes aos com GMIP1, caracterizado pela diminuição da proliferação celular a partir de 50 $\mu$ M de tratamento (Figura 51).



**Figura 51. Ensaio de viabilidade de células tratadas com LANA.** a) Células Hela (linhagem de células epiteliais humano derivado de adenocarcinoma) tratadas com LANA; b) células C3H10T1/2 (linhagem de fibroblastos humano derivadas de sarcoma) tratadas com LANA; c), d) dados em porcentagem. Todas as linhagens foram tratadas em concentrações graduais de LANA (0, 1, 50 e 100 $\mu$ M) por 48h (n=2). Os resultados apresentaram p<0,05 para a análise de variância One-way ANOVA e para pós-teste Bonferroni.

**f) GMIP1 reprime a expressão de TNF $\alpha$  em cultura de células induzidas por LPS**

Após a observação de que GMIP1 possui ação na viabilidade celular, decidimos investigar o efeito desse peptídeo e do LANA sobre a expressão do gene TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), fator envolvido na cascata inflamatória. Para isto, estimulamos a inflamação em linhagem celular de macrófagos de camundongo derivados de tumor (Raw 264.7) com LPS (lipopolissacarídeo).

As células foram tratadas primeiramente com LPS (1 $\mu$ g/ml) e posteriormente com os peptídeos ou veículo por 24 horas. O RNA total das células foi extraído e purificado conforme descrito no “Materiais e Métodos – seção h) Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$  em cultura de células induzida por LPS” (Página 83). A seguir realizou-se a PCR em tempo real.

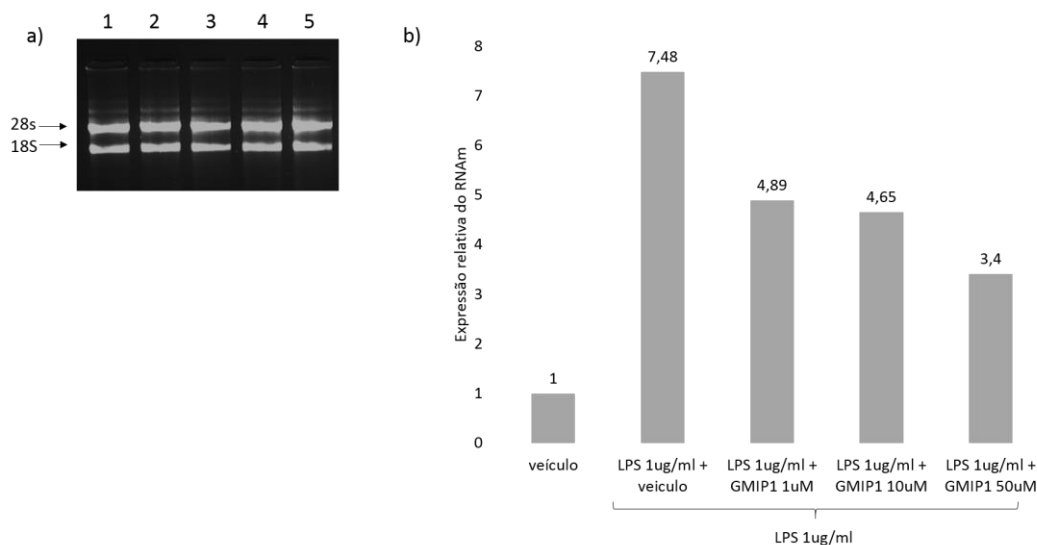
Na tabela abaixo (Tabela 4) apresentamos o resultado das triplicatas obtidas nesse experimento, demonstrando que o peptídeo não alterou a expressão do gene de referência (18S) utilizado nesse ensaio.

**Tabela 4. Dados da triplicata da expressão do RNAm do gene TNF $\alpha$  por PCR em tempo real.**

Amostra	Ct TNF $\alpha$	Ct 18S	Média TNF $\alpha$	Média 18S
veículo	21,56	10,86	22,83	10,52
veículo	23,34	9,33		
veículo	23,6	11,36		
LPS 1ug/ml + veiculo	19,55	8,67	19,87	10,46
LPS 1ug/ml + veiculo	19,21	10,57		
LPS 1ug/ml + veiculo	20,85	12,13		
LPS 1ug/ml + GMIP1 1uM	19,11	10,13	19,95	9,92
LPS 1ug/ml + GMIP1 1uM	20,92	10,05		
LPS 1ug/ml + GMIP1 1uM	19,81	9,58		
LPS 1ug/ml + GMIP1 10uM	19,51	8,87	20,33	10,23
LPS 1ug/ml + GMIP1 10uM	21,96	10,37		
LPS 1ug/ml + GMIP1 10uM	19,51	11,44		
LPS 1ug/ml + GMIP1 50uM	20,48	10,58	20,95	10,40
LPS 1ug/ml + GMIP1 50uM	21,5	10,51		
LPS 1ug/ml + GMIP1 50uM	20,86	10,1		

A Figura 52 mostra o gráfico da expressão gênica obtida para curva dose-resposta com GMIP1, a partir da média obtida pelas triplicatas realizadas. Observamos que o estímulo com LPS aumentou mais de sete vezes a expressão gênica do TNF $\alpha$ . O tratamento com GMIP1 reverteu gradualmente a expressão do gene analisado, sendo

observado uma redução de 45%, em relação ao estimulado, na maior concentração utilizada (50 $\mu$ M).



**Figura 52. Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$  em células induzidas com LPS e tratadas com GMIP1 por PCR em tempo real.** a) Integridade do RNA extraído das células Células Raw 264.7. Legenda: 1: RNA de células controle; 2: RNA de células estimuladas com LPS 1 $\mu$ g/mL e tratadas com veículo; 3-5 RNA de células estimuladas com LPS 1 $\mu$ g/mL e tratadas com GMIP1 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M, respectivamente; b) Gráfico da expressão relativa do RNAm das células Raw 264.7 tratadas com 1 $\mu$ g/ml de LPS e posteriormente com veículo ou GMIP1 em concentrações crescentes (1, 10 e 50 $\mu$ M) por 48 horas.

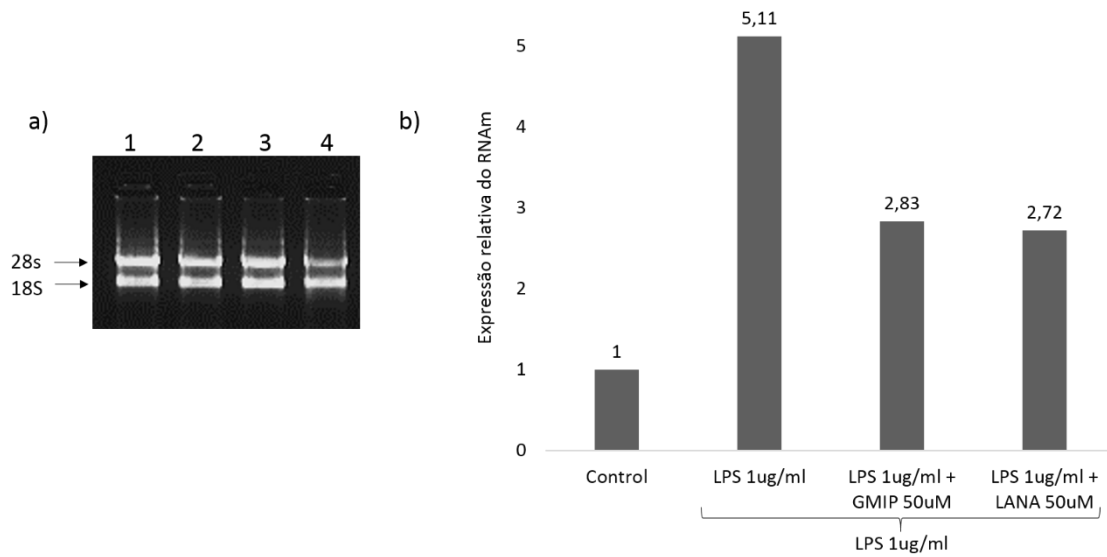
Avaliamos também a expressão gênica de TNF $\alpha$ , frente ao tratamento com LANA e GMIP utilizando as mesmas concentrações (50 $\mu$ M) (Tabela 5).

**Tabela 5. Dados da triplicata da expressão do RNAm do gene TNF $\alpha$  por PCR em tempo real 2.**

Amostra	Ct TNF $\alpha$	Ct 18S	Média TNF $\alpha$	Média 18S
Veículo	24,93	11,57	24,96	11,45
Veículo	24,98	11,32		
Veículo	24,96	11,45		
LPS 1 $\mu$ g/ml + veículo	23,67	12,51	23,54	12,38
LPS 1 $\mu$ g/ml + veículo	23,44	12,29		
LPS 1 $\mu$ g/ml + veículo	23,5	12,34		
LPS 1 $\mu$ g/ml + GMIP 50 $\mu$ M	23,54	11,47	23,48	11,44
LPS 1 $\mu$ g/ml + GMIP 50 $\mu$ M	23,34	11,4		
LPS 1 $\mu$ g/ml + GMIP 50 $\mu$ M	23,55	11,45		
LPS 1 $\mu$ g/ml + LANA 50 $\mu$ M	23,47	11,27	23,34	11,28
LPS 1 $\mu$ g/ml + LANA 50 $\mu$ M	23,2	11,27		
LPS 1 $\mu$ g/ml + LANA 50 $\mu$ M	23,35	11,3		

Observamos uma forte inibição da expressão de TNF $\alpha$  estimulado por LPS, apresentando uma redução em torno de 50% para ambos os peptídeos (Figura 53).





**Figura 53. Análise da expressão gênica de TNF $\alpha$  em células induzidas com LPS e tratadas com GMIP1 e LANA por PCR em tempo real.** a) Integridade do RNA extraído das células. Legenda: 1: RNA de células controle; 2: RNA de células estimuladas com LPS 1 $\mu$ g/mL e tratadas com veículo; 3: RNA de células estimuladas com LPS 1 $\mu$ g/mL e tratadas com GMIP1 50 $\mu$ M; 4: RNA Células Raw 264.7 estimuladas com 1 $\mu$ g/ml de LPS e tratadas com LANA 50 $\mu$ M por 48 horas; b) Gráfico da expressão relativa do RNAm das células Raw 264.7 tratadas com 1 $\mu$ g/ml de LPS e posteriormente com os peptídeos (GMIP1 e LANA) 50 $\mu$ M por 48 horas.

## 5. Discussão e conclusão

A interação de proteínas/peptídeos com o nucleossomo destaca a importância de múltiplas interações na ligação com o nucleossomo. As publicações relativas aos complexos NCP:NBM demonstram que o motivo de argininas, que tem como alvo o *patch* ácido, é um fator comum. Apesar disso, a interação com outras regiões, como o DNA por exemplo, é um fator que pode aumentar a especificidade e resultar em um desfecho específico da estrutura da cromatina.

O GMIP1, primeiro peptídeo testado pelo grupo do professor Guilherme Santos, foi desenhado *in silico*, baseado na estrutura do complexo NCP:RCC1, justamente por possuir interações também com o DNA. Observamos que esse peptídeo apresentou consideráveis efeitos sobre as fibras de cromatina e mononucleossomos reconstituídos *in vitro*. Além disto, GMIP1 e LANA possuem uma forte ação sobre a viabilidade celular, com uma ação inibitória da expressão de um gene chave para a cascata inflamatória, TNF $\alpha$ .

Primeiramente, demonstramos os ensaios *in vitro*. Mostramos a ligação de GMIP1 ao nucleossomo por meio do ensaio de migração eletroforética e peptídeo marcado com fluorescência, comprovando que a construção realizada *in silico* foi bem-sucedida. Observamos uma maior afinidade de GMIP1 pelo nucleossomo quando comparado ao canônico cauda da H4. Destaca-se que GMIP1 possui um segundo sítio de ligação ao DNA, o que pode explicar esse fenômeno.

De maneira interessante, GMIP1 teve menor afinidade pelo DNA livre quando comparado à cauda da H4 (Figura 44). Olhando a sequência primária dos peptídeos nota-se que a cauda da H4 possui o dobro de resíduos de aminoácidos positivos em comparação à GMIP1, o que pode ter gerado a maior afinidade pelo DNA livre, o qual possui forte carga negativa.

Ainda em ensaios *in vitro*, o deslocamento térmico (*thermal shift*), demonstrou a diferença de estabilidade provocada no nucleossomo pelo peptídeo LANA e GMIP1. Observamos que o LANA desestabiliza o nucleossomo de forma abrupta e antecipada, comparado ao controle e com GMIP1, o que demonstra que GMIP1 não altera a estabilidade do nucleossomo com a concentração utilizada (70 $\mu$ M) (Figura 45).

Ao compararmos as interações, já descritas, entre LANA e RCC1 com o nucleossomo, além do sítio no DNA, percebemos que a principal diferença está nas interações com o *pocket* hidrofóbico formado pelos resíduos de aminoácidos Y50, V54 e Y57 da H2A (Tabela 3), onde o LANA insere dois resíduos de aminoácidos. Apesar desse sítio não ser carregado negativamente, como o restante do *patch* ácido, sugerimos, dessa forma, que ele é crucial para estabilidade do nucleossomo. Esse achado é de grande importância para a compreensão do impacto de NBMs sobre o nucleossomo. Novos ensaios de *thermal shift* com outros peptídeos, baseado no mapa de interação dos NBPs (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015), já estão sendo realizados pelo grupo do professor Guilherme Santos e corroboram esse resultado.

Os ensaios de indução para a compactação de fibras de 10nm por  $Mg^{2+}$  mostraram que GMIP1 auxilia na compactação das fibras de 10nm reconstituídas *in vitro*. Demonstrou-se também que o peptídeo cauda da histona H4 induziu fortemente a compactação, mesmo na ausência de magnésio, o que não aconteceu com as fibras incubadas com GMIP1 (Figura 46).

Sabe-se que a neutralização da carga negativa do *patch* ácido diminui a repulsão entre os nucleossomos, fazendo com que eles se aproximem (CHODAPARAMBIL et al., 2007). Portanto, sugerimos que o peptídeo cauda da H4 neutralizou essa carga negativa, induzindo a compactação, enquanto o peptídeo GMIP1 não atuou do mesmo modo. Analisando as diferenças das interações, descritas na literatura, realizadas pela cauda da H4 e RCC1 (proteína base para construção de GMIP1), nota-se que a cauda da H4 insere dois resíduos de aminoácidos no *pocket* hidrofóbico e possui duas argininas que interagem com o ácido glutâmico (E110) da histona H2B (Tabela 3). Essas evidências sugerem a importância desses resíduos para a compactação e corroboram o resultado anterior de que o modo de ligação entre os peptídeos é diferente, conduzindo, portanto, a um diferente desfecho estrutural.

Num segundo momento, nos experimentos realizados com células, observamos que GMIP1 é capaz de penetrar as células analisadas (HeLa), inclusive o núcleo celular, mesmo na menor concentração (1 $\mu$ M). Já o ensaio realizado em diferentes temperaturas, demonstrou a presença do peptídeo dentro das células a 4°C, somente após 30 minutos, indicando que, em sua grande maioria, o peptídeo penetra as células por endocitose, mas parte pode ocorrer por translocação.

A translocação direta envolve a desestabilização da membrana plasmática de uma forma independente da energia e da temperatura. Entretanto, enquanto a endocitose é inibida a 4°C, a translocação direta diminui a dinâmica e a fluidez da membrana, podendo explicar a visualização do peptídeo após os 30 minutos de tratamento (BECHARA; SAGAN, 2013).

Ademais, estudo publicado em 2009 (JIAO et al., 2009) demonstrou que CPPs (*Cell Penetrating Peptides*) utilizam tanto a endocitose quanto a translocação para penetrar nas células, sendo que o equilíbrio entre as duas vias depende fortemente da sequência (e não diretamente do número de cargas positivas), da concentração peptídica extracelular e dos componentes da superfície celular carregados negativamente. Para confirmação, será interessante realizar novas análises utilizando, por exemplo, inibidores específicos de proteínas determinantes para endocitose, como a clatrina.

Além da visualização de GMIP1 nas células, observamos que ambos os peptídeos utilizados (GMIP1 e LANA) diminuíram a viabilidade de células tumorais. Este mesmo fato não ocorreu quando tratamos uma linhagem de células normais humanas com GMIP1 nas mesmas concentrações (Figura 50). Esse resultado é promissor, pois o GMIP1 parece alterar o metabolismo somente nas células tumorais. Contudo, novas análises de viabilidade com outras linhagens celulares normais devem ser realizadas para confirmação desse achado.

As características do metabolismo de células tumorais foram descritas no início dos anos 90 por muito pesquisadores, os quais demonstraram que as alterações no metabolismo são críticas para a sobrevivência, proliferação e potencial metastático das células tumorais (FRITZ; FAJAS, 2010). Múltiplos mecanismos moleculares estão envolvidos na tumorigênese, sendo que alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são considerados essenciais para esse processo (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Portanto, explicar como os peptídeos utilizados nesse trabalho afetam o metabolismo dessas células é uma tarefa complicada.

Tendo em vista que a transcrição de diversos genes está aumentada nessas células, supomos que os peptídeos utilizados (GMIP1 e LANA) podem ter acesso à determinadas regiões expostas da cromatina e assim alterar o metabolismo celular.

Ainda em ensaios realizados em células, a análise da expressão gênica de TNF $\alpha$  revelou que GMIP1 e LANA reduziram drasticamente a expressão desse gene

nas células utilizadas (Raw 264.7), o que indica que esses peptídeos podem possuir ação anti-inflamatória. Apesar de o fenômeno ter sido demonstrado, é interessante realizar novos ensaios para analisar a expressão de outros genes envolvidos na cascata inflamatória, como a IL-6 e NF- $\kappa$ B por exemplo.

Ademais, seria importante proceder análises da expressão de genes relacionados ao câncer, como o p53, por exemplo, um gene supressor de tumor (SAHA; KAR; SA, 2015). Estudos revelaram que a atividade transcricional de p53 no contexto da cromatina requer o recrutamento de remodeladores para genes-alvo, sendo a acetilação das caudas das histonas um fator determinante para esse processo (AN; KIM; ROEDER, 2004; ESPINOSA; EMERSON, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que peptídeos derivados da cauda da histona H4 foram capazes de estabelecer e manter o estado ativo dos genes-alvo de p53 (HEO et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o tratamento de linhagens de células de cancro e modelos de xenoenxerto com os peptídeos derivados da cauda da H4 acetilados, gerou um declínio acentuado no crescimento de células tumorais (HEO et al., 2013).

Finalmente, os pesquisadores sugerem uma caracterização mais ampla de propriedades comuns a peptídeos miméticos derivados de outras caudas de histonas, com ou sem PTMs e, ainda, que a capacidade de ligação a fatores da cromatina específicos serão uma ferramenta útil na modulação de eventos de transcrição celular (HEO et al., 2013).

Diante disso e dos resultados apresentados nesse trabalho, acreditamos que a modulação da cromatina por moléculas exógenas ligantes de nucleossomo possa ser um mecanismo valioso do ponto de vista farmacológico, podendo visar a regulação de várias desordens celulares. Tendo em mente que as proteínas e enzimas que se associam à cromatina frequentemente reconhecem a superfície do nucleossomo por múltiplos sítios, enfatizamos a importância de se estudar o nucleossomo como um todo, e não isoladamente as histonas e partes do DNA.

## 6. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. et al. The Lipid Bilayer. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3. ed. New York: Science, Garland, 1994.

ALBI, E.; MAGNI, M. V. The presence and the role of chromatin cholesterol in rat liver regeneration. **Journal of hepatology**, v. 36, n. 3, p. 395–400, mar. 2002.

ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470–475, 1974.

AN, W.; KIM, J.; ROEDER, R. G. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 735–748, 2004.

ARMACHE, K.-J. et al. Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6058, p. 977–82, 18 nov. 2011.

ASKJAER, P. et al. Ran GTPase Cycle and Importins a and b Are Essential for Spindle Formation and Nuclear Envelope Assembly in Living *Caenorhabditis elegans* Embryos. **Molecular biology of the cell**, v. 13, p. 4355–4370, 2002.

BARBERA, A. J. et al. The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5762, p. 856–61, 10 fev. 2006.

BEAUCHEMIN, C. et al. Assay Development and High-Throughput Screening for Inhibitors of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus N-Terminal Latency-Associated Nuclear Antigen Binding to Nucleosomes. **Journal of biomolecular screening**, v. 19, n. 6, p. 947–958, 11 mar. 2014.

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

BINTU, L. et al. Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 738–49, 9 nov. 2012.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331–40, 2 maio 1997.

BUCHBERGER, J. R. et al. Sir3-nucleosome interactions in spreading of silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 22, p. 6903–18, 2008.

BURGER, K.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of receptor function by cholesterol. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 57, n. 11, p. 1577–92, out. 2000.

- CAIRNS, R.; HARRIS, I.; MAK, T. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.
- CARRIERE, V. 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**, v. 104, n. 1, p. 282–287, 2007.
- CHANG, Y. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5192, p. 1865–9, 1994.
- CHODAPARAMBIL, J. V et al. A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. **Nature structural biology**, v. 14, n. 11, p. 1105–1107, 2007.
- CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 273–304, jan. 2009.
- CODINI, M. et al. Why high cholesterol levels help hematological malignancies: role of nuclear lipid microdomains. **Lipids in Health and Disease**, p. 2–9, 2016.
- COOPER, R. A. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. **Journal of Supramolecular Structure**, v. 8, n. 4, p. 413–430, 1978.
- CREA, F. et al. Polycomb genes and cancer: Time for clinical application? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 83, n. 2, p. 184–193, 2012.
- DAVEY, C. A et al. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 319, n. 5, p. 1097–1113, 21 jul. 2002.
- DORIGO, B. et al. Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 1, p. 85–96, mar. 2003.
- DRAIZEN, E. J. et al. HistoneDB 2.0: a histone database with variants—an integrated resource to explore histones and their variants. **Database**, v. 2016, 2016.
- EARNSHAW, W. C.; RATRIE, H.; STETTEN, G. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. **Chromosoma**, v. 98, n. 1, p. 1–12, 1989.
- ENDO, M. et al. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. **PLoS genetics**, v. 8, n. 7, p. e1002774, jan. 2012.
- ESPINOSA, J. M.; EMERSON, B. M. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. **Molecular Cell**, v. 8, n. 1, p. 57–69, 2001.

FERNANDES, V. A. **Ação do colesterol sobre a arquitetura da cromatina: docking molecular do colesterol no nucleossomo.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.

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, jun. 1976.

FRIBORG, J. et al. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. **Nature**, v. 402, n. 6764, p. 889–894, 1999.

FRITZ, V.; FAJAS, L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 31, p. 4369–77, 2010.

GAFFNEY, D. J. et al. Controls of nucleosome positioning in the human genome. **PLoS genetics**, v. 8, n. 11, p. e1003036, jan. 2012.

GAHAN, P. B. et al. Cytochemical evidence for the presence of phospholipids on human chromosomes. **The Histochemical Journal**, v. 6, n. 2, p. 219–222, 1974.

GEORGEL, P. T. et al. Sir3-dependent assembly of supramolecular chromatin structures in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8584–9, 2001.

GOLDSTEIN, J. L.; DEBOSE-BOYD, R. A.; BROWN, M. S. Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 35–36, 2006.

GRANT, P. A. et al. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: Characterization of an ada complex and the saga (spt/ada) complex. **Genes and Development**, v. 11, n. 13, p. 1640–1650, 1997.

GREWAL, S. I. S.; ELGIN, S. C. R. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 399–406, 2007.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 8, p. 779–804, dez. 1992.

HENRY, K. W. et al. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. **Genes and Development**, v. 17, n. 21, p. 2648–2663, 2003.

HEO, K. et al. Cell-penetrating H4 tail peptides potentiate p53-mediated transactivation via inhibition of G9a and HDAC1. **Oncogene**, v. 32, n. 20, p. 2510–20, 16 maio 2013.

HSU, T. C. Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 27, p. 332–334, 1962.

HU, J.; GARBER, A. C.; RENNE, R. The Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Supports Latent DNA Replication in Dividing Cells. **Journal of virology**, v. 76, n. 22, p. 11677–11687, 2002.



- 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, n. 5, p. 957–968, 4 fev. 2005.
- JIAO, C. Y. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 33957–33965, 2009.
- JIN, J. et al. In and out: histone variant exchange in chromatin. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 12, p. 680–7, dez. 2005.
- KALAB, P.; HEALD, R. The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 10, p. 1577–86, 2008.
- KALASHNIKOVA, A. A. et al. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 20121022, p. 1–9, 2013.
- KAN, P. Y.; CATERINO, T. L.; HAYES, J. J. The H4 tail domain participates in intra- and internucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 2, p. 538–546, 2009.
- KAROLIN, L. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1997.
- KATO, H. 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, n. 30, p. 12283–8, 26 jul. 2011.
- KATO, H. et al. A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1110–1113, 30 maio 2013.
- KOROLEV, N. et al. Electrostatic origin of salt-induced nucleosome array compaction. **Biophysical journal**, v. 99, n. 6, p. 1896–1905, 22 set. 2010.
- KOUTELOU, E.; HIRSCH, C. L.; DENT, S. Y. R. Multiple faces of the SAGA complex. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 374–382, 2010.
- LEDEEN, R. W.; WU, G. Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 1, p. 1–8, 2004.
- 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, n. 1, p. 19–42, 13 fev. 1998.
- LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 7, p. 436–47, jul. 2012.

- MAKDE, R. D. et al. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 562–6, 30 set. 2010.
- MARKS, D. L.; BITTMAN, R.; PAGANO, R. E. Use of bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 5, p. 819–832, 2008.
- MCBRYANT, S. J. et al. 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, n. 11, p. 3563–72, jun. 2008.
- MCGINTY, R. K.; HENRICI, R. C.; TAN, S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 591–596, 29 out. 2014.
- MCGINTY, R. K.; TAN, S. Recognition of the nucleosome by chromatin factors and enzymes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 37, p. 54–61, 2016.
- MCGINTY, R.; TAN, S. Nucleosome structure and function. **Chemical reviews**, v. 115, p. 2255–2273, 2014.
- MICHEL, V.; BAKOVIC, M. Lipid rafts in health and disease. **Biology of the cell**, v. 99, n. 3, p. 129–140, 2007.
- MORGAN, M. T. et al. Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. **Science**, v. 351, n. 6274, p. 725–728, 2016.
- NUNES, E. DA S. et al. Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium(II) citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: a promising platform for cancer therapy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, p. 1683, 2013.
- OLINS, A L.; OLINS, D. E. Spheroid chromatin units (v bodies). **Science (New York, N.Y.)**, v. 183, n. 4122, p. 330–332, 1974.
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC bioinformatics**, v. 15, p. 197, jan. 2014.
- PALLADINO, F. et al. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 543–555, 17 out. 1993.
- PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M.; PETERSON, C. L. Chromatin and the genome integrity network. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 1, p. 62–75, 2013.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 503–33, 2001.
- PILOT, T.; TRAMIER, M.; COPPEY, M. Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting

and binding to human mitotic chromosomes. **Journal of virology**, v. 75, n. 8, p. 3948–3959, 2001.

POSTNIKOV, Y.; BUSTIN, M. Regulation of chromatin structure and function By HMGN proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 1-2, p. 62–68, 2010.

PUNNONEN, E. L.; RYHÄNEN, K.; MARJOMÄKI, V. S. At reduced temperature, endocytic membrane traffic is blocked in multivesicular carrier endosomes in rat cardiac myocytes. **European journal of cell biology**, v. 75, n. 4, p. 344–352, 1998.

RAHMAN, I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 95–109, 31 jan. 2003.

RAO, K. N. Regulatory aspects of cholesterol metabolism in cells with different degrees of replication. **Toxicologic pathology**, v. 14, n. 4, p. 430–437, 1986.

REECE, J. et al. **Campbell Biology: Concepts & Connections**. 7. ed. [s.l.] Benjamin Cummings, 2011.

REGENASS-KLOTZ, M.; HEINIGER, H. J. Specific binding of cholesterol to chromatin prepared from mouse spleen cells. **Canadian journal of biochemistry and cell biology**, v. 62, n. 2-3, p. 94–99, 1983.

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

ROBINSON, P. J. J. et al. 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, n. 17, p. 6506–11, 25 abr. 2006.

ROBINSON, P. J. J. et al. 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. **Journal of molecular biology**, v. 381, n. 4, p. 816–25, 12 set. 2008.

ROUSSEL, L. et al. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. **EMBO reports**, v. 9, n. 10, p. 1006–12, out. 2008.

ROUTH, A. L. **The Determinants of the Structure of the 30nm Chromatin Fibre**. [s.l.] Univerisidad de Cambrigde, 2009.

RUSCHE, L. N.; KIRCHMAIER, A. L.; RINE, J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual review of biochemistry**, v. 72, p. 481–516, 2003.

SAHA, T.; KAR, R. K.; SA, G. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 117, n. 2-3, p. 250–263, 2015.

SAMPATH, V. et al. Mutational analysis of the Sir3 BAH domain reveals multiple points of interaction with nucleosomes. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 10, p. 2532–45, 2009.

SCHALCH, T. et al. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 138–41, 7 jul. 2005.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SHOGREN-KNAAK, M. et al. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. **Science**, v. 311, n. February, p. 844–848, 2006.

SILVA, I. T. G. DA. **Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear: nucleossomo**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

SILVA, I. T. G. DA; OLIVEIRA, P. S. L. DE; SANTOS, G. M. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 5, p. 263–269, 2015.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569–72, 1997.

SIMONS, K.; VAZ, W. L. C. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 33, p. 269–295, 2004.

SMITH, J. S.; BOEKE, J. D. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. **Genes and Development**, v. 11, n. 2, p. 241–254, 1997.

SOLANKO, K. A et al. Fluorescent Sterols and Cholesteryl Esters as Probes for Intracellular Cholesterol Transport. **Lipid insights**, v. 8, n. Suppl 1, p. 95–114, 2015.

SONG, F. et al. Cryo-EM Study of the Chromatin Fiber Reveals a Double Helix Twisted by Tetranucleosomal Units. **Science**, v. 376, n. 344, p. 376–80, 2014.

STONEBURG, C. A. Lipids of Cell Nuclei. **J. Biol. Chem**, v. 129, p. 189–196, 1939.

STRUCHKOV, V. A.; STRAZHEVSKAYA, N. B.; ZHADANOV, R. I. Specific natural DNA-bound lipids in post-genome era. The lipid conception of chromatin organization. **Bioelectrochemistry**, v. 56, p. 195–198, 2002.

TAGUCHI, H. et al. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. **Methods**, v. 70, n. 2-3, p. 119–126, 2014.

TATA, J. R.; HAMILTON, M. J.; COLE, R. D. Membrane Phospholipids Associate with Nuclei an Chromatin: Melting Profile, Template Activity and Stabilit of Chromatin. **Journal of molecular biology**, v. 67, p. 231–246, 1972.

TRAZZI, S. et al. The C-terminal domain of CENP-C displays multiple and critical functions for mammalian centromere formation. **PLoS one**, v. 4, n. 6, p. e5832, jan. 2009.

VERDAASDONK, J. S.; BLOOM, K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 5, p. 320–32, maio 2011.

VIOLA-MAGNI, M. P.; GAHAN, P. B.; PACY, J. Phospholipids in plant and animal chromatin. **Cell Biochem Funct**, v. 3, n. 1, p. 71–78, 1985.

WIDOM, J. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. **PNAS**, v. 89, n. 3, p. 1095–9, 1 fev. 1992.

WORCEL, A.; STROGATZT, S.; RILEYT, D. Structure of chromatin and the linking number of DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 3, p. 1461–1465, 1981.

WÜSTNER, D.; SOLANKO, K. How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 9, p. 1908–1926, 2015.

YAMASHITA, T.; TSUJI, S. Nuclear Sialyl Cholesterol Causes Changes in the Structure of Chromatin and Its Transcription Level Followedby the Promotion of Neuritogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 4, p. 1360–4, 1992.

YANG, D.; ARYA, G. Structure and binding of the H4 histone tail and the effects of lysine 16 acetylation. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 7, p. 2911–21, 21 fev. 2011.

ZAINA, S. et al. Chromatin modification by lipids and lipoprotein components: an initiating event in atherogenesis? **Current opinion in lipidology**, v. 16, n. 5, p. 549–53, out. 2005.

ZENTNER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 259–66, 2013.

## **ANEXO A**

Dados das absorbâncias obtidas nas duplicatas (repetidas seis vezes) no ensaio do MTT realizado com tratamento de GMIP1 por 48h em diferentes linhagens celulares, conforme “Material e Métodos – seção g) Ensaio de viabilidade celular” (página 82):

Hela - GMIP1

N1						
Controle	1,202	1,447	1,1	1,301	1,403	1,2
Veículo	1,254	1,08	1,138	1,23	1,1	1,134
GMIP 1uM	1,604	1,537	1,715	1,562	1,534	1,612
GMIP 50uM	1,57	1,449	1,525	1,456	1,44	1,52
GMIP 100uM	1,234	1,207	1,534	1,24	1,223	1,365
N2						
Controle	1,14	1,808	1,112	1,608	0,828	1,296
Veículo	2,288	2,176	1,024	1,9	0,824	1,66
GMIP 1uM	2,1	1,632	2,02	1,996	1,728	1,508
GMIP 50uM	1,632	1,124	1,056	1,28	0,968	1,032
GMIP 100uM	0,984	0,848	0,848	0,9	0,888	0,684

C3H10 T1/2 - GMIP1

N1						
Controle	0,512	0,617	0,603	0,645	0,45	0,532
Veículo	0,486	0,501	0,484	0,548	0,503	0,525
GMIP 1uM	0,422	0,464	0,522	0,531	0,463	0,526
GMIP 50uM	0,266	0,279	0,297	0,295	0,311	0,258
GMIP 100uM	0,184	0,184	0,25	0,211	0,213	0,169
N2						
Controle	0,612	0,642	0,678	0,771	0,675	0,726
Veículo	0,669	0,651	0,816	0,828	0,822	0,804
GMIP 1uM	0,75	0,63	0,855	0,714	0,693	0,708
GMIP 50uM	0,537	0,684	0,591	0,486	0,57	0,501
GMIP 100uM	0,603	0,639	0,468	0,432	0,501	0,414

Raw 264.7 - GMIP1

N1						
Controle	2,212	2,093	2,13	1,842	1,559	2,535
Veículo	2,586	2,306	2,508	2,162	3,024	2,769
GMIP 1uM	2,527	2,527	2,649	2,288	2,56	2,624
GMIP 50uM	2,375	2,723	2,515	1,978	2,742	2,783
GMIP 100uM	1,783	1,927	2,137	1,555	1,897	1,863
N2						
Controle	2,539	2,861	2,441	2,736	2,194	2,755
Veículo	3,121	2,162	2,836	3,121	2,966	3,077
GMIP 1uM	2,682	2,318	2,688	2,776	2,682	2,836
GMIP 50uM	2,343	2,066	2,915	2,852	2,812	2,755
GMIP 100uM	1,772	1,535	2,052	2,058	2,113	1,87

CCD1059 - GMIP1

N1						
Controle	0,35	0,49	0,334	0,572	0,382	0,529
Veículo	0,549	0,57	0,674	0,647	0,652	0,712
GMIP 1uM	0,5	0,539	0,626	0,614	0,597	0,718
GMIP 50uM	0,484	0,531	0,681	0,661	0,662	0,667
GMIP 100uM	0,463	0,478	0,597	0,566	0,595	0,512
N2						
Controle	0,323	0,2572	0,2826	0,3397	0,3949	0,366
Veículo	0,2919	0,3683	0,3723	0,3811	0,3942	0,377
GMIP 1uM	0,2539	0,4014	0,344	0,4208	0,4294	0,4036
GMIP 50uM	0,3622	0,4205	0,3475	0,3415	0,4297	0,3949
GMIP 100uM	0,4534	0,433	0,4019	0,4407	0,3906	0,2491

Dados das absorbâncias obtidas nas duplicatas (repetidas seis vezes) no ensaio do MTT realizado com tratamento de LANA por 48h em diferentes linhagens celulares, conforme “Material e Métodos – seção g) Ensaio de viabilidade celular” (página 82):

Hela - LANA

N1						
Controle	0,285	0,452	0,278	0,402	0,207	0,324
Veículo	0,556	0,432	0,495	0,441	0,417	0,46
LANA 1uM	0,416	0,506	0,336	0,183	0,213	0,367
LANA 50uM	0,459	0,48	0,425	0,148	0,298	0,263
LANA 100uM	0,154	0,158	0,112	0,108	0,138	0,144
N2						
Controle	0,335	0,401	0,311	0,298	0,397	0,358
Veículo	0,442	0,498	0,501	0,507	0,448	0,476
LANA 1uM	0,343	0,458	0,456	0,423	0,396	0,376
LANA 50uM	0,335	0,392	0,402	0,45	0,351	0,321
LANA 100uM	0,22	0,24	0,112	0,102	0,165	0,201

C3H10 T/2 - LANA

N1						
Controle	0,204	0,214	0,226	0,257	0,225	0,242
Veículo	0,241	0,22	0,285	0,265	0,271	0,236
LANA 1uM	0,249	0,271	0,208	0,26	0,217	0,256
LANA 50uM	0,198	0,196	0,205	0,189	0,182	0,197
LANA 100uM	0,129	0,153	0,16	0,148	0,167	0,153
N2						
Controle	0,512	0,617	0,603	0,645	0,45	0,532
Veículo	0,574	0,571	0,595	0,633	0,381	0,559
LANA 1uM	0,436	0,472	0,477	0,487	0,389	0,478
LANA 50uM	0,283	0,275	0,388	0,288	0,274	0,232
LANA 100uM	0,231	0,225	0,241	0,258	0,248	0,236



## **ANEXO B**

# Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target

Isabel Torres Gomes da Silva<sup>1</sup>, Paulo Sergio Lopes de Oliveira<sup>2</sup>, and Guilherme Martins Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, 70919-970, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, CNPEM, Campinas, Brazil

Chromatin is the major regulator of gene expression and genome maintenance. Proteins that bind the nucleosome, the repetitive unit of chromatin, and the histone H4 tail are critical to establishing chromatin architecture and phenotypic outcomes. Intriguingly, nucleosome-binding proteins (NBPs) and the H4 tail peptide compete for the same binding site at an acidic region on the nucleosome surface. Although the essential facts about the nucleosome were revealed 17 years ago, new insights into its atomic structure and molecular mechanisms are still emerging. Several complex nucleosome: NBP structures were recently revealed, characterizing the NBP-binding sites on the nucleosome surface. Here we discuss the potential of the nucleosome surface as a therapeutic target and the impact and development of exogenous nucleosome-binding molecules (eNBMs).

## Chromatin dynamics

It remains a great challenge to fully understand how nature packs the eukaryotic genetic code into small functional chunks. The complex association of highly basic proteins and DNA to form nucleosomes is the first level of DNA compaction, followed by a cooperative nucleosome interaction to form the higher-order chromatin structure. Since chromatin is the major regulator of gene expression and genome maintenance, it is plausible to believe that molecules that target nucleosomes have a profound impact on gene expression and genome maintenance.

We are now beginning to perceive how changes in chromatin architecture may affect gene expression. It is clear that the local chromatin state – relaxed (permissive) or condensed (repressive) – regulates the access of transcription factors, coregulators, and the basic transcription machinery to specific enhancers in target genes (reviewed in [1]). Thus, the dynamic modulation of the chromatin structure determines transcriptional and clinical phenotypic outcomes.

Corresponding author: Santos, G.M. (gsantos@unb.br).

Keywords: nucleosome; structure; chromatin; therapeutic target; chromatin; acidic patch; binding protein.

0165-6147/

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Lessons from *in vitro* studies have confirmed that chromatin fibers are highly dynamic; under low-salt conditions, chromatin adopts an open conformation known as ‘beads on a string’ or the 10-nm fiber. In a physiological ionic environment (presence of  $Mg^{2+}$ ) and the correct linker histone stoichiometry, the chromatin can fold to form a compacted chromatin structure, the 30-nm fiber [2]. Moreover, chromatin dynamics are strongly dependent on the NBP and H4 tail (the highly basic N-terminal domain of histone 4) (see Glossary) interaction with a negatively charged region on the nucleosome surface known as the acidic patch.

Here we focus on the nucleosome surface as a potential therapeutic target to regulate chromatin dynamics and a myriad of cellular disorders.

## The nucleosome and its binding proteins

The nucleosome is the repetitive and fundamental unit of chromatin. NBPs are key players in modulating chromatin changes. From condensed to relaxed chromatin, NBPs may induce specific chromatin architecture modifications dependent on their unique

## Glossary

**Acidic patch:** a negatively charged region on the nucleosome surface formed from six H2A and two H2B residues (see text).

**Chromatin:** a macromolecule comprising a dynamic and functional array of nucleosomes that forms the first level of organization, known as the ‘beads-on-a-string’ structure or euchromatin. The second level of chromatin organization is achieved when the nucleosome array folds to a highly compacted state, forming a structure known as the 30-nm fiber or heterochromatin.

**Exogenous nucleosome-binding molecules (eNBMs):** peptide-like molecules that bind to the acidic patch; derived from the H4 tail and chromatin-binding motifs of NBPs.

**H4 tail:** the N-terminal domain of histone H4 is highly basic, similar to all core histone tails. Deacetylated H4K16 tails interact with the acidic patch of adjacent nucleosomes, bringing them into a closer state and inhibiting gene expression. Acetylated H4 tails are unable to interact with the acidic patch, causing chromatin relaxation.

**Linker histone:** members of the histone family, linker histones (H1 and H5) do not constitute the NCP. H1 asymmetrically binds to the nucleosome and chromatin to play a crucial role in the formation of the 30-nm fiber.

**Nucleosome:** the fundamental unit of chromatin. The NCP comprises 145–147 bp of DNA wrapped around an octamer of four core histones (H2A, H2B, H3, and H4). The core histones have a globular domain comprising  $\alpha$ -helices that forms the body of the nucleosome. The short N-terminal tail domains of histones are generally flexible and unstructured.

**Nucleosome-binding proteins (NBPs):** proteins that bind to the nucleosome, usually through the direct interaction of a NBP short motif with the acidic patch.



**Box 1. The functional side of atomically detailed NBPs**

**RCC1.** RCC1 is a NBP that recruits the small GTPase Ran enzyme to chromatin, triggering nucleotide exchange activity. The interaction of RCC1 with the nucleosome is essential for mitosis and nuclear transport [34].

**LANA.** The KSHV LANA is tethered to the nucleosome, forming a minichromosome known as an episome. LANA is crucial for keeping the viral genome bound to mitotic chromosomes in a condensed chromatin state [35].

**SIR3.** The SIR proteins induce and hold the chromatin in a silenced state. SIR3 is a NBP with chromatin remodeler activity that, *in vitro*, is able to assemble a hypercondensed chromatin structure [36].

**HMGN2.** HMGN2 is a member of a broader class of HMG chromosomal proteins and plays important roles in transcription, replication, recombination, and DNA repair. The HMGN proteins bind to nucleosomes and displace linker histone H1 from the nucleosome surface. HMGN induces chromatin relaxation *in vitro* [37].

**IL-33.** IL-33 is a member of the IL-1 superfamily of cytokines with a fundamental role in immune modulation and inflammatory signaling. IL-33 is enriched in endothelial cells *in vivo* as a chromatin-associated factor. *In vitro*, the IL-33 chromatin-binding motif induces chromatin condensation by increasing nucleosome self-association and oligomerization [7].

**CENP-C.** CENP-C, a DNA-binding protein, is one of the 16 centromere proteins complexed with CENP-A, recognizing centromeric nucleosomes to maintain proper kinetochore size and a timely transition to anaphase during mitosis. This NBP is responsible for keeping the chromatin condensed [38].

**PRC1.** PRC1, in complex with other proteins of the Polycomb group and 'E3' ubiquitin ligase enzymes, downregulates a set of genes involved in developmental processes. PRC1 induces chromatin condensation through nonenzymatic mechanisms and probably also through enzymatic processes [39].

The first atomic structure of the nucleosome core particle (NCP), obtained by Richmond, Luger, and colleagues in 1997 [3], revealed the existence of the acidic patch, a negatively charged region formed by H2A and H2B. Later, in 2006, the first complex structure of a nucleosome:peptide was resolved, showing at atomic level that the viral peptide Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) latency-associated nuclear antigen (LANA) binds to the acidic patch [4]. In the following years, another five nucleosome:NBP complex structures were published: two crystal structures (peptide:bromo-adjacent homology (BAH) domain silent information regulator (Sir) 3 [5] and protein:regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) [6]); one atomic structure derived from computational modeling {peptide:interleukin (IL)-33 [7]}; one from NMR imaging and modeling (peptide:high mobility group (HMG) nucleosome-binding protein (HMGN) 2 [8]); and one from a combination of crystallography, NMR, and computational modeling (peptide:centromere protein (CENP)-C [9]). These structures revealed atomic details of the interaction of NBPs with the nucleosome surface, highlighting the acidic patch as the principal protein-docking region.

Recently, a new crystallographic structure of a nucleosome:protein complex was published. Song Tan and colleagues [10] presented a structure that reveals an unexpected role for an enzyme in substrate recognition on the nucleosome, showing that a domain (Ring1B) of the enzymatic complex binds to the acidic patch. In addition, this structure reveals new binding sites for proteins on the

surface of a nucleosome. A detailed NBP interaction map on the nucleosome surface is illustrated in Figure 1B,C.

**The acidic patch is on target**

The acidic patch, formed by six residues of H2A and two of H2B, is responsible for nucleosome–nucleosome interactions. It is a negatively charged region that forms a narrow groove on the nucleosome surface. This can be visualized on the charged surface structure of a nucleosome represented in Figure 1A. Notably, another negatively charged zone (Figure 1A) with four residues (H3: E73, I74, and D77; H4: E63) adjacent to the acidic patch provides a binding site for BAH SIR3 and Polycomb repressive complex 1 (PRC1) (Figure 1B,C) via residue D77.

In addition, the acidic patch residues Y50, V54, and Y57 on H2A create a hydrophobic pocket at the bottom of the acidic patch groove (reviewed in [11]). It is astonishing to notice that all seven nucleosome:protein complexes examined at the atomic level exploit the acidic patch as the critical region for NBP interactions. It is also remarkable that these proteins have conserved arginine residues (shown in gray in Table 1) to interact with the acidic patch.

**Chromatin architecture and nucleosome-binding molecules**

It has been shown that the N-terminal domain of H4 has a well-documented role in modulating chromatin architecture. When the H4 tail is acetylated or removed by proteolysis, chromatin no longer compacts as it would be expected and the chromatin structure loosens. By contrast, the deacetylated H4K16 tail interacts with the surface of adjacent nucleosome bringing them into a closer state to promote nucleosome–nucleosome interactions and form the higher-order chromatin structure (silenced chromatin, 30-nm fiber) [12].

Besides the role of acetylated H4K16 in relaxing the chromatin state, data from *Saccharomyces cerevisiae* showed that an acetylated H4K16 mark is required for the formation of both relaxed and condensed chromatin [13].

The function of the H4 tail in chromatin dynamics is still debated. However, evidence from a cryoelectron microscopy (cryo-EM) study of the chromatin fiber showed that the internucleosomal interactions between the positively charged residues of the H4 N-terminal tail and the acidic patch may account for the twist between the tetranucleosomal units, supporting the notion that H4 tail is crucial for chromatin compaction [14].

NBPs will also have major roles as chromatin structure regulators, with some NBPs inducing chromatin condensation and others favoring chromatin relaxation (Box 1 and Figure 1C).

To predict the chromatin architecture outcome on neutralizing the acidic patch we should take into account the equilibrium between NBPs and the H4 tail in acidic patch interactions. Based on binding affinity and concentration, competition for the acidic patch and other regions on the nucleosome surface will determine the final chromatin state.

Hansen and colleagues [11] have raised a beautiful hypothesis to explain the mechanism adopted by NBPs

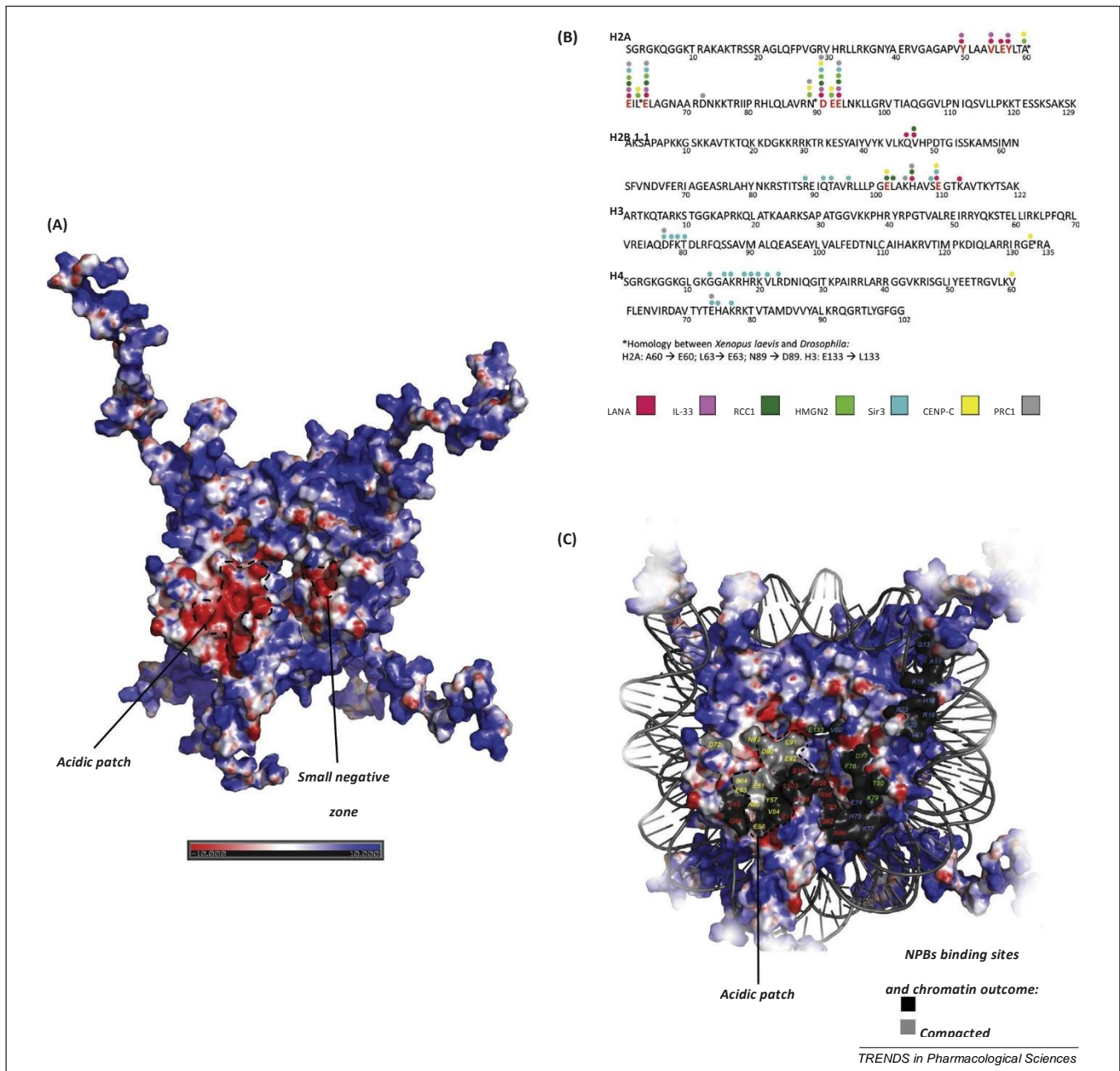


Figure 1. Interaction map of nucleosome-binding protein (NBP) residues on the nucleosome surface. (A) Charged surface of a nucleosome (red, negative; blue, positive) showing an extensive negative region, the acidic patch, and a small negative zone (broken black circle). (B) Sequence of histones H2A, H2B, H3, and H4 from *Xenopus laevis* mapped for NBP:nucleosome interaction. The color-coded dots show specific NBP interactions with distinct histone residues. (C) The charged surface of the nucleosome, highlighting the histone residues that interact with NBPs, color coded according to chromatin outcome (Box 1): black, NBPs that condense chromatin; gray, overlap of NBPs with relaxed and condensed chromatin activity. The nucleosome surface was generated using APBS tools 2.1 in PyMOL with 1KX5 from the Protein Data Bank (PDB) converted in PQR (PDB2PQR)

to regulate the chromatin higher-order structure. First, they determined that, in the absence of NBPs, nucleosome–nucleosome interactions occur mainly through the H4 tail binding to the acidic patch; this was called the ‘ground state of chromatin’. When the ground state is perturbed, the predominant chromatin architecture will be determined by the specific properties of the NBPs.

We now extend this hypothesis to accommodate another possibility for triggering different and specific chromatin architectures (Box 2). This condition would take place on the binding of molecules, here called eNBMs, to the acidic

patch and nucleosome surface, driving the formation of an alternative chromatin architecture. By outcompeting NBPs and the H4 tail, the formation of eNBM:nucleosome complexes would induce the chromatin fiber to adopt state similar to that of basal state 1 (an empty acidic patch) in which the relaxed conformation would be preferred. However, we should admit that neutralizing the negative charge of the acidic patch could induce chromatin condensation by decreasing repulsion between nucleosomes and, consequently, assisting the linker histones to lead the chromatin architecture changes [15]. Thus, occlusion of

Table 1. NBP residues that make direct contact with the acidic patch on the nucleosome

Acidic patch residue	H2A residue										H2B residue		Refs
	Y50 <sup>a</sup>	V54 <sup>a</sup>	E56	Y57 <sup>a</sup>	E61	E64	D90	E91	E92	E102	E110		
NBP													
LANA	M6, L8	M6, L8	R9	M6, L8	R9	S10	R9		R9			R7	[4]
IL-33	M45	M45		M45	R48, S49	S49	R48		R48				[7]
RCC1					R216, R223	R216, S214, S217	R223			R216, R223	R216, R223		[6]
HMGN2					R23, S24, R26	R23, S24	R26	R22, R26	R26				[8]
SIR3					R32	R32	R32		R32			R32	[5]
CENP-C							R525	R717, R719			R717, R719		[9]
PRC1					K97, R98	K97	R98		R98				[10]

<sup>a</sup>Hydrophobic pocket formed by nonpolar residues.

the acidic patch by eNBMs leads to a novel chromatin state. Since binding of the H4 tail, NBPs, or eNBMs to the nucleosome is dependent on concentration and binding affinity, it is possible that each of these complexes would induce distinct chromatin architectures that are different from the one in which the acidic patch is not occluded. This hypothesis is represented in [Box 2](#).

#### In vivo

Nevertheless, it is not trivial to anticipate the implication of our hypothesis on the transcriptional outcome and cellular environment.

Almost a decade ago, elegant experiments revealed that the LANA peptide induces chromatin condensation by neutralizing the repulsion between nucleosomes. By transient transfection assays, this work also demonstrated that the LANA peptide has strong effects *in vivo*, resulting in chromatin condensation [15].

More recently, synthetic peptides from the histone H4 N-terminal tail were created as a molecular tool to keep

p53 genes in an active state [16]. In this work, the team aimed to regulate enzymes that insert or remove epigenetic marks on histones, such as G9a methyl transferase and histone deacetylase (HDAC) 1 respectively. Using xenograft models and cancer cell lines, it was observed that acetylated H4 tail peptides inhibited tumor cell growth and activated apoptosis in response to DNA damage, indicating an anticancer effect. Interestingly, non-acetylated H4 tail peptide, the preferable form for acidic patch binding, had a moderate effect on p53-mediated transcription.

Taking these findings together, it is reasonable to consider that exogenous NBPs have the potential to be excellent devices to modulate chromatin architecture, gene expression, and related phenotypic outcomes.

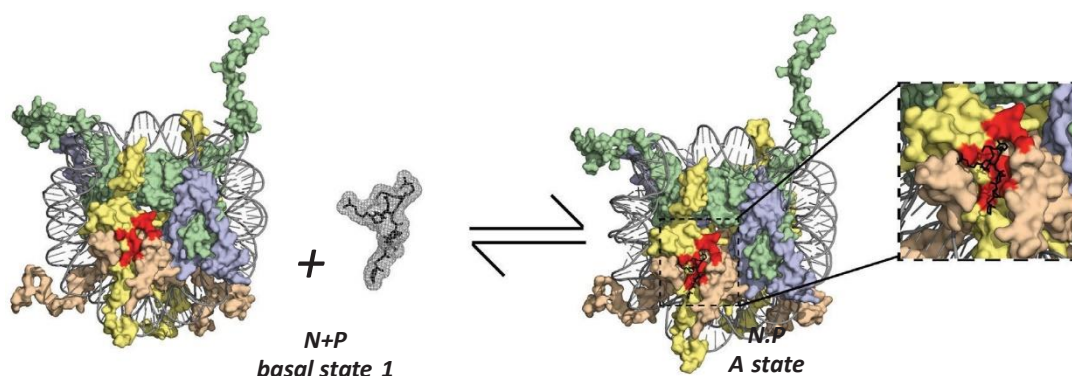
Nevertheless, it is also important to take into account the ability of the already characterized synthetic acidic-hydrophobic peptides, derived from acidic transcriptional activators, to decondense chromatin without activating transcription [17]. The uncoupling of transcription activation and the relaxed chromatin state complicates the

#### Box 2. Hypothesis for chromatin architectural changes on NBP and eNBM binding

Generalizing the dynamic equilibrium between the nucleosome and NBMs or NBPs results in either of two states – a liganded or unliganded nucleosome – similar to classical drug-receptor interactions. This is represented in the equilibrium reaction below. Given N, a nucleosome, and P, a protein or molecule, by  $N + P$  we mean an unoccupied nucleosome. When the concentration of P changes, it displaces the equilibrium to NP ([Figure 1](#)).

For  $P = P1$ ,  $A = X$ ; for  $P = P2$ ,  $A = Y$ ; for  $P = H4$  tail,  $A = Z$ ; for  $P = M$ ,  $A =$  basal state 2, where  $P1 = NBP 1$ ,  $P2 = NBP 2$ ,  $H4$  tail = N terminus of H4,  $M = NBM$ , and  $X, Y, Z =$  distinct states.

X is a specific condensed state, Y is a specific relaxed state, and Z is a classical condensed state. Basal state 1 refers to the loosened chromatin state and basal state 2 refers to a specific, less-condensed state imposed by occlusion of the acidic patch.



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figure 1. The nucleosome core particle (NCP) and peptide [truncated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen (LANA) from Protein Data Bank (PDB) 1ZLA] are represented. H3 in green; H4 in blue; H2A in yellow; H2B in wheat; DNA in gray; acidic patch in red.

predictions of transcriptional state based on chromatin state.

#### eNBMs for targeting the nucleosome surface: small molecule, peptide, or peptidomimetic?

Nature's experiments on histones have provided invaluable insights into how the understanding of changes in chromatin dynamics may uncover mechanisms of diseases and shed light on potential treatment alternatives. A myriad of histone modifications, which strongly induce changes in the chromatin structure, have been associated with malignancies and other diseases, highlighting the crucial role of chromatin architectural changes in disease mechanisms. An emergent class of drugs referred to as epidrugs [18] aims to control the epigenetic changes and hence gene expression for disease treatment.

Considering that epidrugs have profound effects on chromatin structure, it is reasonable to believe that any molecule that binds to the nucleosome and interferes with chromatin dynamics would also be able to tackle disease phenotypes at a molecular level. Hypothetically, the interface between the nucleosome surface and a NBP can be a promising drug target.

An attempt to identify specific inhibitors of KSHV was recently conducted focused on small molecules with the ability to displace the LANA peptide from the acidic patch [19]. High-throughput screening of large chemical libraries with more than 350 000 compounds identified many small molecules that prevented LANA binding to the nucleosome. However, none of these survived additional screening steps, suggesting that more complex molecules would be needed to outcompete LANA from the nucleosome.

As discussed above, peptides derived from the H4 tail were used to regulate p53 genes. To facilitate intracellular trafficking, H4 tail peptides were fused with the protein transduction domain of HIV TAT, a cell-penetrating peptide (CPP). Nonetheless, as emphasized by the authors, an important disadvantage of having pTAT conjugated with peptides is their retention in cytoplasmic compartments, which could limit its traffic to the nucleus. To counter this barrier, H4 tail peptides were also fused with a nuclear localization signal, allowing its nuclear import [16].

There is increasing interest in peptide-based therapies from pharmaceutical companies due their high selectivity and good efficacy [20]. However, drug companies investing in peptides also face several weaknesses, such as low diffusion through the cell membrane due to the high molecular weight and polar characteristics. In addition, the tendency for proteolysis and aggregation and short half-life are undesirable characteristic of peptides.

Perspectives for peptide drugs are based on rational design to prevent their weaknesses. Emerging strategies such as CPPs and peptide–drug conjugates are promising for clinical applications of peptides.

Recently, many synthetic peptides derived from the histone tail and its post-translational modification were systematically reviewed [21], focusing on their contributions to peptide chemistry, chromatin biology, and cellular signaling. We wonder whether any of these peptides, with high affinity for the acidic patch, have been directly tested in cellular and animal models and, if so, what would be

their effects on chromatin structure, global gene expression, cell proliferation, viability, and, for example, various types of cancer.

Among the strategies used to improve peptide pharmacokinetics, and sometimes pharmacodynamics, it is noteworthy to mention the development of the staple  $\alpha$ -helical peptide drug, which improved peptide resistance to proteolytic degradation and ameliorated the cell-penetrating properties [22]. The rationale behind this class of peptides is the addition of an all-hydrocarbon crosslink to retain the peptides in an  $\alpha$ -helical secondary structure, mimicking the conformation found at the interface of many protein–protein interactions (PPIs).

#### Structure-based design of eNBMs

Modulation of nucleosome kinetics requires ligands (natural or synthetic) that are able to bind specifically and avidly to the constituent proteins and DNA of the nucleosome. Unlike typical drug targets such as enzymes or receptors, the nucleosome is a structural protein:DNA complex that does not have a catalytic function, which may hamper research on new eNBMs. The main strategy comprises modulating PPIs between nucleosomes and NBPs through histones that constitute the nucleosome surface (Figure 2). However, the development of inhibitors of PPIs (iPPIs) is not trivial. iPPIs must violate the Lipinski's 'Rule of Five' [23], a group of experimental parameters that determine the drugability of a certain compound: or rather, drugs orally ingested are small molecules (less than 500 Da) with  $\log P$  less than 5 [24]. The perception that several synthetic molecules larger than 500 Da are suitable to bind effectively to shallow pockets has motivated a search for good scaffolds on protein surfaces. For this, the rationale behind the development of iPPIs is to expand the chemical space through the use of specific fragment library screening (reviewed in [25]) for the generation of new libraries using 'diversity-oriented synthesis and libraries of large macrocycles', which are compounds with ring structures of 12 or more atoms and molecular mass ranging from 500 Da to 2000 Da [26]. Diversity-oriented synthesis aims to prepare libraries of structurally complex and diverse compounds from simple starting small molecules, typically through the use of combinatorial chemistry.

Efforts in computational biology have been directed at the improvement of predictions for the best iPPIs. Several new software packages were recently developed to help with structure-based drug design. The HADDOCK<sub>2P2I</sub> score is capable of predicting the binding affinity of iPPIs [27]. pepMMsMIMIC [28] enables the finding of peptidomimetics given a 3D peptide structure whereas 2P2I Hunter designs iPPI libraries based on the 2P2I database [23]. Moreover, algorithms that chemically characterize PPIs are available [29].

Importantly for the development of eNBMs, the detection of potential clefts of PPIs on the surface on the nucleosome would be crucial. KvFinder would facilitate the identification of shallow cavities, indicating the best-fitted molecule on, for example, the acidic patch [30]. Furthermore, software to predict the interaction hotspots between proteins based on protein-to-protein docking algorithms [31] may help in the planning of new eNBMs.

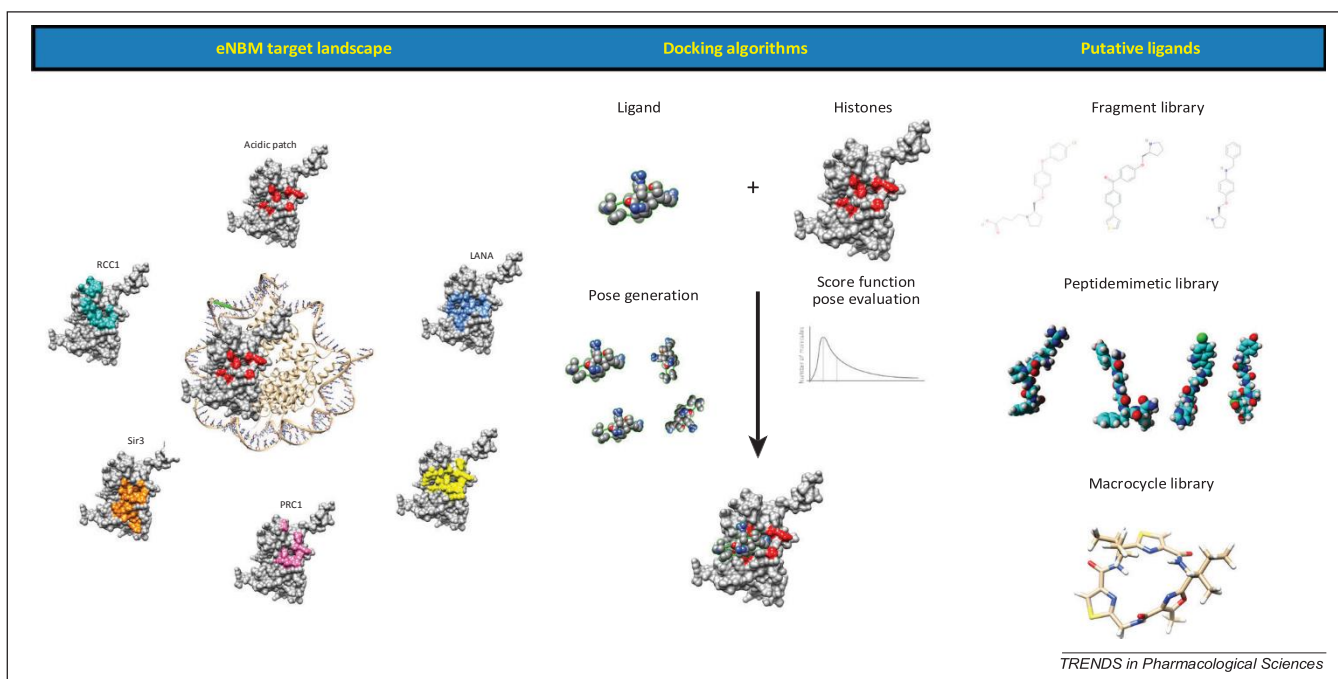


Figure 2. Structure-based design of exogenous nucleosome-binding molecules (eNBMs). Left: Nucleosome core particle structure [Protein Data Bank (PDB) 3MVD] is shown in the center of the circle. Histones H2A and H2B are represented in surface view with residues of the acidic patch in red. Around the nucleosome are residues of H2A and H2B that make contacts with various proteins: regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) (PDB 3MVD); Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen (LANA) peptide (PDB 1ZLA); Polycomb repressive complex 1 (PRC1) (PDB 4R8P); silent information regulator 3 (Sir3) (PDB 3TU4); and centromere protein-C (CENP-C) (4X23). Middle: A schematic model of peptide–histone docking. Briefly, for a given ligand the conformation space is explored through pose generation using heuristics to modify the ligand structure using rigid-body rotation and translation. Each pose is evaluated by a score function that can be used to select the best complexes. Right: Alternative molecules to explore the ligand chemical space. A library of fragments and peptidomimetics derived from a nucleosome-binding peptide can generate good hits and lead compounds.

### Concluding remarks

The current strategy adopted by pharmaceutical companies for drug discovery has been shifting its focus from pathologies to mechanisms. Drugs that target enzymes responsible for histone post-translational modifications and DNA methylation, which have strong effects on chromatin structure, are still emerging. However, large pharmaceutical companies have abandoned the development of new molecules (for example, HDAC inhibitors) due to their complex downstream effects [32]. We are currently in need of new strategies for the treatment of cancer and many other diseases.

Targeting the nucleosome surface to govern chromatin architecture would also carry a considerable risk of complex downstream effects. Nevertheless, the search for molecules with various binding affinities for specific signatures on the nucleosome, such as histone variants and post-translational modifications, could lead to more selective drugs for disease treatment.

It is amazing to observe the rapid expansion of various areas from computational to structural biology. To investigate the function of histones and peptides derived from histone tails, great work has been done by synthetic biologists in the past decade [21]. Structural studies of large complexes have been resolved by cryo-EM, such as the 30-nm fiber structure published recently [14]. Cell and molecular biology are still making remarkable progress in dissecting mechanisms and signaling pathways; for example, the ENCODE project [33]. Computational biology has been integrated into all fields, helping to predict how

biology works. The combination of all of these areas has proved to be crucial in overcoming the difficulties of a modern era of drug discovery.

Taking all of this into account, it is clear that the moment is right to consider the nucleosome surface as a potential therapeutic target to regulate a plethora of cellular disorders (Box 3). Numerous diseases, such as cancer and metabolic disorders, that exhibit dysregulation of gene expression and DNA repair could be targeted using eNBMs to reprogram cell-fate determination. eNBMs are also highly desirable to prevent LANA from binding to the nucleosome, inhibiting the binding of the viral genome to mitotic chromosomes.

Here we have tried to persuade the scientific community interested in controlling gene expression and genome

#### Box 3. Outstanding questions: is it time to target the nucleosome surface?

Focusing on translational research and drug discovery, several questions arise from these observations.

- Why have we not yet developed molecules that can directly bind to the acidic patch to modulate gene expression, tackling a plethora of cellular disorders?
- What would be the cellular outcome of introducing exogenous molecules that would compete with NBPs and the H4 tail for the acidic patch?
- Considering the nucleosome as a target, could we overcome its nonselective nature?
- If the drug must be a peptide-like molecule, how can we improve its pharmacokinetics?

maintenance that it is time to think about the surface of the nucleosome as a target rather than looking only at histone tails and proteins that deposit, read, or remove epigenetic marks.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Carlos Pantoja and Werner Treptow for critical reading of the manuscript. They also thank Daniela Amato for mathematical discussions. This work was supported by CNPq/483403/2011-3.

### References

- Voss, T.C. and Hager, G.L. (2014) Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* 15, 69–81
- Routh, A. *et al.* (2008) Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8872–8877
- Richmond, R.K. *et al.* (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260
- Barbera, A.J. *et al.* (2006) The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856–861
- Armache, K.J. *et al.* (2011) Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 977–982
- Makde, R.D. *et al.* (2010) Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* 467, 562–566
- Roussel, L. *et al.* (2008) Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 9, 1006–1012
- Kato, H. *et al.* (2011) Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl- based NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12283–12288
- Kato, H. *et al.* (2013) A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science* 340, 1110–1113
- McGinty, R.K. *et al.* (2014) Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591–596
- Kalashnikova, A.A. *et al.* (2013) The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *J. R. Soc. Interface* 10, 1–9
- Robinson, P.J.J. *et al.* (2008) 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J. Mol. Biol.* 381, 816–825
- Oppikofer, M. *et al.* (2011) A dual role of H4K16 acetylation in the establishment of yeast silent chromatin. *EMBO J.* 30, 2610–2621
- Song, F. *et al.* (2014) Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science* 376, 376–380
- Chodaparambil, J.V. *et al.* (2007) A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat. Struct. Biol.* 14, 1105–1107
- Heo, K. *et al.* (2013) Cell-penetrating H4 tail peptides potentiate p53-mediated transactivation via inhibition of G9a and HDAC1. *Oncogene* 32, 2510–2520
- Carpenter, A.E. *et al.* (2005) Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. *Mol. Cell. Biol.* 25, 958–968
- Ivanov, M. *et al.* (2014) Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 384–396
- Beauchemin, C. *et al.* (2014) Assay development and high-throughput screening for inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus N-terminal latency-associated nuclear antigen binding to nucleosomes. *J. Biomol. Screen.* 19, 947–958
- Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2014) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today* 20, 122–128
- Mu, M.M. and Muir, T.W. (2014) Histones: at the crossroads of peptide and protein chemistry. *Chem. Rev.* Published online October 20, 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/cr5003529>
- Chang, Y.S. *et al.* (2013) Stapled  $\alpha$ -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E3445–E3454
- Morelli, X. *et al.* (2011) Chemical and structural lessons from recent successes in protein–protein interaction inhibition (2P21). *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 475–481
- Lipinski, C.A. *et al.* (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26
- Jubb, H. *et al.* (2012) Structural biology and drug discovery for protein–protein interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 241–248
- Mullard, A. (2012) Protein–protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 173–175
- Kastritis, P.L. *et al.* (2014) HADDOCK<sub>2P21</sub>: a biophysical model for predicting the binding affinity of protein–protein interaction inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 826–836
- Floris, M. *et al.* (2011) Swimming into peptidomimetic chemical space using pepMMsMIMIC. *Nucleic Acids Res.* 39, W261–W269
- Bourgeois, R. *et al.* (2010) Atomic analysis of protein–protein interfaces with known inhibitors: the 2P21 database. *PLoS ONE* 5, e9598
- Oliveira, S.H.P. *et al.* (2014) KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. *BMC Bioinform.* 15, 197
- Huang, S-Y. (2014) Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges. *Drug Discov. Today* 19, 1081–1096
- Ratner, M. (2014) Small biotech steers HDAC inhibitor to clinic. *Nat. Biotechnol.* 32, 853–854
- Carninci, P. (2014) Mice in the ENCODE spotlight. *Nature* 515, 346–347
- Carazo-salas, R.E. *et al.* (1999) Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for mitotic spindle formation. *Nature* 400, 178–181
- Weiss, A. *et al.* (1999) Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284, 641–644
- McBryant, S.J. *et al.* (2008) The silent information regulator 3 protein, SIR3p, binds to chromatin fibers and assembles a hypercondensed chromatin architecture in the presence of salt. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3563–3572
- Trieschmann, L. *et al.* (1995) Incorporation of chromosomal proteins HMG-14/HMG-17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes. *EMBO J.* 14, 1478–1489
- Verdaasdonk, J.S. and Bloom, K. (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 320–332
- Simon, J.A. and Kingston, R.E. (2014) Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Mol. Cell* 49, 808–824



