



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Farmacologia Molecular

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE HISTONAS
HUMANAS RECOMBINANTES**

CAMYLA MARA DA SILVA RIBEIRO

BRASÍLIA, DF

2017

CAMYLA MARA DA SILVA RIBEIRO

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES

Orientador: Prof. Guilherme Martins Santos

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

BRASÍLIA, DF

2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Emivaldo e Célia, por todas as lições de amor e cuidado ao longo da jornada da vida. Pelo apoio indescritível quando decidi retornar à vida acadêmica e pela paciência ao ouvirem o meu resumo do dia, diariamente claro! Além da preocupação de mamãe em sempre perguntar como estavam os meus “micróbios” do laboratório. Vocês sempre serão a minha inspiração!

À minha irmã e amiga, Yara, por todas as risadas infinitas e pelas conversas nos momentos em que a gente precisava ficar calada. Muito obrigada também por me entender através de um olhar, uma palavra e até pela ausência de tudo isso.

Ao meu querido orientador, Guilherme Santos, por todas as conversas científicas (ou não), por ter acreditado em mim, desde a primeira vez que cheguei ao laboratório e por ter me guiado durante todo este trabalho. E, claro, por todas palavras de incentivo quando tudo parecia caminhar para o lado “errado”.

Aos meus queridos amigos do grupo Cromatina: Kaian, Vinícius e Luís pela parceria gigantesca, por todas as sugestões e ajuda ao longo deste trabalho. Àquelas que passaram pelo grupo: Bel, Wanessa e Paloma que sempre, gentilmente, estavam dispostas a ajudar. À Andressa, que já faz parte do grupo, por todo auxílio nos últimos experimentos deste trabalho.

Aos amigos do FarMol, em especial, Cínthia, Bruna, Gleice, Carol, Fernandinha, Mariella, Henrique, Hanna, Anyk, Simone, por todo o companheirismo ao longo deste trabalho, pelas conversas sérias ou não, e por sempre manterem o bom humor mesmo quando todos os experimentos pareciam não funcionar.

Ao corpo técnico do FarMol sob o controle da Rilva e Luciano, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Aos estagiários Paloma, Taís, Vinícius e Camila, que gentilmente, sempre perguntavam se eu tinha meio de cultura para autoclavar.

Aos professores do FarMol, Djane, Angélica, Francisco, Marie, Adriana, Luís Simeoni e Fátima por sempre servirem de inspiração e exemplo como pesquisadores.

Aos professores Marcelo Brígido, Vicente Martins e Angélica Amato por gentil aceitação em integrarem a banca examinadora deste trabalho.

À professora Pérola Magalhães que, gentilmente, me ensinou a operar o Akta pure™ pela primeira vez e permitiu a utilização do Laboratório de Produtos Naturais

sempre que precisasse. Às técnicas Júlia e Patrícia, que sempre foram muito solícitas e simpáticas. Aos alunos Samuel, Paula e Marcela que sempre dava uma “mãozinha” quando precisava de ajuda com o Akta.

Aos amigos e familiares pelas palavras constantes de incentivo e apoio.

À CAPES e FAP-DF pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

E, finalmente, ao meu amor Ricardo, por sempre caminhar e sonhar ao meu lado. E que, por tanto me ouvir falar, ao final começou a entender o meu objeto de trabalho. Obrigada também por tentar ajudar a diminuir o consumo de doces quando a ansiedade aumentava, não funcionou, mas obrigada de qualquer forma!

RESUMO

O DNA de organismos eucarióticos é organizado sob a forma de cromatina, sendo responsável pela regulação da transcrição, replicação e reparo do DNA. O nucleossomo, unidade fundamental da cromatina, compreende estrutura formada por uma sequência de DNA enrolada no octâmero de histonas, chegando a altos níveis de compactação que dão origem ao cromossomo. Para o estudo da estrutura do nucleossomo, é imprescindível a sua reconstituição *in vitro*, na qual faz-se necessário um método eficiente para a obtenção de histonas recombinantes. Existem diversos protocolos para expressão e purificação de histonas recombinantes publicados na literatura. Portanto, o objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo para obtenção de histonas canônicas recombinantes. Para estabelecimento do protocolo de expressão, duas cepas competentes de *E. coli* (*Rosetta gami* e *Rosetta pLysS*) foram testadas quanto a capacidade de produzir grande quantidade de histona recombinante por duas diferentes metodologias: expressão clássica com uso de IPTG e expressão espontânea. As histonas foram purificadas por extração de corpos de inclusão seguido por cromatografia de troca iônica. Surpreendentemente, os melhores resultados de expressão, para todas as histonas, foram obtidos pela metodologia de auto-expressão com uso de *Rosetta pLysS*. No entanto, com exceção da H3, bons resultados também foram adquiridos por expressão clássica com IPTG. Ajustes no protocolo de purificação foram realizados de forma a reduzir a degradação por proteases, grande desafio encontrado nesta etapa. A utilização de associação de inibidores favoreceu a modulação desta degradação. Assim, foi possível estabelecer um método para expressão e purificação de histonas de forma a obter grande quantidade de histona recombinante livres de degradação.

Palavras-chaves: cromatina, expressão, purificação, histonas recombinantes, nucleossomo.

ABSTRACT

Eukaryotic DNA is organized into chromatin that regulates gene transcription, DNA replication and repair. Nucleosomes, the basic unit of chromatin, are formed by a sequence of DNA wrapped around a histone octamer, achieving high levels of compaction that goes to chromosome. In order to reconstitute nucleosomes *in vitro* to perform structural studies on chromatin, it is necessary to have an efficient method for recombinant histone production. Although there is several established protocols for expression and purification of recombinant histones, our challenge is to adapt a protocol that will be compatible with laboratory. For establishment of histone expression protocol, two competent *E. coli* strains (*Rosetta gami* and *Rosetta pLysS*) were tested about the ability to produce large amounts of recombinant histone by two different methodologies: classical expression using IPTG and spontaneous expression. The human histones H2A, H2B, H3 e H4 were purified from inclusion body followed by ion exchange chromatography. Surprisingly, the best expression results for all histones were obtained by spontaneous expression methodology using *Rosetta pLysS*. However, with the exception of H3, good results were also acquired by classical expression with IPTG. Adjustments in purification protocol were performed in order to reduce degradation by proteases, a challenge encountered in this step. The use of association of inhibitors helped the modulation of degradation. Thus, it was possible to establish a method for expression and purification of histones in order to obtain large amounts of recombinant histone free of degradation.

Keywords: chromatin, expression, purification, recombinant histones, nucleosome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de amônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
HO	<i>Histone Octamer</i>
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria-Bertani
MPT	Modificações pós-traducionais
NaCl	Cloreto de Sódio
NCP	<i>Nucleosome Core Particle</i>
OD	Densidade óptica
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RPM	Rotações por minuto
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
kDa	Kilodaltons
mPa	Milipascal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do NCP.	2
Figura 2. Modelo de compactação da cromatina	3
Figura 3. Estrutura molecular das histonas do NCP	6
Figura 4. Principais modificações pós traducionais que ocorrem nas histonas e seus sítios reacionais.	7
Figura 5. Mecanismo de regulação da expressão gênica em procarioto sob o controle de IPTG.	11
Figura 6. Mapa circular dos vetores pET 3a utilizados neste trabalho.	17
Figura 7. Esquema ilustrativo que apresenta os processos relacionados à cromatografia por troca iônica.....	20
Figura 8. Transformação de Rosetta pLysS com plasmídeo pET 3a de H3.	24
Figura 9. Octâmero de histonas extraído de eritrócitos de galinha em SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue.	24
Figura 10. SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H2A.	25
Figura 11. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2A em Rosetta pLysS, na qual as colunas correspondem a banda de H2A e a banda de contaminante, a proteína do extrato bacteriano.	26
Figura 12. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H2B.	27
Figura 13. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em Rosetta gami	28
Figura 14. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em Rosetta pLysS	29
Figura 15. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H3.....	31
Figura 16. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H4.....	32
Figura 17. Densitometria das bandas do teste de expressão da H4 realizado em Rosetta pLysS.	33
Figura 18. Ensaio de expressão sem indução por IPTG em Rosetta pLysS com todas as histonas.....	34
Figura 19. Densitometria das bandas do teste de expressão espontânea realizado em Rosetta pLysS com todas as histonas..	35
Figura 20. Representação da purificação da H2A.....	37
Figura 21. Representação da purificação da H2B.....	38
Figura 22. Representação da purificação da H3.	40
Figura 23. Representação da purificação da H4	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais cepas de <i>E. coli</i> utilizadas para a produção de histonas recombinantes de acordo com a sequência da espécie do organismo.....	12
Tabela 2. Reagentes utilizados neste trabalho	14
Tabela 3. Equipamento utilizados neste trabalho	15
Tabela 4. Descrição das soluções utilizadas para preparação dos tampões descritos.....	19
Tabela 5. Composição dos tampões utilizados como fase móvel no sistema cromatográfico ÄKTA™ Pure	21
Tabela 6. Gradiente de método analítico utilizado para purificação cromatográfica conforme histona a ser purificada.....	21
Tabela 7. Composição da solução de diálise utilizada após purificação das histonas.....	22

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura da Cromatina	1
1.1.1. Estrutura do Nucleossomo.....	1
1.1.2. Conformação da cromatina.....	3
1.1.3. Estrutura das histonas	5
1.2. Expressão de proteínas recombinantes.....	8
1.2.1. Cepas bacterianas de <i>E. coli</i> : <i>Rosetta gami</i> e <i>Rosetta pLysS</i>	9
1.2.2. Expressão de histonas recombinantes	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODO.....	14
3.1. Materiais	14
3.1.1. Reagentes	14
3.1.2. Equipamentos.....	15
3.2. Métodos	15
3.2.1. Preparo de células competentes	15
3.2.2. Expressão de histonas recombinantes	16
3.2.2.1. Transformação bacteriana	16
3.2.2.2. Indução da expressão com IPTG	18
3.2.2.3. Expressão sem indução com IPTG	18
3.2.3. Purificação de histonas recombinantes	19
3.2.3.1. Lise celular e purificação dos corpos de inclusão.....	19
3.2.3.2. Purificação por cromatografia de troca iônica.....	20
3.2.4. Análise por eletroforese: SDS PAGE 15%.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Transformação de células competentes.....	23
4.2. Teste de Expressão induzido com IPTG	24
4.2.1. H2A	25
4.2.2. H2B	27
4.2.3. H3.....	29

4.2.4. H4.....	32
4.3. Teste de expressão não induzido por IPTG	33
4.4. Purificação	36
4.4.1. H2A	36
4.4.2. H2B	37
4.4.3. H3.....	38
4.4.4. H4.....	40
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura da Cromatina

Em organismos eucarióticos, o material genético encontra-se hierarquicamente organizado sob a forma de cromatina. Este complexo, formado por DNA e proteínas acessórias, apresenta estrutura altamente dinâmica que além de ser responsável por empacotar todo o material genético no interior do núcleo, também regula a acessibilidade do DNA a complexa maquinaria envolvida nos processos de transcrição, replicação e reparo do DNA (Venkatesh e Workman, 2015).

1.1.1. Estrutura do Nucleossomo

O nucleossomo é estrutura fundamental básica que compõe a cromatina e é considerado a primeira barreira transcricional (Zhu e Li, 2016), tendo em vista que a oclusão do DNA pela estrutura nucleossomal representa o maior impedimento para a ligação de fatores de transcrição. Entretanto, este modelo de barreira transcricional está sendo debatido. Um estudo recente (Nagaia *et al.*, 2017) comparou o nível transcricional entre a cromatina isolada de leveduras e o DNA livre, no qual verificou-se que a cromatina apresentou nível de transcrição gênica maior ao ser comparado ao DNA livre. Os nucleossomos que ocluía o TATA box não impediram a transcrição e, contrariamente, a estimularam. Portanto, o nucleossomo considerado como repressor gênico pode ser considerado, contraditoriamente, como fator promotor para a transcrição.

A estrutura do nucleossomo é relativamente conservada ao longo das espécies, desde *Archaea* até organismos superiores eucarióticos que possuem estrutura mais complexa (Mattioli *et al.*, 2017). É composto por 145-147 pares de base de DNA que se enrolam em torno de um complexo proteico, o octâmero de histonas (HO), composto por 4 histonas com duas cópias de cada (H2A, H2B, H3 e H4) (Luger *et al.*, 1997). A sequência de DNA que está associada ao octâmero de histonas fica protegida da digestão por enzimas endonucleases, diferentemente do DNA livre (*linker*), que é rapidamente digerido. Portanto, o termo “*nucleosome core particle*” (NCP) (figura 1) foi atribuído por ser um produto da digestão por *Micrococcal nuclease* em cromatina (Cutter e Hayes, 2015).

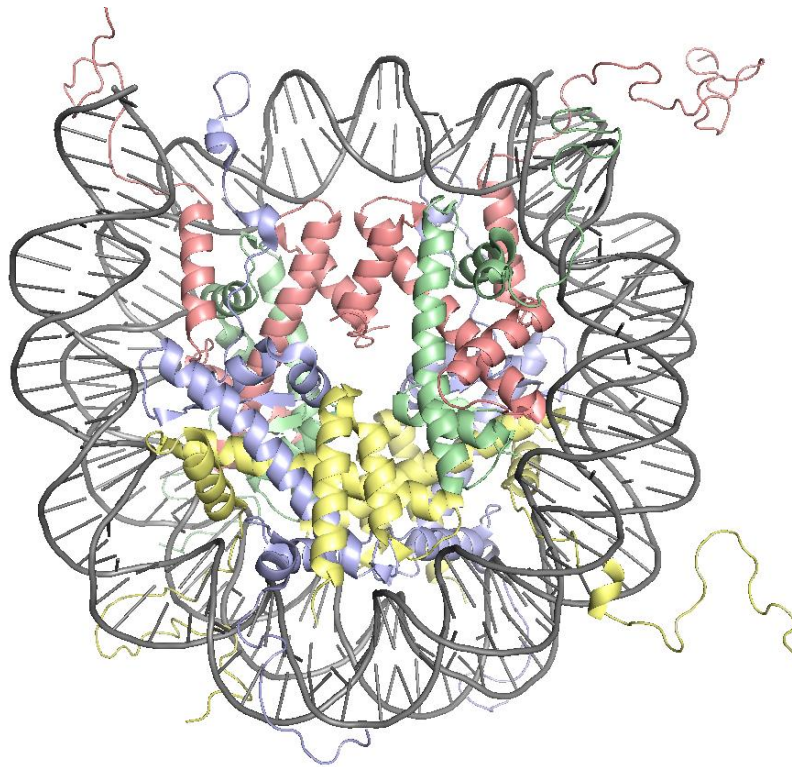


Figura 1. Estrutura do NCP. Coordenadas obtidas do PDB (IKX5). DNA é mostrado em cor cinza, H3 em rosa, H4 em verde, H2A em azul e H2B em amarelo. Representação obtida com o software PyMol Viewer™. Adaptado de (Davey *et al.*, 2002).

Indubitavelmente, a estrutura do nucleossomo e da própria fibra de cromatina são estabilizadas por interações do DNA com HO e proteínas acessórias. Estas interações ocorrem em regiões específicas do nucleossomo, principalmente nas caudas, na qual as caudas flexíveis das histonas conseguem se estender e interagir com o nucleossomo adjacente (Luger *et al.*, 2012), auxiliando nos processos de compactação, descompactação e estabilidade da fibra.

Os nucleossomos são conectados entre si por um segmento de *linker* DNA dando origem ao primeiro nível de compactação da cromatina, conhecido como “colar de contas”, cujo diâmetro é de 10 nm (Fazary *et al.*, 2017). Esta estrutura corresponde a forma permissiva da cromatina, uma vez que é possível encontrar regiões do DNA disponíveis a ligação à maquinaria transcricional. Os arranjos de nucleossomos podem se organizar em estruturas mais compactadas originando a fibra de 30 nm, cuja organização pode ser induzida por alguns fatores já descritos, como (i) ligação da *linker* histona H1 (Woodcock *et al.*, 2006; Zhu e Li, 2016), (ii) por modificações pós-traducionais nas caudas das histonas (Bartova *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008; Allahverdi *et al.*,

2011), (iii) presença de íons divalentes (Korolev *et al.*, 2010; Allahverdi *et al.*, 2015) (iv) interação da cauda da histona H4 (Kan *et al.*, 2009) e (v) ligação de *nucleosome binding molecules* (NBMs) (Da Silva *et al.*, 2015). Estes indutores da compactação da cromatina atuam de forma a neutralizar cargas remanescentes e, assim, os nucleossomos se aproximam, diminuindo a acessibilidade do DNA à maquinaria de transcrição gênica.

1.1.2. Conformação da cromatina

A organização da cromatina, como já mencionado anteriormente, é bastante dinâmica e varia de acordo com a etapa do ciclo celular e da necessidade de transcrição gênica. A estrutura nucleossomal contribui para a manutenção da dinamicidade da fibra de cromatina (Venkatesh e Workman, 2015).

A elucidação da estrutura da cromatina fornece subsídios para o entendimento da organização do genoma humano. A regulação da expressão gênica em organismos eucariotos compreende mecanismos complexos que ainda não foram completamente elucidados, mas já está bem estabelecida a sua correlação com a conformação da cromatina (Fazary *et al.*, 2017)

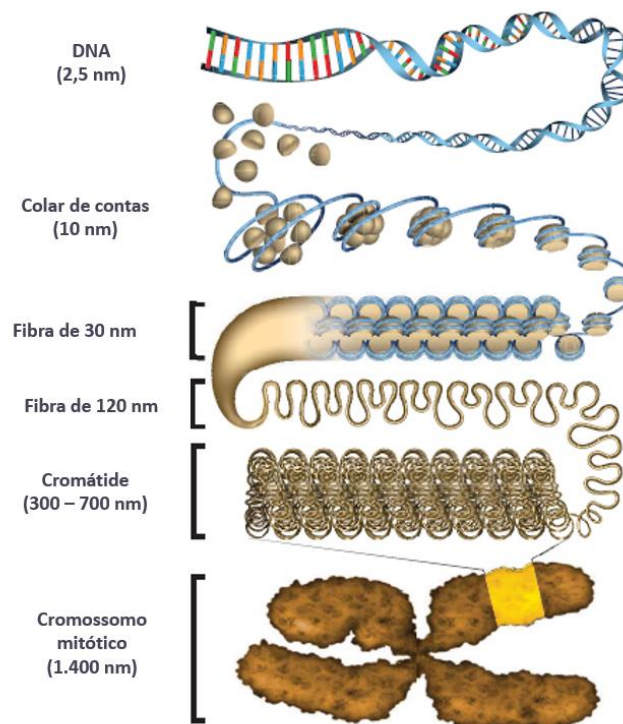


Figura 2. Modelo de compactação da cromatina. Estrutura do DNA hierarquicamente organizada no interior do núcleo de células eucarióticas, iniciando com a formação do nucleossomo, dando a origem a

fibra de 10 nm. Níveis de compactação superiores formam estruturas de 30 nm, 120nm, 700 nm até o nível máximo de cromossomo mitótico. Modelo observado *in vitro*. Adaptado de (Ou *et al.*, 2017)

Os diferentes estados conformacionais da cromatina (figura 2) foram descobertos ao observar a morfologia celular a partir de análises microscópicas, em que foram encontradas duas fases: a heterocromatina que representa o estágio mais denso com áreas compactadas, considerada transcricionalmente inerte, enquanto a eucromatina é caracterizada como o estágio aberto da fibra de cromatina, transcricionalmente ativa (Gaspar-Maia *et al.*, 2011; Nikolov e Taddei, 2016). Portanto, propôs-se a associação entre a heterocromatina e a repressão gênica. Além desta função biológica, as regiões de heterocromatina são importantes para a determinação espacial do genoma, que estão localizadas, geralmente, na periferia nuclear ou próximas ao nucléolo (Nikolov e Taddei, 2016).

A heterocromatina pode ser dividida em dois subgrupos: (i) a heterocromatina constitutiva que é constituída por regiões cromossômicas com funções na manutenção da estabilidade genômica e estruturais, como centrômeros e telômeros, as quais são regiões repetitivas e não codificantes (Nikolov e Taddei, 2016) e (ii) heterocromatina facultativa que ocorre em processos celulares que requerem silenciamento gênico, diferenciação e senescência celular, havendo mudança conformacional de eucromatina para heterocromatina (Sulli *et al.*, 2012).

Os processos fisiológicos relacionados a formação de heterocromatina nos sítios específicos e como a estrutura é mantida ao longo do ciclo celular ainda permanecem não elucidados.

Alguns conceitos relacionados a transcrição gênica estão sendo amplamente discutidos. O modelo hegemônico relacionado a ausência de expressão gênica quando a cromatina encontra-se compactada está sendo estudado e já foi demonstrada a presença de transcrição gênica em um modelo de cromatina mais compactado que a fibra de 30 nm (Hu *et al.*, 2009). Acredita-se na ocorrência de um estado interestaçoado que facilita o acesso da maquinaria transcricional ao DNA através de movimentos dinâmicos de nucleossomos (Luger *et al.*, 2012).

Outro estudo recentemente publicado (Strom *et al.*, 2017) explica a formação de regiões de heterocromatina a partir de separação de fases no interior celular. A ligação

da *linker* histona HP1 induz a compactação da cromatina e a formação de gotículas, demonstrando que regiões de heterocromatina exibem dinamismo característico de separação de fases líquido-líquido. Portanto, estas características biofísicas de formação de micro-ambientes no interior celular podem explicar a existência de compartimentos celulares que não são individualizados por membranas.

1.1.3. Estrutura das histonas

As histonas são proteínas de caráter básico devido à alta concentração de resíduos de lisina e arginina, carregados positivamente, que auxilia na ligação íntima ao DNA, que possui carga residual negativa. Esta interação é mediada por ligações iônicas entre os radicais de fosfato da estrutura do DNA e os dos radicais amino presentes no aminoácidos das histonas (Chakravarthy *et al.*, 2005). As histonas pertencentes ao NCP são proteínas relativamente pequenas (11 – 15 KDa), variando entre si em relação ao peso molecular e a composição de aminoácidos (Luger, 2001; Mcginty e Tan, 2015).

A estrutura proteica das histonas favorece sua organização, de forma que as histonas H3 e H4 formam um tetrâmero central, enquanto as histonas H2A e H2B formam dois dímeros, que associados aos lados do tetrâmero formam a estrutura octamérica (Richmond *et al.*, 1984). As histonas possuem estrutura conservada ao longo do processo evolutivo e entre espécies, apresentando dois domínios estruturais principais: (i) domínio globular central ou motivo de dobra, responsável pelas interações entre as histonas e (ii) região N-terminal, formando estruturas flexíveis (caudas), passíveis de interação internucleossomal e com o *linker* DNA (Leonardo Mariño-Ramírez, 2005).

Oportunamente, compartilham estrutura molecular comum que consiste de 3 regiões em α -hélice ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) intercaladas por 2 *loops* (L1 e L2) de acordo com a estrutura representada na figura 3, originando o motivo de dobra da histona. As estruturas $\alpha 1$ e $\alpha 3$, por serem menores e conectadas aos *loops*, conseguem se flexionar perpendicularmente a $\alpha 2$. Portanto, por complementariedade estrutural, as histonas se organizam sob a forma de heterodímeros (Mcginty e Tan, 2015).

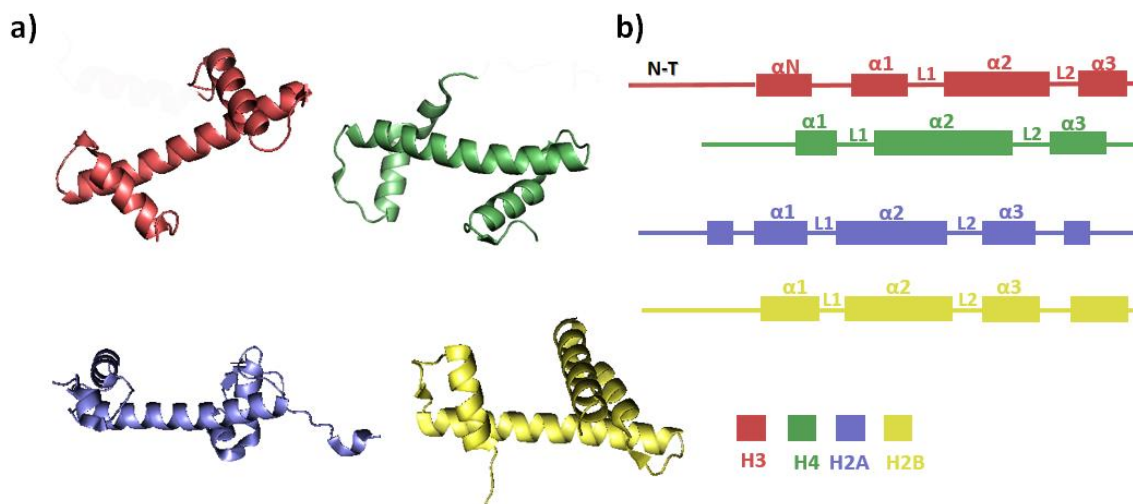


Figura 3. Estrutura molecular das histonas do NCP. a) estrutura terciária das histonas mostrando estruturas em α -hélices e loops. b) esquema representativo dos domínios estruturais de cada histona. As caudas N-terminais estão representadas à esquerda da figura. Coordenadas obtidas do PDB (IKX5). Modelo baseado em (McGinty e Tan, 2015)

Em um único nucleossomo existem 10 caudas flexíveis, 1 cauda N-terminal proveniente de cada uma das histonas do NCP e 2 caudas adicionais advindas da porção C-terminal de cada H2A (Iwasaki *et al.*, 2013). As caudas das histonas também são responsáveis pela manutenção da integridade estrutural do NCP. A remoção das caudas promove o aumento da acessibilidade ao DNA nucleossomal, provavelmente, por dois processos distintos: pelo aumento da dinâmica nucleossomal e pela redução da sua estabilidade (Iwasaki *et al.*, 2013; Chereji e Morozov, 2015; Wakamori *et al.*, 2015).

A modulação da cromatina através de modificações por ligações covalentes é uma das principais maneiras de regular a acessibilidade do DNA frente aos processos de regulação do material genético. As caudas são os principais alvos destas modificações pós-traducionais (MPTs). Estas modificações atuam de forma a alterar a carga eletrostática residual das histonas e, portanto, a estrutura da fibra de cromatina. Além disso, altera os domínios de ligação a proteínas acessórias reguladoras da transcrição, replicação e reparo (Chi *et al.*, 2010; Tessarz e Kouzarides, 2014). Portanto, foi estabelecido que alterações epigenéticas envolvendo modificações pós-traducionais em histonas estão diretamente relacionadas a desregulação de expressão gênica e, conseqüentemente, a um processo de tumorigênese (Chi *et al.*, 2010; Marks *et al.*, 2016).

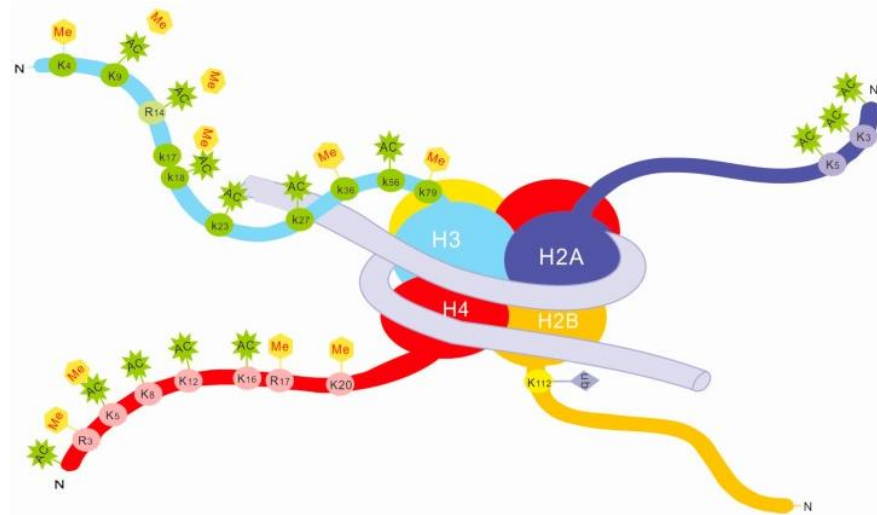


Figura 4. Principais modificações pós traducionais que ocorrem nas histonas e seus sítios reacionais. Retirado de (Wu *et al.*, 2015).

As principais MPTs estão retratadas na figura 4, sendo elas acetilação, metilação, ubiquitinação e fosforilação. Tais modificações levam a ativação ou supressão da transcrição de genes específicos. A acetilação foi a primeira modificação caracterizada e está relacionada a ativação da transcrição gênica. O grupamento acetil, que possui carga residual negativa, reduz a carga positiva da cauda das histonas, neutralizando-a e impedindo a interação com o DNA e com o nucleossomo adjacente, resultando em um relaxamento da fibra de cromatina (Kato *et al.*, 2015).

Já a metilação possui comportamento dual, dependendo da posição do resíduo modificado, podendo ativar ou suprimir a transcrição gênica. A metilação das lisinas 4 e 36 da H3 levam a abertura da cromatina e a ativação da expressão gênica. Contudo, metilação nas lisinas 9 e 27 levam ao silenciamento gênico (Gezer e Holdenrieder, 2014). A fosforilação nos resíduos de serina e tirosina possui efeitos sobre a divisão celular (marcadores da mitose), regulação da transcrição e reparo do DNA (Rossetto *et al.*, 2012).

Além destas modificações, a estrutura dos nucleossomos e da cromatina podem ser alteradas pela incorporação de histonas variantes. Esta substituição muda as propriedades dos nucleossomos e modifica a interação com proteínas remodeladoras da cromatina. Geralmente, o impacto destas substituições é profundo, alterando processos de regulação do genoma.

A histona H2A é a histona que possui maior número de variantes, entre elas H2A.Z, H2A.X, H2A.B e MacroH2A. Tais variantes são caracterizadas por alterações na cadeia C-terminal e por sua localização no genoma. Por exemplo, a H2A.Z e H2A.B estão relacionadas à ativação transcricional. A presença da H2A.Z já foi descrita em regiões de alta transcrição gênica associada ao processo de carcinogênese (Vardabasso *et al.*, 2014). Entretanto, a macroH2A está relacionada a imobilidade nucleossomal e consequente silenciamento transcricional (Biterge e Schneider, 2014; Weber e Henikoff, 2014). A histona H2B possui algumas apresentações de variantes e, geralmente, está relacionada a compactação da cromatina durante a gametogênese em espermatozoides humanos (Rea *et al.*, 2016). As variantes de histona H3 incluem H3.Y, H3.3, CENP-A, H3.4, entre outras. A variante H3.3 está, geralmente, associada a regiões ativas do genoma, induzindo maior transcrição gênica, embora já esteja descrito a existência de atividade dual desta variante, posto que já foi encontrado presença da H3.3 em regiões de heterocromatina e telômeros (Szenker *et al.*, 2011; Buschbeck e Hake, 2017). A histona H4, que possui uma extensa interação com as outras histonas e também com os nucleossomos adjacentes, é considerada a mais conservada e não possui espécies variantes (Vardabasso *et al.*, 2014).

1.2. Expressão de proteínas recombinantes

O grande marco da biologia molecular foi, sem dúvidas, a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953. Esta descoberta promoveu o desenvolvimento da biologia molecular, cujo advento possibilitou o reconhecimento do DNA como material genético transmissor da informação gênica.

Uma técnica molecular da biologia molecular é a expressão de proteínas recombinantes de interesse biológico em microrganismos. Tal técnica, amplamente utilizada, vem sendo estudada e aplicada como técnica substancial em pesquisa nesta área (Baneyx, 1999). O estudo do mecanismo de expressão gênica em organismos procariotos e eucariotos possibilitou a manipulação de proteínas heterólogas, de forma a utilizá-los como sistemas alternativos, como por exemplo o uso de bactérias, leveduras, células de inseto e de mamíferos sob o controle de determinado promotor, na qual a

expressão de proteínas recombinantes pode ser induzida ou contínua (Rai e Padh, 2001; Schumann e Ferreira, 2004)

A utilização de cepas bacterianas de *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes é atrativa, pois trata-se de um organismo que possui habilidade de crescer rapidamente em meios de cultura simples e capacidade de produzir grande quantidade de proteínas recombinantes (Baneyx, 1999). Seu genoma e mecanismo de regulação da expressão gênica são amplamente caracterizados, que de fato, auxiliam no manejo experimental da expressão gênica (Baneyx, 1999; Selleck e Tan, 2008).

Contudo, a expressão de proteínas de eucariotos em *E. coli* encontra algumas limitações, como a formação de proteínas agregadas e insolúveis expressas sob a forma de corpos de inclusão no citoplasma bacteriano. Desta forma, sabe-se da necessidade de procedimentos adicionais de solubilização das proteínas precipitadas por desnaturação e etapa posterior de renaturação para conduzi-las à sua conformação nativa/ativa (Rosano e Ceccarelli, 2014). Além de o sistema bacteriano não permitir a ocorrência de modificações pós-traducionais por ausência de maquinaria necessária (Sorensen e Mortensen, 2005; Vincentelli e Romier, 2013). De forma a superar as limitações, como as descritas acima, novas estratégias de expressão, como proteínas fusionadas, por exemplo, vêm sendo desenvolvidas de modo a reduzir a formação de corpos de inclusão, toxicidade e melhorar a estabilidade do RNAm. (Jia e Jeon, 2016; Han *et al.*, 2017).

1.2.1. Cepas bacterianas de *E. coli*: *Rosetta gami* e *Rosetta pLysS*

A utilização abundante da *E. coli* promoveu o desenvolvimento de várias cepas bacterianas mutantes, com o objetivo de aumentar e facilitar a expressão gênica. (Fathi-Roudsari *et al.*, 2016). Dentre as disponíveis atualmente, as cepas *Rosetta gami* e *Rosetta pLysS* são derivadas da BL21, também cepa de *E. coli*, amplamente utilizada para expressão de proteínas.

- *Rosetta (DE3) pLysS*: Como cepa derivada da BL21, possui deficiência de serina e aspartil proteases, respectivamente, nos genes *lon* e *ompT* (Jiang *et al.*, 2002). Esta cepa possui RNA transportadores para códons raramente utilizados em *E.*

coli (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA). O lisogene DE3 codifica o gene para T7 RNA polimerase, o qual está sob o controle do promotor *lacUV5* e necessita de IPTG para induzir a expressão gênica (figura 5). O plasmídeo pLysS confere um mecanismo de regulação sobre o promotor T7, na qual produz lisozima T7, repressora da T7 polimerase, utilizado para reduzir o nível de expressão basal do gene de interesse até a adição do indutor (Zhang e Studier, 1997). Este mecanismo de regulação é relevante para a expressão de proteínas com alta toxicidade. Esta cepa é indicada para a produção de proteínas cujos genes estão em vetores de clonagem pET (Novagen; 2003).

- *Rosetta gami*: Esta cepa possui características combinadas das linhagens *Rosetta* e *Origami*. Possui deficiência de expressão de serina e aspartil protease, respectivamente, nos genes *lon* e *ompT* (Jiang et al., 2002). Possui RNA transportadores para códons raramente utilizados em *E. coli* (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA). E como característica da *Origami*, apresenta mutações nos genes *trxB* e *gor* que favorecem a formação de pontes dissulfeto na proteína expressa. Esta cepa é indicada para a produção de proteínas cujos genes estão em vetores de clonagem pET (Novagen; 2003).

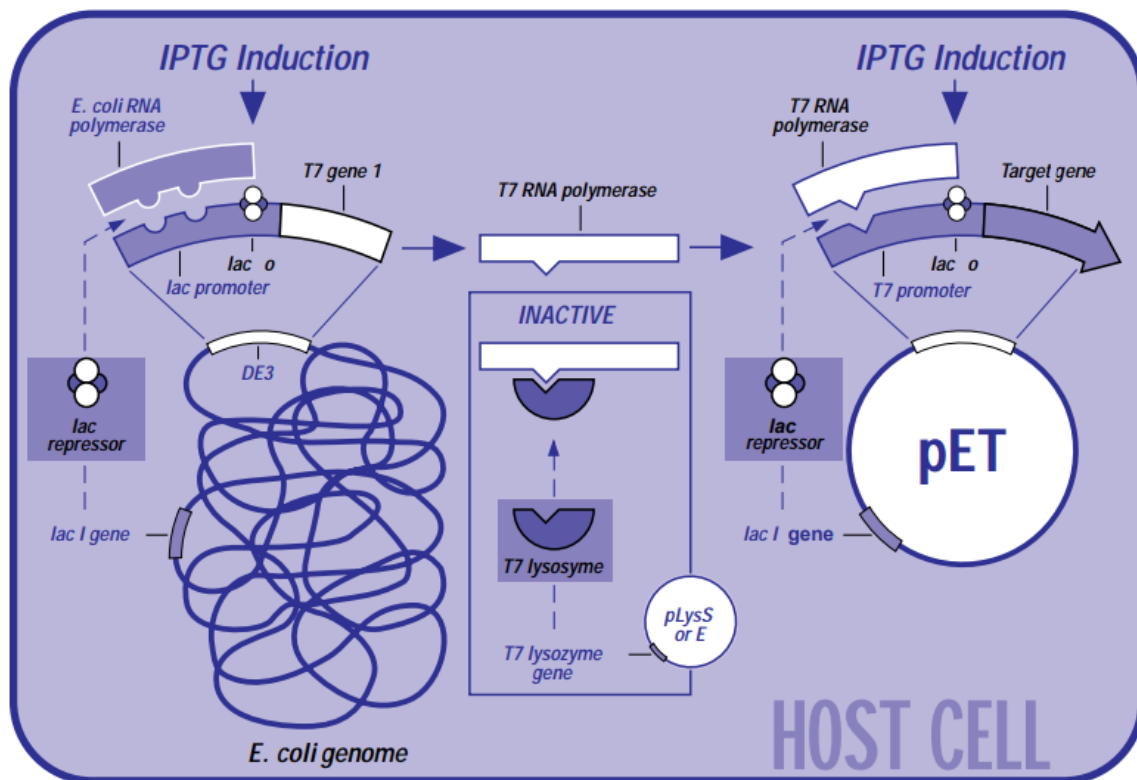


Figura 5. Mecanismo de regulação da expressão gênica em procarionto sob o controle de IPTG. O IPTG é um isômero da alolactose, metabólito da lactose responsável por se ligar ao repressor do operon lac e induzir a expressão gênica. A inibição do repressor lac promove a ligação da RNA polimerase a estrutura do promotor no operon lac, iniciando a produção da T7 polimerase, que por sua vez, atua a nível do promotor T7 localizado no vetor plasmidial e inicia a expressão das proteínas recombinantes inseridas neste vetor. A atividade basal da T7 polimerase é parcialmente inibida pela lisozima T7, proveniente do plasmídeo pLysS. A indução por IPTG suprime a atividade da lisozima T7, acarretando em superexpressão proteica (Novagen).

1.2.2. Expressão de histonas recombinantes

Para a melhor compreensão dos aspectos estruturais da cromatina, foi estabelecido uma técnica para sua reconstituição *in vitro*, a partir de histonas endógenas (extraídas de células de mamíferos ou galinha) ou recombinantes (Laskey, 1989), utilizando uma sequência sintética de DNA 601 Widom (P. T. Lowary, 1998). Nesta sequência há maior afinidade entre o octâmero de histonas e a fita de DNA, permitindo assim, o posicionamento correto do DNA ao HO.

Para o estudo com histonas humanas canônicas e variantes, é necessário obter uma preparação homogênea das proteínas de interesse. Grandes quantidades de histonas podem ser extraídas de culturas de células de mamíferos e de células sanguíneas. Contudo, as histonas podem ser heterogeneamente modificadas no interior

celular, dificultando a extração e uso dessas proteínas sob essas condições. Portanto, iniciou-se estudo para expressar e purificar histonas recombinantes em organismos procarióticos. A primeira metodologia foi descrita em 1999 (Luger. *et al.*, 1999) e já relatava as vantagens em utilizar histonas recombinantes e as limitações em utilizar histonas extraídas de material biológico. Desde então, vários trabalhos já utilizam histonas recombinantes expressas em diversas cepas bacterianas (tabela 1).

Tabela 1. Principais cepas de *E. coli* utilizadas para a produção de histonas recombinantes de acordo com a sequência da espécie do organismo.

Cepa	Espécie	Referência
BL21(DE3)	<i>Homo sapiens</i>	(Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Rudnizky <i>et al.</i> , 2016; Bhattacharya <i>et al.</i> , 2017)
BL21(DE3) pLysS	<i>Xenopus laevis</i>	(Luger. <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. coli</i> (não especificada)	<i>Xenopus laevis</i>	(An <i>et al.</i> , 2002; Thiriet, 2004)
<i>E. coli</i> (não especificada)	<i>Homo sapiens</i>	(Arimura <i>et al.</i> , 2013)
Rosetta (DE3) pLysS	<i>Homo sapiens</i>	(Thangadurai <i>et al.</i> , 2008; Thakar <i>et al.</i> , 2009; Hudson <i>et al.</i> , 2015)
Rosetta 2(DE3) pLysS	<i>Homo sapiens</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2012)

Entretanto, o nosso grupo de pesquisa vem delineando seus estudos (Silva *et al.*, 2017; Teles, 2017) com histonas extraídas de eritrócitos de galinha, por possuírem sequências próximas a humanas e algumas modificações pós-traducionais naturais, já elucidadas em estudos anteriores (Zhang e Tangb, 2003).

Diante da importância da continuação dos estudos em cromatina, a expressão de histonas recombinantes permite a obtenção de grande quantidade de proteínas homogêneas e sem modificações pós-traducionais, proporcionando a realização de ensaios de caracterização físico-química com mutações pontuais e histonas variantes. Deste modo, a realização deste trabalho de mestrado pretendeu contribuir de forma a subsidiar a continuação dos estudos estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer metodologia para expressão e purificação de histonas canônicas humanas no laboratório de Farmacologia Molecular (Faculdade de Ciências da Saúde, UnB).

2.2. Objetivos específicos

- Transformação de células competentes *E. coli*, cepas *Rosetta gami* e *Rosetta pLysS*, com plasmídeos de histonas humanas;
- Comparar a expressão de histonas recombinantes nas cepas *Rosetta gami* e *Rosetta pLysS*;
- Purificação por extração de corpos de inclusão e cromatografia por troca iônica;

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos na tabela abaixo. Os reagentes possuíam grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia.

Tabela 2. Reagentes utilizados neste trabalho

Reagente	Fabricante
Acetona	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ácido acético	Sigma Aldrich Co., EUA
Ácido clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ampicilina	Sigma Aldrich Co., EUA
Bromofenol	Merck, ALE
Cloranfenicol	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de guanidina	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Coomassie blue	Merck, ALE
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich Co., EUA
Ditiotreitol (DTT)	GE <i>Healthcare</i> , UK
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	Sigma Aldrich Co., EUA
EDTA	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Extrato de Levedura	Neogen Corporation, EUA
Glicerol	Sigma Aldrich Co., EUA
Glicina	Sigma Aldrich Co., EUA
Hidróxido de Sódio	Hexis, BRA
IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalacto pyranoside)	Sigma Aldrich Co. , EUA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Persulfato de amônio (APS)	Bio-rad, EUA
PIC (<i>Protease Inhibitor cocktail</i>)	Sigma Aldrich Co., EUA
PMSF	Sigma Aldrich Co., EUA
Poliacrilamida	Sigma Aldrich Co., EUA
TEMED	Sigma Aldrich Co., EUA
Triptona	Neogen Corporation, EUA
Tris	Promega, EUA
Triton X-100	Sigma Aldrich Co. , EUA
Ureia	Sigma Aldrich Co. , EUA
β -Mercaptoetanol	Sigma Aldrich Co. , EUA

Cepas bacterianas (Rosetta gami e Rosetta pLysS)	Merck, ALE
Colunas HiTrap Q FF e HiTrap SP FF	GE Healthcare Life Sciences, UK

3.1.2. Equipamentos

Tabela 3. Equipamento utilizados neste trabalho

Equipamento	Fabricante
Balança analítica	Shimadzu do Brasil, BRA
Balança semi-analítica	Sartorius, ALE
Banho-maria digital	Braun Biotech International, ALE
Centrifuga de microtubos	Hermle, ALE
Espectrofotômetro UV-Vis	Shimadzu do Brasil, BRA
FPLC – ÄKTA™ Pure	GE Healthcare Life Sciences, UK
Homogeneizador circular de tubos	Taiyo Co ., Ltd., JAP
pHmetro	Jenway, UK
Shaker	New Brunswick Scientific, EUA
Sonicador	Sonics, EUA
Fotodocumentador Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Sciences, UK
Aparato de eletroforese	Bio-rad, EUA

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo de células competentes

O preparo de células competentes foi realizado segundo o protocolo de técnicas do Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (Sambrock *et al.*, 2001). O preparo das células foi realizado com as cepas *Rosetta gami* e *Rosetta pLySs*.

Inicialmente, 10 µL de suspensão bacteriana foram adicionados a uma placa contendo meio de cultura sólido suplementado com antibacterianos (kanamicina ou cloranfenicol), de acordo com o perfil de resistência de cada cepa, por meio da técnica de esgotamento. Esta técnica foi utilizada com objetivo de obter colônias puras e isoladas. As placas foram incubadas período *overnight* a 37°C.

Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com antibacteriano (kanamicina 50 µg/mL ou cloranfenicol 20 µg/mL), crescidas a 37°C, *overnight*, sob

agitação constante de 150 rpm. Em seguida, 3 mL foram transferidos para 100 mL de meio LB suplementado por antibacteriano. Ao atingir densidade óptica (O.D.) a 600 nm de 0.4/0.5, a suspensão celular foi retirada da incubadora e centrifugada a 3000 rpm, 4°C durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em solução de 50 mM de CaCl₂ e incubado no gelo durante 15 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada utilizando os mesmos parâmetros, o *pellet* foi ressuscitado em CaCl₂ e glicerol e, finalmente, aliquotados para usos posteriores.

3.2.2. Expressão de histonas recombinantes

3.2.2.1. Transformação bacteriana

Transformação é o processo no qual um DNA exógeno é inserido em uma célula bacteriana. A metodologia utilizada foi de choque térmico em células quimicamente competentes previamente tratadas com cloreto de cálcio, conforme protocolo acima. O preparo foi realizado, novamente, segundo o protocolo de técnicas do Laboratório de Farmacologia Molecular (Sambrock *et al.*, 2001).

Inicialmente, 1 µL de DNA plasmidial foi adicionado a 50 µL de estoque de células competentes e incubadas em gelo. O choque térmico foi realizado por incubação em banho-maria a 42°C durante 1 minutos e 30 segundos. Seguidamente, as células foram, novamente, colocadas em gelo por cerca de 5 minutos. O choque térmico induz um desequilíbrio entre o interior celular e ambiente externo, criando “poros” na membrana da bactéria que favorece a entrada do DNA plasmidial.

Para recuperação das bactérias após o choque térmico, foram adicionados 500 µL de meio de cultura LB e a cultura foi colocada em incubadora a 37°C e sob agitação constante de 150 rpm durante 1 hora.

Seguidamente, 200 µL desta suspensão bacteriana foram inoculados em placa de ágar suplementado com ampicilina 100 µg/mL, visto que o plasmídeo utilizado, pET3a (figura 6), possui gene de resistência (β -lactamase) à ampicilina, ou seja, marca utilizada como mecanismo de seleção de bactérias transformadas. As placas foram colocadas em incubadora a 37°C durante período *overnight*.

Para garantir o controle sobre o experimento e detectar possíveis contaminações cruzadas, bactérias não transformadas também foram inoculadas em placas contendo ampicilina.

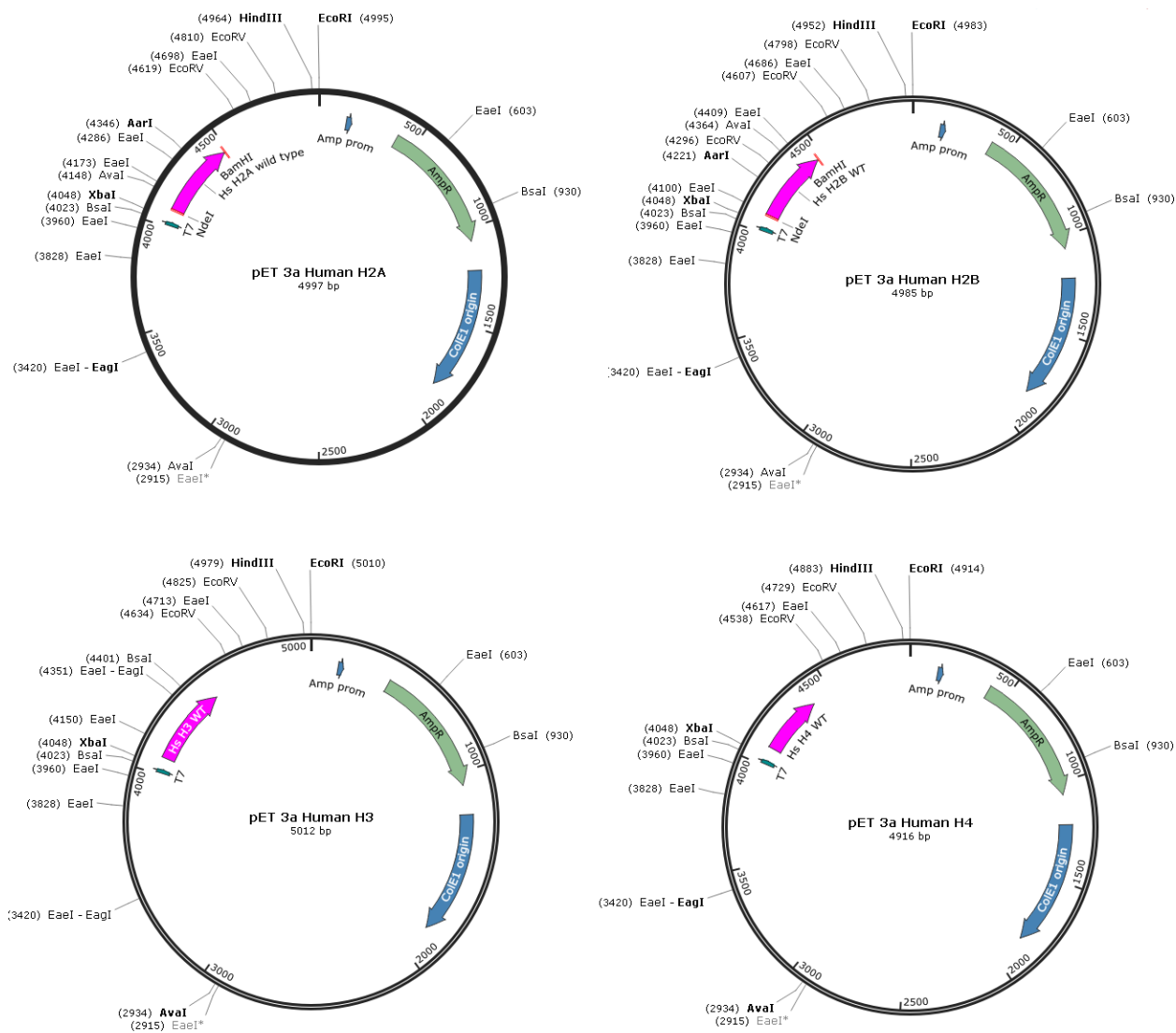


Figura 6. Mapa circular dos vetores pET 3a utilizados neste trabalho. Os plasmídeos utilizados foram cedidos ao professor Guilherme Santos pelo professor John Schwabe, do departamento de biologia celular e molecular da Universidade de Leicester, Inglaterra. A representação gráfica foi obtida utilizando o software SnapGene Viewer™ 4.0.5.

3.2.2.2. Indução da expressão com IPTG

Após o crescimento das colônias nas placas com ampicilina, uma colônia isolada foi retirada, com auxílio de alça estéril, e inoculada em 5 mL de meio de cultura líquido LB acrescentado de ampicilina 60 µg/mL. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante de 150 rpm durante 8 horas.

Em seguida, esta cultura bacteriana foi transferida para 100 mL de meio de cultura 2xTY acrescido de ampicilina e incubada a 37°C sob agitação constante de 150 rpm *overnight*. Na sequência, 30 mL da cultura anterior foram transferidos para 1000 mL (larga escala) de meio de cultura 2xTY suplementado com 60 µg/mL de ampicilina. Ao atingir determinada O.D. a 600 nm, específica para cada histona, as culturas foram suplementadas com 0,5 mM de IPTG a 37 °C por 2 h sob agitação constante.

As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4200 rpm durante 20 minutos e o *pellet* resultante foi armazenado a -20°C para posterior purificação.

O extrato bacteriano foi analisado em gel SDS-PAGE 15% para avaliação da expressão das histonas.

3.2.2.3. Expressão sem indução com IPTG

Uma colônia isolada foi retirada da placa de transformação e inoculada em 5 mL de meio de cultura líquido LB acrescentado de ampicilina 60 µg/mL. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante de 150 rpm durante 8 horas.

Para expressão em larga escala, 1 mL desta cultura foi transferido para 1000 mL de meio 2xTY suplementado com ampicilina 100 µg/mL e incubado a 37°C sob agitação constante por período *overnight*.

As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4200 rpm durante 20 minutos e o *pellet* foi armazenado a -20°C para posterior purificação.

O extrato bacteriano foi analisado por SDS-PAGE 15% para avaliação da expressão das histonas.

3.2.3. Purificação de histonas recombinantes

3.2.3.1. Lise celular e purificação dos corpos de inclusão

A etapa de lise celular consistiu em solubilizar o *pellet* de bactérias em tampão de lise, descrito na tabela 4, com sonicação subsequente a 4°C (Pulsos de 1 segundo com intervalo de 1 segundo entre si, com amplitude de 50, durante 3 min).

O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado com tampão de lise contendo Triton X-100 1% (v/v) e centrifugado sob as mesmas condições anteriores. Este processo foi repetido duas vezes. Novamente, o *pellet* foi lavado em tampão de lise sem a presença de Triton X-100 por mais 2 vezes.

Sequencialmente, o *pellet* foi ressuspendido e solubilizado em DMSO e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. Os corpos de inclusão foram extraídos em tampão desnaturante (*Unfolding buffer*) contendo cloreto de guanidina e colocados em agitador circular durante 30 minutos. A suspensão resultante foi centrifugada 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recuperado e colocado em membrana de diálise (*SnakeSkin* 3.5 KDa *cut off*) para a realização de diálises sequenciais em tampão de ureia (tampão de diálise) para retirada da alta concentração de cloreto de guanidina. A primeira diálise foi realizada em período de 1h, a segunda em 3h e a terceira *overnight*. As diálises foram realizadas a temperatura de 4°C.

Tabela 4. Descrição das soluções utilizadas para preparação dos tampões descritos.

Tampão de Lise	<i>Unfolding buffer</i>	Tampão de diálise
50 mM Tris pH 7.6	6 M Cloreto de Guanidina	7 M Ureia
0,1 M NaCl	20 mM Tris pH 7.6	0,1 M NaCl
1 mM EDTA	5 mM DTT	1 mM EDTA
5 mM β-mercaptoethanol		5 mM β-mercaptoethanol
0,2 mM PMSF		0,2 mM PMSF
500 µL PIC		
2 mL Triton X-100		10 mM Tris pH 8.0

3.2.3.2. Purificação por cromatografia de troca iônica

A separação por cromatografia por troca iônica é baseada na interação reversível entre a carga da proteína e a carga oposta da resina da coluna. As proteínas interagem com a resina, conforme percorrem o volume da coluna. A eluição das proteínas é realizada pelo aumento gradual da concentração de sal (NaCl) e as frações são recolhidas de acordo com a competição do NaCl pela resina (GE Healthcare, 2007). A figura 7 ilustra, com representação de cromatograma, as etapas realizadas no processo de purificação.

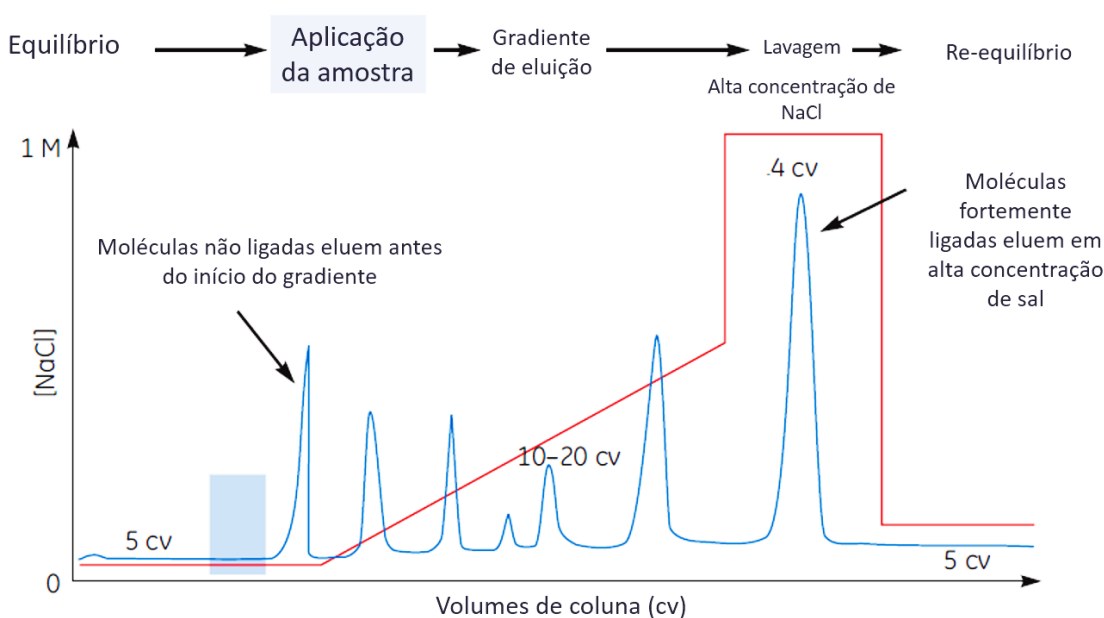


Figura 7. Esquema ilustrativo que apresenta os processos relacionados à cromatografia por troca iônica. Adaptado de (Ge Healthcare, 2007).

A purificação por cromatografia por troca iônica foi realizada no equipamento ÄKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences) utilizando as colunas aniônica HiTrap Q FF e catiônica HiTrap SP FF, ambas com volume de 5 mL e pressão máxima de 0.5 mPa.

A amostra dialisada foi filtrada em filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm e injetada no equipamento ÄKTA™ Pure. A amostra foi injetada com sistema previamente equilibrado. No início da corrida, as duas colunas estavam conectadas ao sistema cromatográfico. Após passagem da amostra pelas colunas, apenas a coluna catiônica HiTrap SP FF permaneceu conectada para dar prosseguimento a eluição com gradiente de fase móvel.

As histonas foram eluídas da coluna utilizando gradiente linear com tampão contendo 1 M NaCl, os tampões utilizados no sistema cromatográfico estão descritos na tabela 5. Os gradientes de eluição estão descritos na tabela 6 e variavam de acordo com a histona a ser purificada sob fluxo constante de 5 mL/min.

Tabela 5. Composição dos tampões utilizados como fase móvel no sistema cromatográfico ÄKTA™ Pure

Fase Móvel A	Fase Móvel B
7 M Ureia	7 M Ureia
1mM EDTA	1mM EDTA
10 mM Tris pH 8.0	10 mM Tris pH 8.0
1 mM DTT	1 mM DTT
0,2 mM PMSF	0,2 mM PMSF
	1 M NaCl

Tabela 6. Gradiente de método analítico utilizado para purificação cromatográfica conforme histona a ser purificada.

	Concentração – Fase móvel B (%)							
	H2A		H2B		H3		H4	
Equilíbrio		10%		10%		20%		20%
Injeção de amostra		10%		10%		20%		20%
	0 mL	10%	0 mL	10%	0 mL	20%	0 mL	20%
	30 mL	20%	30 mL	20%	25 mL	20%	25 mL	20%
Gradiente de eluição	230 mL	50%	230 mL	50%	30 mL	25%	30 mL	25%
	240 mL	100%	240 mL	100%	300 mL	60%	300 mL	100%
	300 mL	100%	300 mL	100%	301 mL	100%	350 mL	100%
					350 mL	100%		

Após finalização da corrida cromatográfica, as frações coletadas de histonas purificadas foram analisadas por gel SDS-PAGE 15% e colocadas novamente em sacos de diálise (3.5 KDa *cut off*) para diálises em água ultrapura para retirada da ureia. Foram realizadas 3 diálises, a primeira durante período *overnight*, a segunda durante 8 horas e

terceira, *overnight* novamente. A composição da solução de diálise em água está descrita na tabela 8.

Ao final da diálise, a amostra foi congelada a -20°C para posterior liofilização realizada pelo Laboratório de Produtos Naturais, Universidade de Brasília.

Tabela 7. Composição da solução de diálise utilizada após purificação das histonas.

Solução de diálise
2,5 L de água ultrapura
5 mM β -mercaptoethanol
0,2 mM PMSF

3.2.4. Análise por eletroforese: SDS PAGE 15%

A técnica de eletroforese desnaturante foi realizada para análise dos extratos proteicos bacterianos após indução de expressão e para frações recolhidas de histonas purificadas.

As amostras foram separadas por SDS/PAGE com 15% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida. Às amostras foi acrescentado tampão de carregamento (descrito na tabela 8) de composição desnaturante e as amostras foram fervidas durante 3 minutos. Para a corrida eletroforética, foi utilizado tampão de corrida sob voltagem de 110 V. O gel foi corado com Azul de Coomassie e a imagem foi obtida com auxílio do equipamento Amersham ImagerTM 600 (GE *Healthcare Life Sciences*), empregando o modo colorimétrico (Trans-iluminação) sob exposição automática da luz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização de diversos ensaios bioquímicos e estruturais com cromatina ou nucleossomo, é necessário realizar a reconstituição destes complexos *in vitro*. Para tanto, é necessário a sequência de DNA 601 Widow e o octâmero de histonas, recombinantes ou extraídas de fontes animais. Já existem diversas metodologias de expressão de histonas recombinantes publicadas na literatura (Tanaka *et al.*, 2004; Kallappagoudar *et al.*, 2013; Rogge *et al.*, 2013; Henrike Klinker, 2014). Portanto, o desafio deste estudo foi estabelecer um protocolo de acordo com as condições do laboratório.

4.1. Transformação de células competentes

A transformação de células bacterianas é a primeira etapa a ser realizada para a expressão de proteínas recombinantes, que consiste na inserção do DNA exógeno à bactéria. A técnica utilizada de choque térmico induz um desequilíbrio entre o interior e o exterior celular favorecendo a entrada do DNA por meio da formação de poros na parede celular bacteriana e ainda, o tratamento com cloreto de cálcio, realizado nas cepas para torná-las competentes, auxilia para reduzir a repulsão eletrostática entre o DNA e a parede bacteriana.

A seleção de bactérias transformadas deu-se por meio do crescimento em placas contendo ampicilina, uma vez que os plasmídeos possuíam esta marca de resistência. Portanto, apenas bactérias que possuíam este plasmídeo cresceram no meio suplementado com antibiótico.

A figura 8 representa uma placa de transformação de *Rosetta pLysS* com plasmídeo H3. Todas as placas deste trabalho apresentaram colônias numerosas e exibiram características similares, como cor, tamanho e aspecto: colônias brancas, de 1 a 2 mm e com aspecto liso, característicos de *E. coli*.

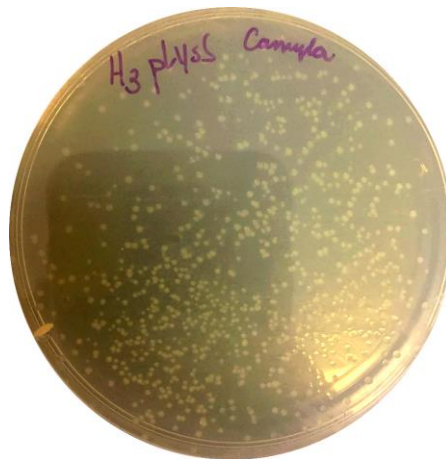


Figura 8. Transformação de Rosetta pLysS com plasmídeo pET 3a de H3. A figura retrata as colônias obtidas transformadas de Rosetta pLysS com H3, as colônias transformadas com os demais plasmídeos e as colônias transformadas de Rosetta gami apresentaram as mesmas características e as imagens não foram inseridas neste trabalho.

4.2. Teste de Expressão induzido com IPTG

Os testes de expressão foram realizados de forma a estabelecer as melhores condições para a obtenção da maior quantidade de histona. Para tanto, as variáveis concentração de IPTG e valor de O.D foram alteradas neste protocolo. A faixa de valores alterada foi escolhida de acordo com protocolo de expressão e purificação de histonas utilizado na Universidade de Leicester, Inglaterra, cedido ao professor Guilherme Santos.

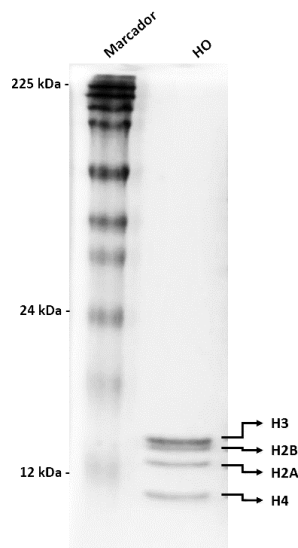


Figura 9. Octâmero de histonas extraído de eritrócitos de galinha em SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue. HO utilizado como padrão em todos os ensaios de SDS-PAGE deste trabalho foi extraído de eritrócitos de galinha pelo professor Guilherme Santos no Laboratório de Biologia Molecular (LMB) da Universidade de Cambridge, UK.

4.2.1. H2A

Inicialmente, o teste de expressão para a H2A foi realizado alterando valor de O.D. e concentração de IPTG. Os primeiros ensaios deste trabalho foram realizados com a cepa *Rosetta gami* e somente depois com a *Rosetta pLysS*.

Os valores de O.D. utilizados na indução de expressão da H2A em *Rosetta gami* e *Rosetta pLysS* foram: 0.7, 0.8 e 0.9. E as concentrações de IPTG foram: 0.5 e 0.7 mM para *Rosetta gami* e manutenção da concentração de IPTG (0.5mM) em *Rosetta pLysS*.

Conforme análise da figura 10, verificou-se que a expressão da histona foi melhor quando utilizada a cepa *Rosetta pLysS*, mesmo resultando em baixa expressão. Dentre as amostras de *Rosetta gami*, não foi possível observar diferença de expressão quanto as concentrações de IPTG testadas. Portanto, a menor concentração de IPTG foi escolhida para dar andamento aos ensaios sem prejudicar a validação da metodologia.

A expressão da histona H2A foi similar entre os diferentes extratos proteicos extraídos da *Rosetta gami*, não havendo diferença significativa entre as amostras (figura 10a). A comparação para determinação do ponto em que houve maior quantidade de histona produzida, ocorre entre as diferentes amostras e entre as próprias proteínas produzidas pela bactéria (Figura 11).

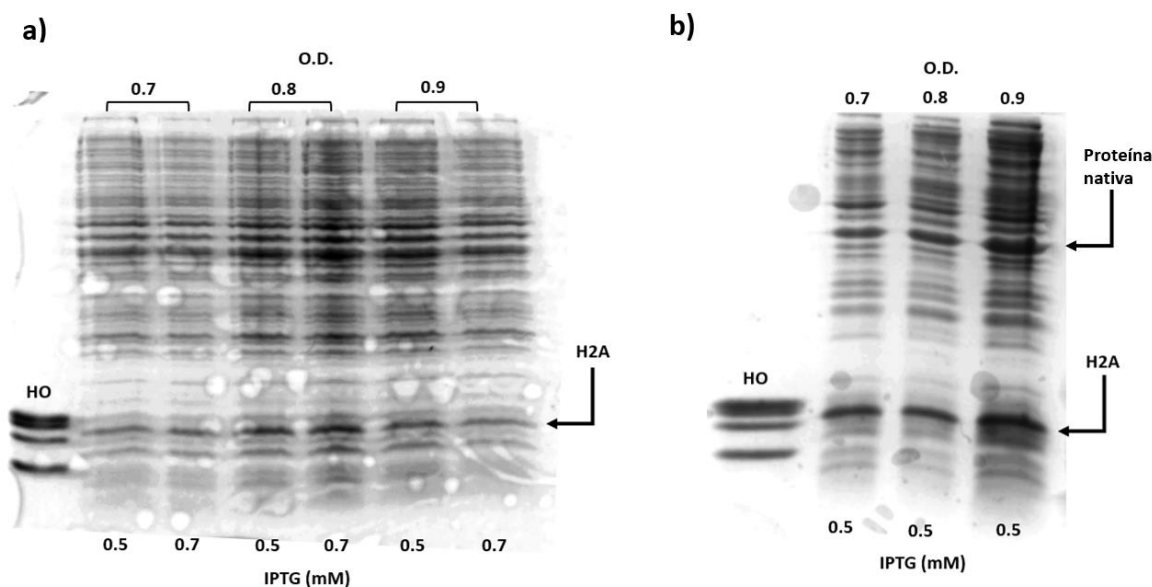


Figura 10. SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H2A. a) Ensaio realizado com *Rosetta gami* com variação dos valores de O.D. e concentração de IPTG. b) Ensaio realizado com *Rosetta pLysS* com variação dos valores de O.D. e manutenção da concentração de IPTG.

Em relação a expressão em *Rosetta pLysS*, em que a intensidade das bandas estava similar, foi realizada densitometria da banda da histona e de uma proteína nativa para comparação, indicada na figura 10b. Percebeu-se que na O.D. de 0.7 houve menor expressão de contaminantes da bactéria, enquanto nos outros valores de O.D. a quantidade foi similar ou maior que a banda da H2A. Configurando a melhor condição para expressão da H2A.

Densitometria das bandas da H2A em Rosetta pLysS

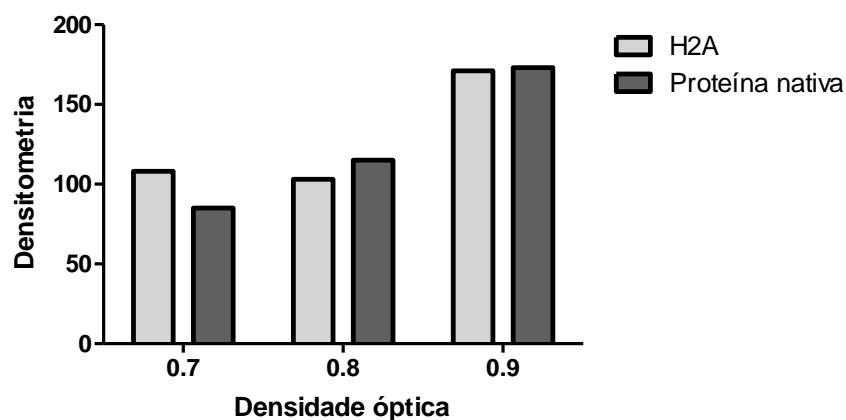


Figura 11. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2A em *Rosetta pLysS*, na qual as colunas correspondem a banda de H2A e a banda de contaminante, a proteína nativa do extrato bacteriano. Quantificação das bandas realizada pelo software ImageJ e gráfico obtido pelo GraphPad Prism 5.

Já foi demonstrado (*Fathi-Roudsari et al., 2016*) que a indução, geralmente, promove o aumento considerável da quantidade de proteína quando comparado à fração não induzida. Embora a indução da expressão pela adição de IPTG não tenha atingido o desfecho esperado, outros autores (*Kallappagoudar et al., 2013*) descreveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Neste artigo, os autores acreditam que a redução de expressão está relacionada a presença de códons raros, que compromete a velocidade de tradução proteica e a instabilidade do mRNA. Os fatores citados acima também podem ter comprometido a expressão da H2A, visto que sua sequência possui 5 códons raros e o mRNA é considerado uma molécula instável.

As condições escolhidas para produção em larga escala para posterior purificação foram as seguintes:

- Cepa: *Rosetta pLysS*

- Valor de O.D.: 0.7
- Concentração de IPTG: 0.5 mM

4.2.2. H2B

A princípio, os testes de expressão para H2B, bem como H2A, foram realizados com variação nos valores de O.D. e concentração de IPTG. Os valores de O.D. utilizados para a indução de expressão da H2B foram: 0.8, 0.9 e 1.0. As concentrações de IPTG utilizadas foram: 0.5 e 0.7 mM. Os testes em *Rosetta pLysS* foram realizados com concentração constante de IPTG.

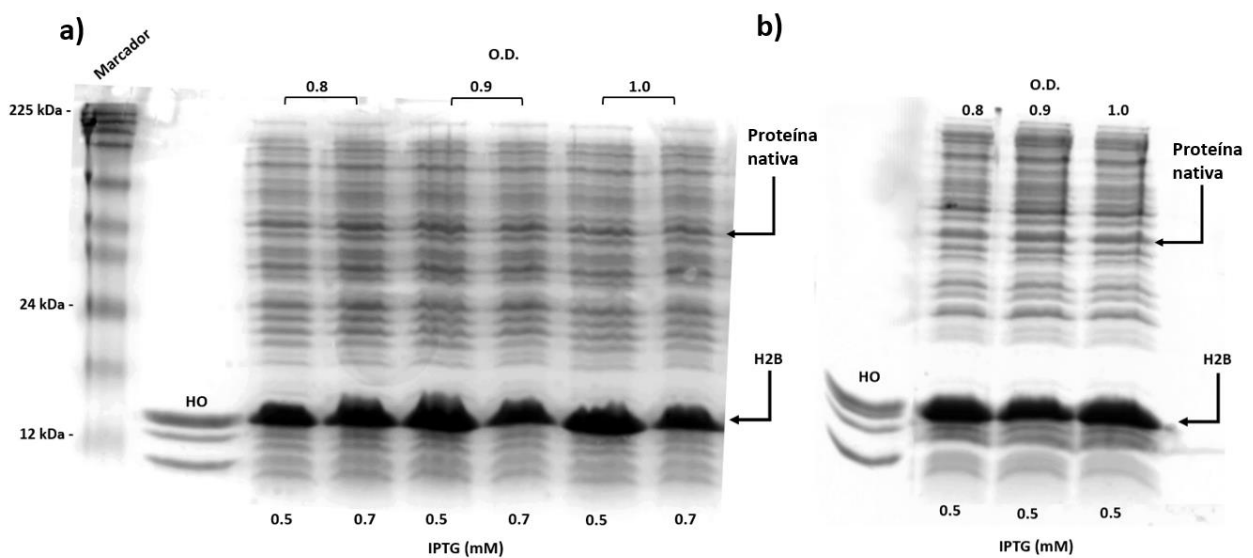


Figura 12. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H2B. a) Ensaio realizado com *Rosetta gami* com variação dos valores de O.D. e concentração de IPTG. b) Ensaio realizado com *Rosetta pLysS* com variação dos valores de O.D. e manutenção da concentração de IPTG.

Conforme análise do gel mostrado na figura acima, verificou-se que a expressão foi maior quando comparado a H2A, descrita anteriormente. A presença de códons preferenciais em *E. coli* está relacionada a quantidade RNAt presente na cepa bacteriana (Thangadurai *et al.*, 2008), ou seja, para obtenção de grande quantidade de proteína é necessária grande quantidade de RNAt também. A sequência da H2B não possui códons raros, o que pode justificar a sua superexpressão em comparação a H2A.

A diferença entre as amostras de H2B foi singela, conforme visualizado na figura 12. Para melhor visualização dos resultados, foi realizada densitometria dos testes de expressão em *Rosetta gami* e em *Rosetta pLysS*. É possível verificar maior expressão

na amostra cujo valor de O.D. foi 1.0 e concentração de IPTG de 0.5 mM (figura 12a e figura 13) em *Rosetta gami*. Portanto, os ensaios posteriores foram realizados com a padronização da concentração de IPTG em 0,5 mM.

Ao analisar os resultados obtidos em *Rosetta pLysS*, percebeu-se que não houve diferenças significativas de expressão quanto a indução em diferentes valores de O.D., bem como diferenças em comparação a *Rosetta gami*. Desta forma, a utilização das duas cepas permitiu a obtenção de grande quantidade de histona, podendo ambas serem utilizadas. A melhor condição em *R. pLysS* foi indução em densidade óptica de 0.8, na qual obteve-se menor quantidade de contaminantes.

Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em *Rosetta gami*

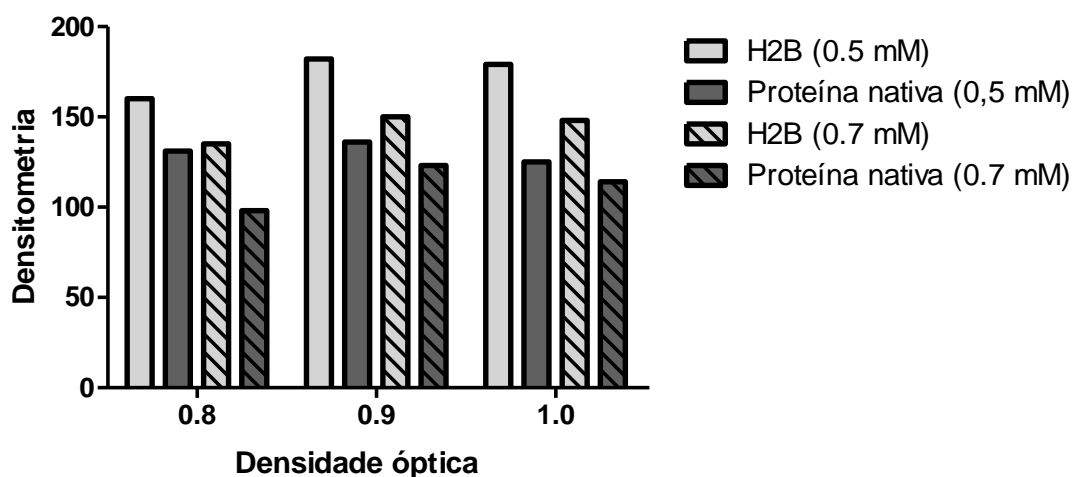


Figura 13. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em *Rosetta gami*, na qual as colunas correspondem a banda de H2B e de proteína nativa (proteína do extrato bacteriano) por diferentes valores de O.D. e em diferentes concentrações de IPTG. Quantificação das bandas realizada pelo software ImageJ e gráfico obtido pelo GraphPad Prism 5

Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em Rosetta pLysS

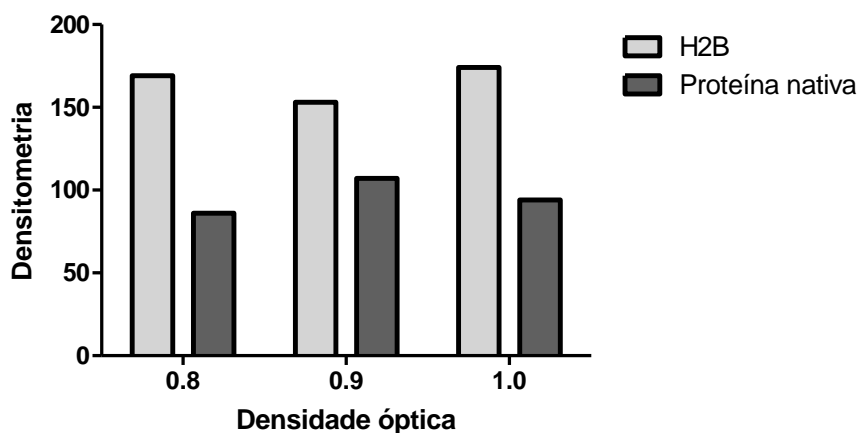


Figura 14. Densitometria das bandas do teste de expressão da H2B em Rosetta pLysS, na qual as colunas correspondem a banda de H2B e de proteína nativa (proteína do extrato bacteriano) por diferentes valores de O.D. Quantificação das bandas realizada pelo software ImageJ e gráfico obtido pelo GraphPad Prism 5

Portanto, as condições escolhidas para produção em larga escala e posterior purificação foram as seguintes e estão de acordo com os melhores pontos de expressão proteica:

- Cepa bacteriana: *Rosetta pLysS* ou *Rosetta gami*
- Valor de O.D.: 0.8 (*pLysS*) ou 1.0 (*gami*)
- Concentração de IPTG: 0.5 mM

4.2.3. H3

A H3 possui estrutura com 9 códons raros, o que torna a sequência desafiante para a expressão em cepa bacteriana (Boel *et al.*, 2016). O desenho do teste de expressão foi realizado da mesma forma que outras histonas: variação dos valores de O.D. e concentração de IPTG. Entretanto, não foi possível visualizar a superexpressão da histona. É possível verificar que a expressão ocorreu em nível basal similar e/ou menor a outras proteínas do extrato bacteriano (figura 15).

Portanto, outras estratégias foram utilizadas para obtenção da histona, como indução em fase pré-exponencial (valores menores de O.D.) de crescimento bacteriano e indução em fase de latência (valores maiores de O.D.), conforme já descrito em estudo anterior (Sivashanmugam *et al.*, 2009) sobre otimização de condições para produção de grande quantidade de proteína. No entanto, conforme observado na figura 15, c e d,

estas estratégias não foram suficientes para induzir a produção significativa da histona e, conforme testes anteriores, a expressão foi similar a outras proteínas do extrato bacteriano. Deste modo, foi necessário desenvolver outras técnicas para expressão que resultassem em grande quantidade de proteína e os testes de expressão foram insuficientes para descrever as melhores condições para otimização do protocolo, uma vez que a quantidade produzida não foi suficiente para dar prosseguimento aos ensaios.

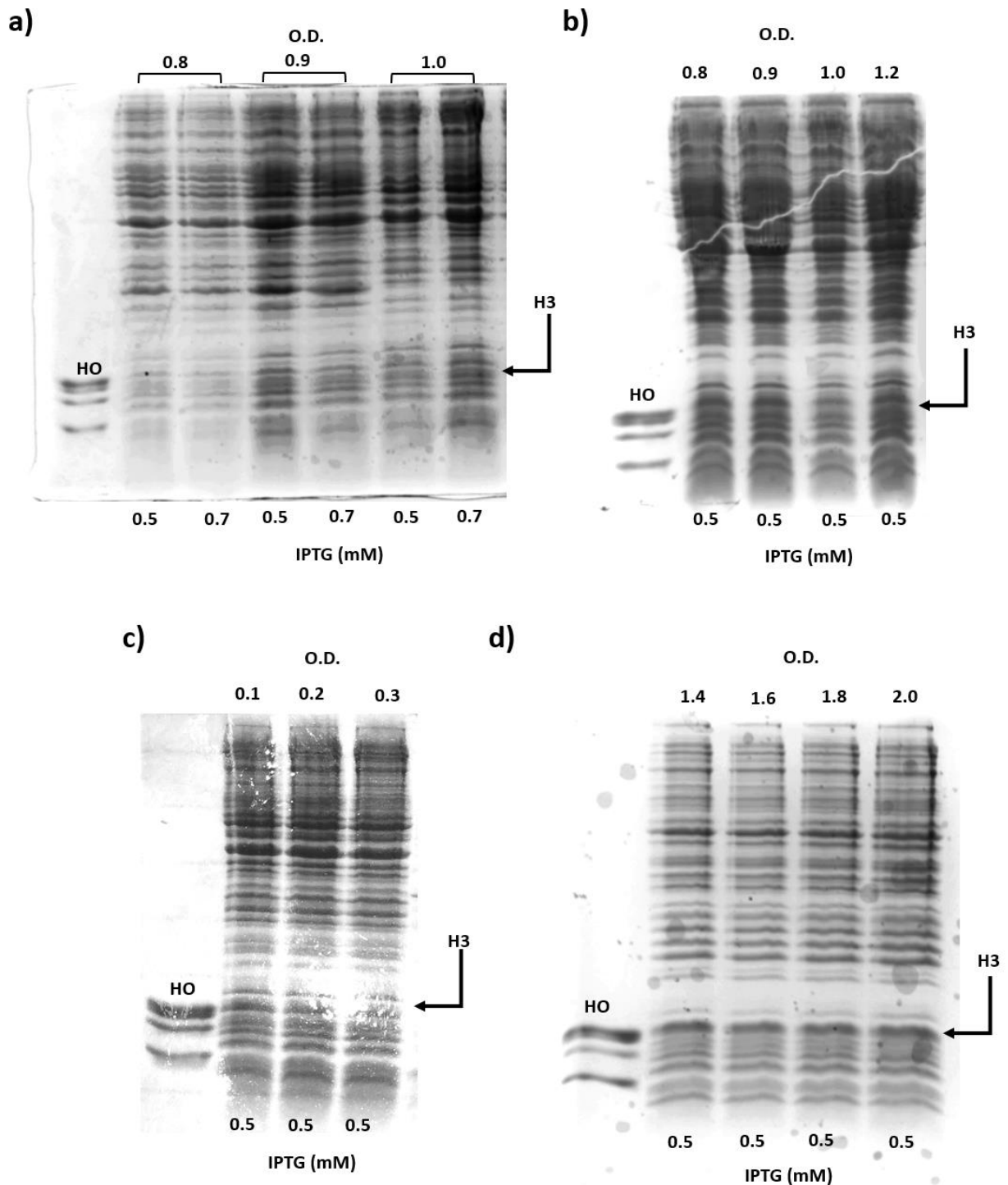


Figura 15. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H3. a) Ensaio realizado com Rosetta gami com variação nos valores O.D. e concentração de IPTG. b) Ensaio realizado com Rosetta pLysS com variação do valor de O.D. c) Indução de expressão utilizando valores menores de O.D. com Rosetta pLysS. d) Indução de expressão utilizando valores maiores de O.D. com Rosetta pLysS

4.2.4. H4

Com a cepa *Rosetta gami*, os testes de expressão para H4 foram realizados com variação nos valores de O.D. e concentração de IPTG. Os valores de O.D. utilizados para a indução de expressão da H4 foram: 0.8, 0.9 e 1.0, mantendo as condições utilizadas nos ensaios anteriores e para a *Rosetta pLysS*: 0.8, 0.9, 1.0 e 1.2. As concentrações de IPTG utilizadas foram: 0.5 e 0.7 mM em *R. gami* e 0,5 mM em *R. pLysS*.

Em conformidade com o visualizado na figura 16a, as variações são perceptíveis quanto a expressão da H4 em *R. gami*. Entretanto, ao confrontar estes resultados com os obtidos com a *R. pLysS*, percebeu-se aumento da expressão com esta cepa (figura 16b). Portanto, foi realizada densitometria do gel da figura 16b para determinação da melhor condição para este protocolo.

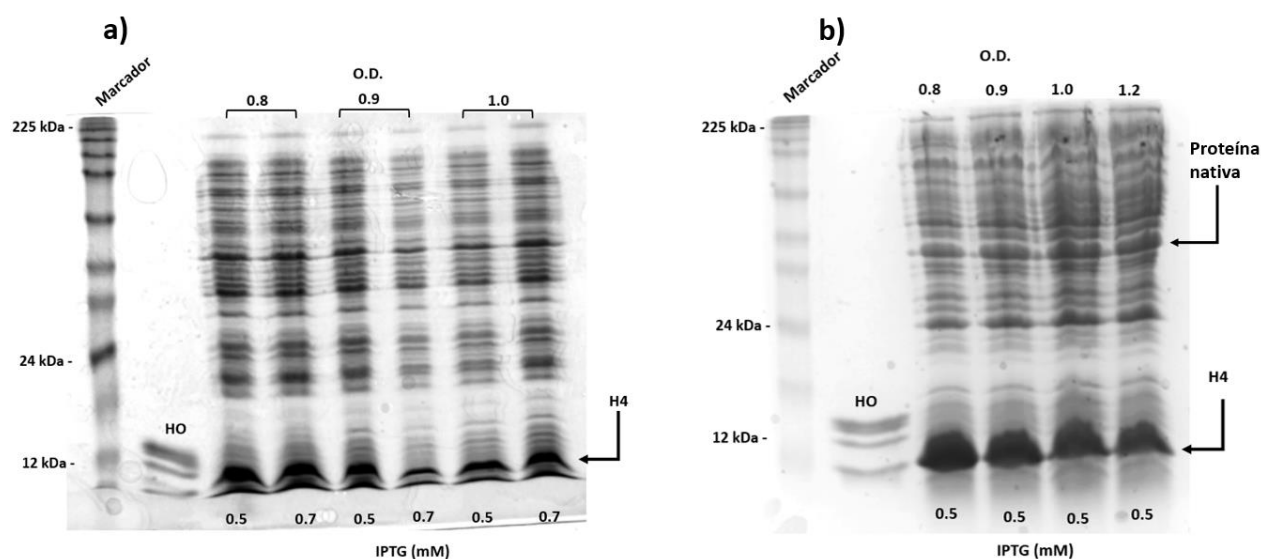


Figura 16. SDS-Page 15% corado com coomassie blue do extrato proteico bacteriano para verificação da expressão de H4. a) Ensaio realizado com *Rosetta gami* com variação dos valores de O.D. e concentração de IPTG. b) Ensaio realizado com *Rosetta pLysS* com variação dos valores de O.D. e manutenção da concentração de IPTG.

A análise da densitometria (figura 17) demonstra que o melhor ponto para expressão da H4 é indução na O.D. de 0.8, já que o nível de expressão de outras proteínas nativas foi o menor observado. É possível observar a similaridade da expressão da H4 até o valor de 1.0, com o aumento da O.D. percebeu-se o aumento da expressão das proteínas nativas da bactéria.

Densitometria das bandas da H4 em Rosetta pLysS

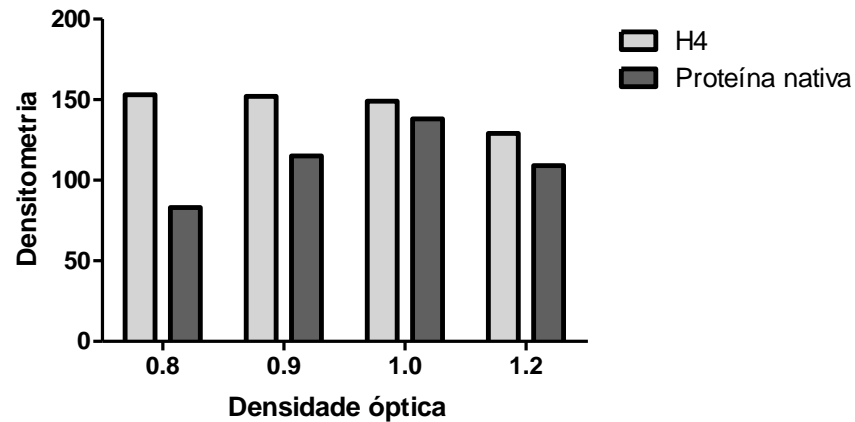


Figura 17. Densitometria das bandas do teste de expressão da H4 realizado em Rosetta pLysS na qual as colunas correspondem a banda de H4 e de contaminante (proteína do extrato bacteriano) por diferentes valores de O.D.. Quantificação das bandas realizada pelo software ImageJ e gráfico obtido pelo GraphPad Prism 5.

Em concordância com os resultados obtidos com a H2B, a expressão da H4, que não possui códons raros em sua sequência, gerou superexpressão da proteína. Portanto, o critério de escolha das condições adequadas para a produção em larga escala baseia-se no mecanismo regulador da expressão gênica presente na cepa *Rosetta pLysS*, que promoveu uma maior produção de proteína recombinante.

- Cepa bacteriana: *Rosetta pLysS*
- Valor de O.D.: 0.8
- Concentração de IPTG: 0.5 mM

4.3. Teste de expressão não induzido por IPTG

Embora a expressão de proteínas recombinantes controlada pela adição de IPTG tenha trazido resultados satisfatórios, o processo pode ser considerado laborioso pela necessidade de acompanhamento da densidade celular. Dessa forma, foi publicado um estudo (Studier, 2005) descrevendo o potencial de auto-indução ou indução espontânea de expressão de proteínas recombinantes sem o monitoramento da densidade celular e sem utilização de IPTG. Este método é baseado na capacidade do meio de cultura em induzir a expressão de proteína quando os seus componentes são metabolizados pela cultura bacteriana e são miméticos ao IPTG, possuindo a capacidade de se ligar ao

repressor do T7 e induzir a expressão da proteína de interesse, o que permite a expressão de proteína durante incubação *overnight*.

A composição deste meio de cultura específico promove crescimento e indução da produção de proteína por meio do fornecimento de fontes de nitrogênio e carbono, com suplementação de glicose e lactose. O equilíbrio entre as concentrações de glicose e lactose promove a ativação do operon *lac* que controla a expressão do promotor T7 e, indiretamente, induz a expressão da proteína recombinante constante no plasmídeo pET (Studier, 2005; Sivashanmugam *et al.*, 2009).

Seguindo estes conceitos, o experimento foi desenhado de forma a verificar a influência da expressão sem IPTG e aeração do meio por meio da velocidade de agitação durante a incubação. Entretanto, neste experimento foi utilizado meio de cultura 2xTY sem suplementação de glicose ou lactose.

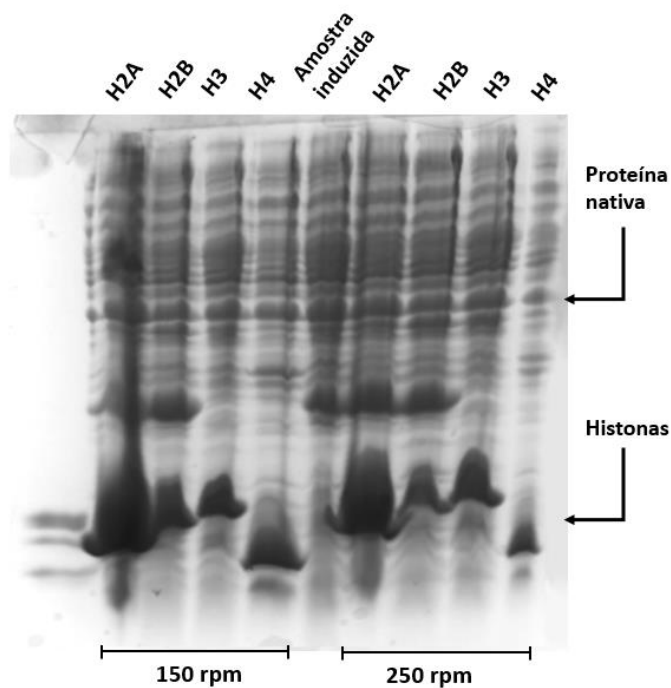


Figura 18. Ensaio de expressão sem indução por IPTG em Rosetta pLysS com todas as histonas, com avaliação da influência da aeração do meio sobre a expressão proteica. Amostra induzida: H3 em R. pLysS com indução por IPTG para comparação (controle negativo).

Conforme análise da figura 18, pôde-se verificar superexpressão de todas histonas nas duas condições de velocidade de agitação do meio, não havendo diferença de expressão entre as formas de aeração. Novamente, não houve expressão da H3 induzida

por IPTG (amostra induzida). Porém, contrariamente aos dados da literatura (Na *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017) que obtiveram superexpressão em meio de cultura específico, houve superexpressão das histonas mesmo utilizando um meio de cultura não enriquecido para a indução espontânea.

Densitometria das bandas do teste de indução espontânea em Rosetta pLysS

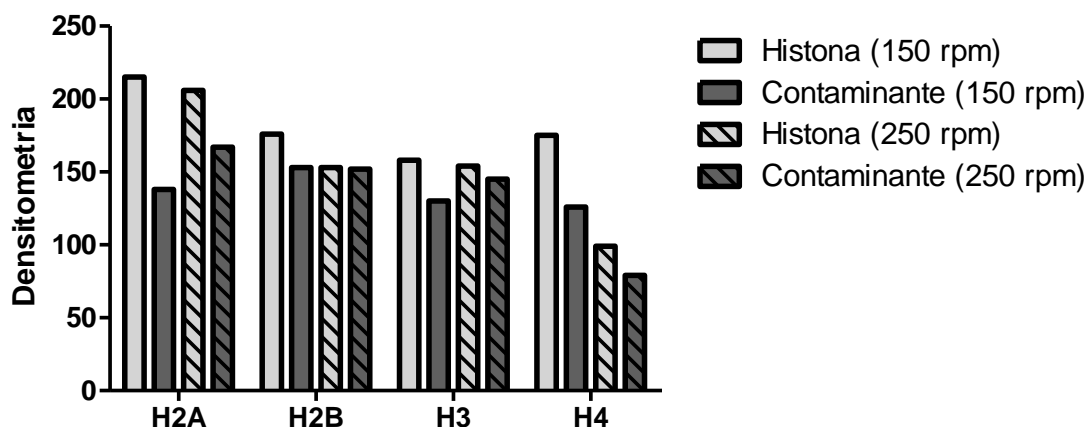


Figura 19. Densitometria das bandas do teste de expressão espontânea realizado em Rosetta pLysS com todas as histonas. Colunas representadas de acordo com a banda quantificada, no qual “contaminante” corresponde a uma banda de proteína do extrato bacteriano para comparação. Colunas com textura representam o teste realizado a velocidade de 250 rpm. Quantificação realizada pelo software ImageJ e gráfico obtido pelo GraphPad Prism 5.

A análise da densitometria das bandas fornece informação precisa sobre as diferenças entre as velocidades de agitação do meio, corroborando com a análise visual de que não foi possível visualizar diferenças significativas entre as expressões. Contudo, verificou-se que a velocidade de 150 rpm resultou em menor quantidade de contaminante quando comparado a 250 rpm. Desta forma, é preferível utilizar rotação a 150 rpm para produção das histonas recombinantes.

Sabe-se que mesmo em ausência de IPTG há expressão basal dos genes clonados ao vetor plasmidial e que a inibição da lisozima T7 é pequena, não impedindo a completa transcrição gênica, apenas diminuindo-a. Portanto, o crescimento bacteriano durante 16 horas (*overnight*) permitiu a expressão das histonas de forma lenta, o que, surpreendentemente, rendeu maior quantidade quando comparado à expressão clássica induzida por IPTG. Não foram encontrados estudos na literatura de auto-indução de expressão proteica utilizando meios de cultura não enriquecidos (2xTY e/ou LB).

4.4. Purificação

Após expressão em larga escala (3L de meio de cultura), foi realizada a purificação das histonas. Nesta etapa, pequenos ajustes foram necessários para otimização do protocolo e serão descritos nas seções a seguir.

4.4.1. H2A

As etapas de lise foram realizadas sempre sob baixas temperaturas (4°C) para evitar a proteólise das histonas. Após o processo de solubilização e extração dos corpos de inclusão, o extrato proteico foi injetado no aparelho de cromatografia *ÄKTA Pure™* e o perfil cromatográfico está demonstrado na figura 20a. No início do gradiente, em proporção reduzida da fase móvel B (1 M NaCl), algumas proteínas fracamente ligadas foram eluídas da coluna. A H2A foi eluída em 32,4% de fase móvel B com volume de 150 mL de corrida.

Para verificação da integridade e pureza das frações coletadas, foi realizado SDS-Page 15% mostrado nas figuras 20 b e c. O mais desafiante desta etapa de purificação foi o controle da proteólise. Conforme demonstrado na figura 20b, houve grande quantidade de proteólise da histona, visto a grande quantidade de bandas abaixo da H2A, indicando proteólise das caudas da histona. Inicialmente, (figura 20b) apenas o PMSF era utilizado como inibidor de protease, porém verificou-se a necessidade de adição de mais inibidores. Portanto, iniciou-se o uso de PMSF associado ao coquetel de inibidor de protease e manipulação da lise bacteriana sob baixas temperaturas.

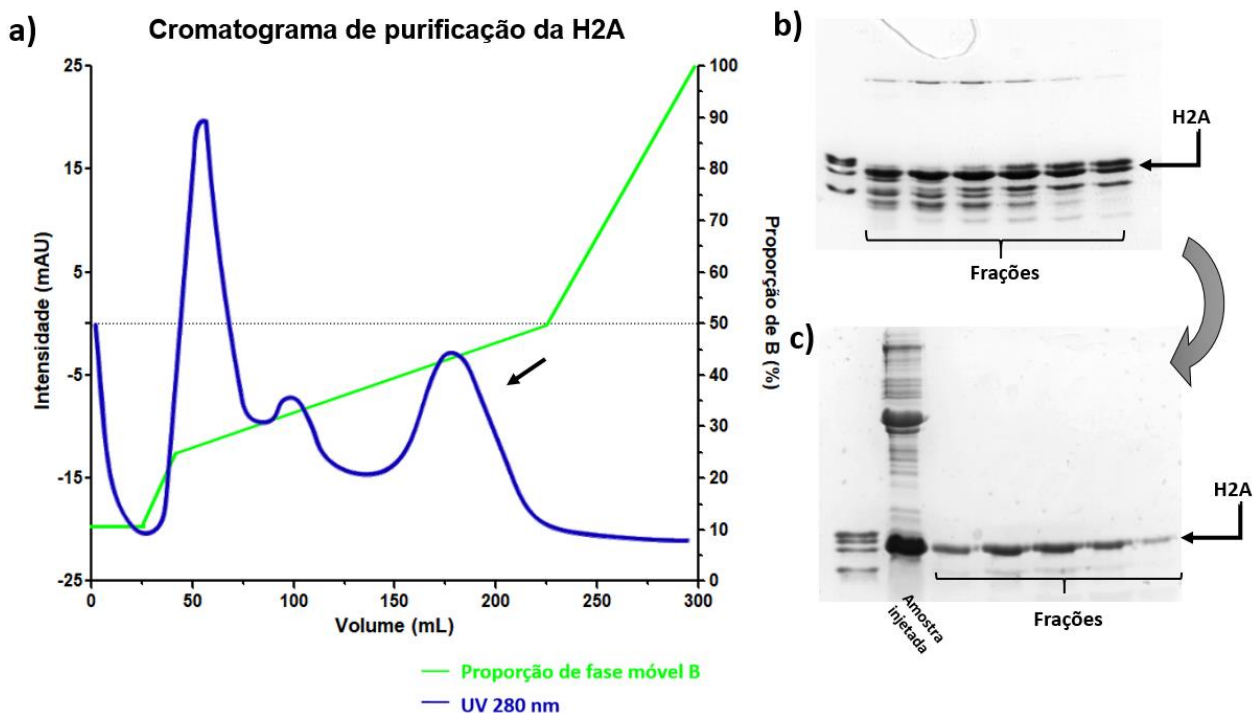


Figura 20. Representação da purificação da H2A. a) Representação do cromatograma de eluição do extrato proteico no aparelho AKTA Pure™. A seta indica o pico da histona. Representação foi obtida utilizando o software Adobe Illustrator. b) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo, após eluição da proteína. c) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo, após eluição da proteína com proteólise reduzida. Amostra injetada corresponde ao extrato proteico injetado no AKTA.

Com uso da associação destes inibidores de protease, obteve-se o resultado demonstrado na figura 20c. Desta maneira, a condição de proteólise foi otimizada possibilitando a obtenção de proteínas íntegras. Mesmo assim, ainda é possível verificar a existência de uma banda fracamente corada abaixo da H2A (figura 20c), contudo acredita-se que esse fragmento de proteína possa ser removido por meio de cromatografia por exclusão de tamanho utilizada, posteriormente, para isolamento do octâmero de histonas.

4.4.2. H2B

Conforme estabelecido para purificação da H2A, o protocolo foi realizado sob mesmas condições. O extrato proteico bacteriano obtido após as etapas de lise e solubilização dos corpos de inclusão foi injetado no *ÄKTA Pure™* e a representação do cromatograma encontra-se na figura 21a.

Os picos de contaminantes estavam presentes em todos os cromatogramas das histonas, visto que correspondem a outras proteínas das bactérias. A H2B foi eluída em

38,7% de fase móvel B (1 M NaCl) em 170 mL de corrida. A integridade e a pureza das frações coletadas foram observadas por SDS-Page 15% corado com coomassie blue.

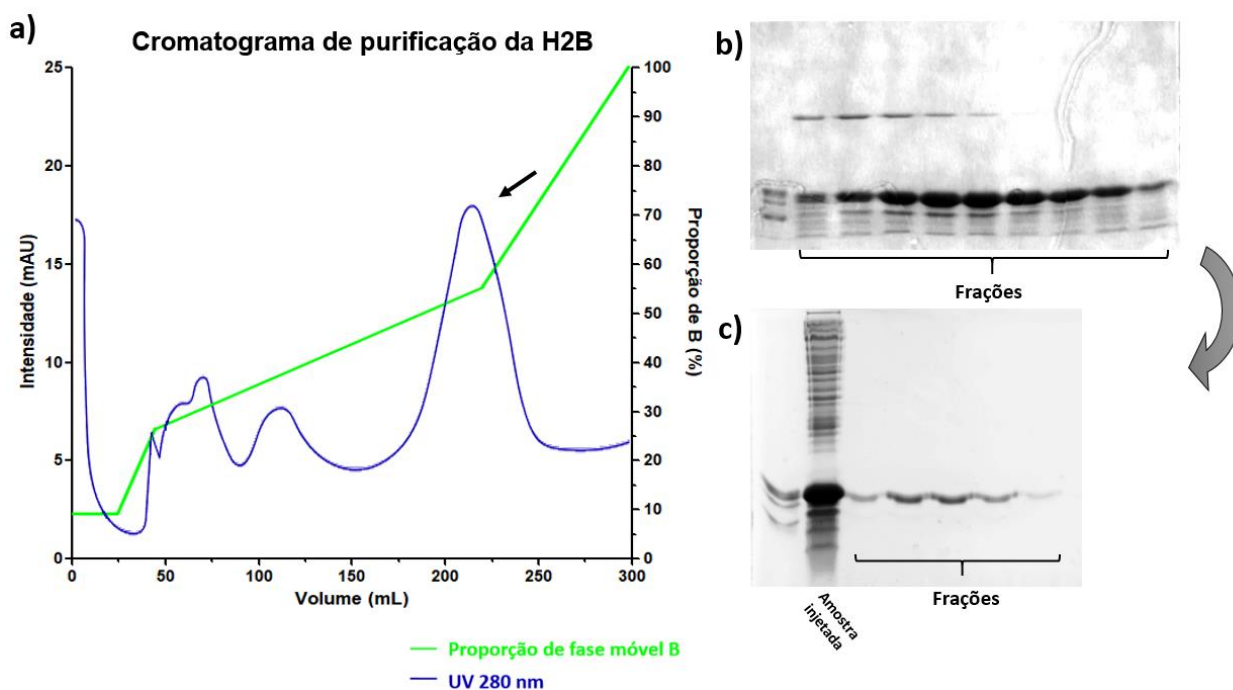


Figura 21. Representação da purificação da H2B. Representação do cromatograma de eluição do extrato proteico no aparelho AKTA Pure. A seta indica o pico da histona. A representação foi obtida utilizando o software Adobe Illustrator. b) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo, após eluição da proteína. c) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo, após eluição da proteína com ausência de proteólise. Amostra injetada corresponde ao extrato proteico injetado no AKTA

A figura 21b mostra o perfil de proteólise com a utilização apenas de PMSF. Em todas as amostras, é possível visualizar grande quantidade de fragmentos advindos da H2B. É possível verificar também o aparecimento de outro contaminante em algumas frações coletadas, porém, da mesma forma, acredita-se que esses contaminantes sejam retirados após cromatografia por exclusão de tamanho.

Corroborando com os resultados obtidos a partir da associação de inibidores de protease na purificação da H2A, a figura 16c mostra que as frações coletadas da H2B estavam íntegras, com ausência de proteólise, e não possuíam contaminação.

4.4.3. H3

A expressão em larga escala para purificação da H3 foi realizada por indução espontânea, enquanto as outras histonas foram expressas com acompanhamento da

densidade celular e indução por IPTG. A purificação foi realizada com uso do PMSF e coquetel de inibidor de protease para inibição da proteólise.

Após análise do cromatograma (figura 22a), é possível verificar que o pico da histona apresentou intensidade maior ao compará-lo aos outros cromatogramas de purificação deste trabalho. Essa grande quantidade de histona coletada é confirmada pelo SDS-Page (figura 22b) para análise de pureza e integridade das frações, em que as bandas da H3 apresentaram coloração intensa. A eluição da H3 ocorreu em 40% de proporção de fase B em 100 mL de corrida. O perfil eletroforético demonstra a grande quantidade de histona recuperada, porém ainda é visível presença de proteólise entre as frações.

A expressão *overnight* gera uma quantidade grande de material proteico, visto que a densidade celular bacteriana é alta (Studier, 2005), o que sugere que a quantidade de inibidor de protease utilizada tenha sido insuficiente quando ao comparado aos outros ensaios de purificação deste trabalho, no qual a densidade celular foi menor. Verifica-se a necessidade de adequação da quantidade de inibidor de protease utilizado para manutenção da integridade das histonas expressas por meio deste protocolo de indução *overnight*.

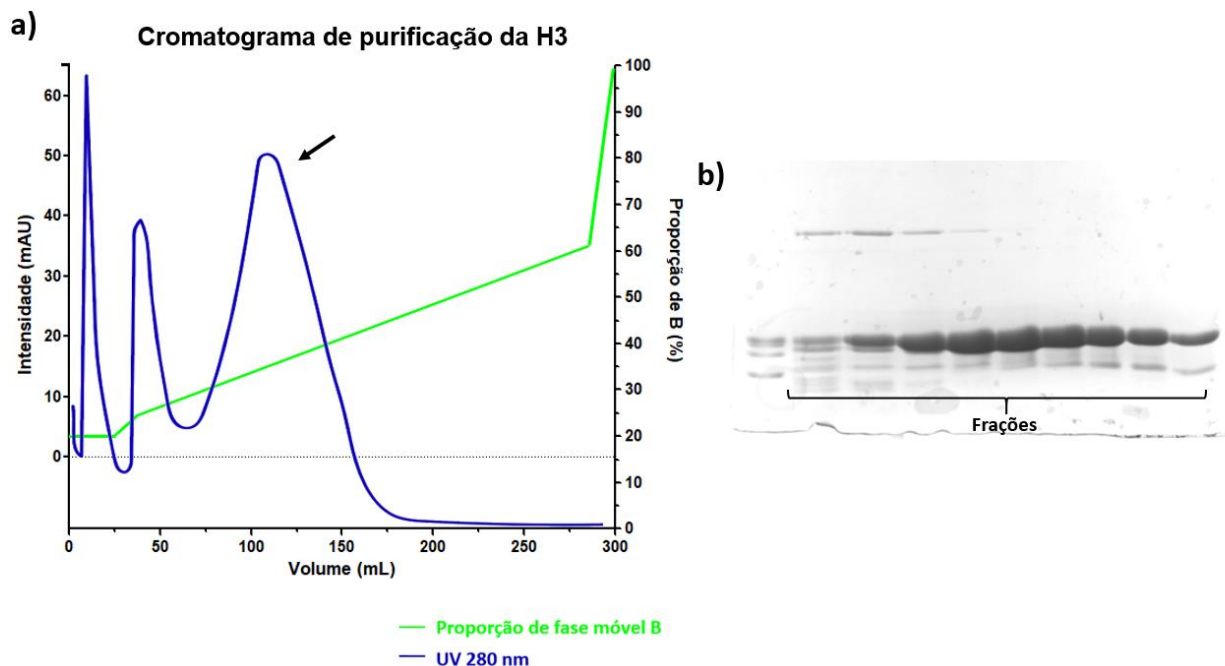


Figura 22. Representação da purificação da H3. Representação do cromatograma de eluição do extrato proteico no aparelho AKTA Pure™. A seta indica o pico da histona. A representação foi obtida utilizando o software Adobe Illustrator. b) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo após eluição da proteína.

4.4.4. H4

Quanto a purificação da H4, conforme visualizado na figura 18a, observou-se que a H4 foi eluída em 40% de fase móvel B em 80 mL de corrida. A análise das frações por eletroforese (figura 23b) mostrou contaminação das frações coletadas, já que visualiza-se bandas inespecíficas juntamente às bandas da H4.

A análise da figura 23c permite inferir que as amostras coletadas estavam puras, visto que não há bandas de contaminação, como o verificado na figura 23b, e permaneciam íntegras, com ausência de proteólise. Este resultado sugeriu novamente a possível recuperação de histonas íntegras e puras, uma vez utilizada a associação de inibidores de protease.

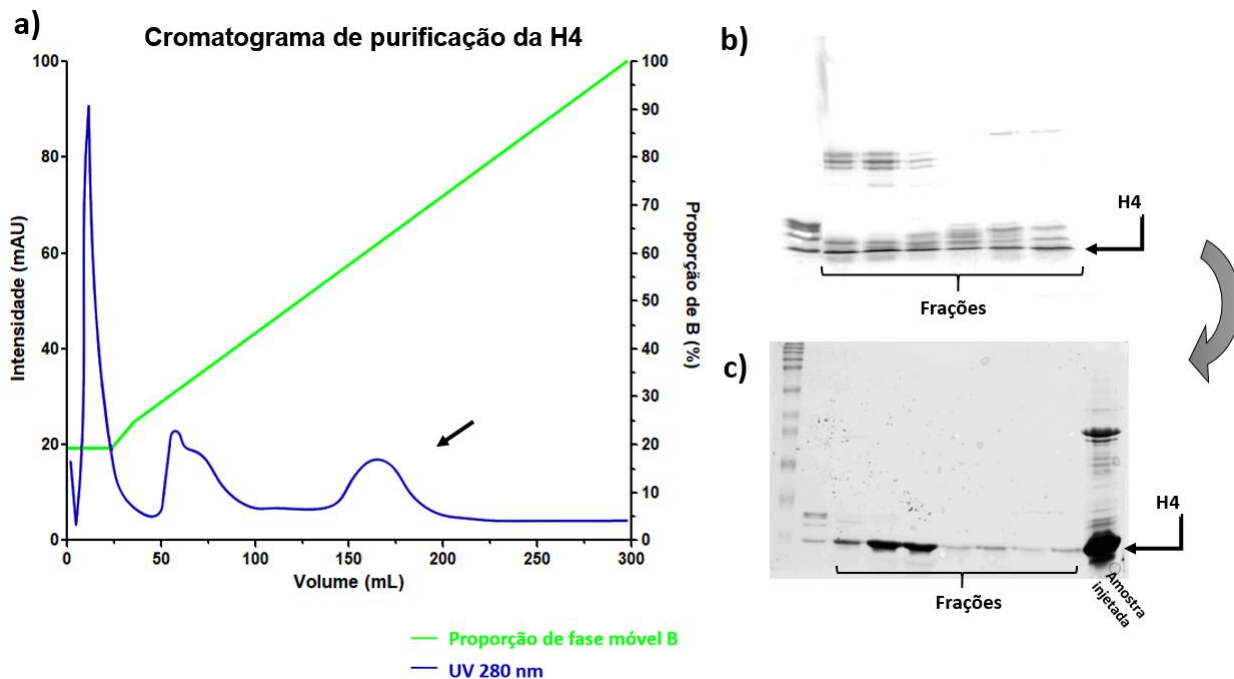


Figura 23. Representação da purificação da H4. Representação do cromatograma de eluição do extrato proteico no aparelho AKTA Pure™. A seta indica o pico da histona. A representação foi obtida utilizando o software Adobe Illustrator. b) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraídas do cromatógrafo, após eluição da proteína. c) SDS-Page 15% corado com coomassie blue indicando as frações extraída do cromatógrafo após eluição da proteína com ausência de proteólise. Amostra injetada corresponde ao extrato proteico injetado no AKTA Pure™.

Correlacionando os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se otimização dos protocolos de expressão e purificação de histonas. Os testes de expressão foram necessários para determinação das condições adequadas para a produção de histonas recombinantes. Com exceção da H3, as demais histonas foram expressas pelo método clássico de indução com IPTG e tiveram níveis de expressão suficientes para a purificação, de acordo com outros protocolos já publicados na literatura (Tanaka *et al.*, 2004; Rogge *et al.*, 2013). Certamente, a existência de códons raros na sequência da proteína determina o seu nível de expressão, conforme já discutido neste trabalho, o que dificultou a expressão da H3 pelo método clássico, embora várias estratégias tenham sido traçadas para contornar esta limitação.

Vários fatores afetam a expressão de proteínas recombinantes: o promotor do sistema de expressão, a cepa bacteriana, utilização de códons preferenciais e tamanho da proteína, por exemplo (Rosano e Ceccarelli, 2014; Kaur *et al.*, 2017). Estes fatores precisam ser, cautelosamente, verificados a fim de melhorar a expressão proteica. A

escolha da cepa bacteriana para este trabalho foi sustentada por meio da literatura vigente (tabela 1). A *Rosetta* possui RNAt para códons raramente utilizados em *E. coli*, o que já reduz a limitação da existência desses códons na sequência das histonas. Como consequência, as histonas que não possuíam códons raros tiveram altos níveis de expressão (H4 e H2B), enquanto que H2A, que possui 5 códons raros resultou em menor expressão e a H3, com 9 códons raros, apresentou a etapa mais desafiante deste trabalho.

A codificação para T7 polimerase sob controle do Operon *lac* é outra estratégia utilizada para expressão de proteína, uma vez que já foi reportado a maior atividade desta polimerase em comparação a RNA polimerase da *E. coli* (Kaur *et al.*, 2017). A *Rosetta gami* não possui o lisogene *DE3*, ou seja, não produz a T7 polimerase e a expressão proteica fica condicionada a RNA polimerase nativa da bactéria, o que justifica os menores níveis de expressão das histonas ao comparar as duas cepas.

Contrariamente ao descrito na literatura (Studier, 2005), o mecanismo de auto-indução é impulsionado pela adição de lactose ao meio cultura, o que aumenta a praticidade do protocolo de expressão de proteínas recombinantes em larga escala e ainda é realizado em período *overnight*. Contudo, foi reportada a necessidade de meio de cultura específico para tal, o que contradiz os resultados obtidos neste trabalho, no qual a utilização de meio cultura complexo (2xTY) reproduziu os resultados de superexpressão em período *overnight*. Este resultado sugeriu a expressão das histonas de forma lenta, curiosamente, rendendo maior quantidade quando comparado à expressão clássica induzida por IPTG. É importante salientar que este dado foi obtido com utilização da *Rosetta (DE3) pLysS* e espera-se que seja reprodutível em outras cepas que possuam controle de expressão com IPTG, porém esta hipótese não foi testada.

Em relação a purificação das histonas, embora o protocolo seja extenso e laborioso, não foram encontradas grandes dificuldades, uma vez que desde o início foi possível recuperar as histonas expressas em larga escala. A maior dificuldade foi inibição da proteólise, já que isto inviabiliza o uso das histonas para o propósito final de montagem do octâmero. A utilização concomitante de diferentes inibidores de protease e as etapas de lise realizadas em baixa temperatura ajudaram a contornar este empecilho.

Os primeiros picos que aparecem em todos os cromatogramas correspondem a outras proteínas nativas da bactéria, confirmado por análise por SDS-Page não incluída neste trabalho. As histonas foram eluídas em faixas próximas de proporção de NaCl, visto que possuem similaridades de carga líquida residual (Smith, 1991). Já foi descrito na literatura (Henrike Klinker, 2014) variações do protocolo de purificação por solubilização dos corpos de inclusão e cromatografia de troca iônica. Neste trabalho, os autores intitularam o protocolo de “*Rapid histone purification*”, no qual a etapa de lise e solubilização de corpos de inclusão ocorre simultaneamente, porém a cromatografia por troca iônica ocorre separadamente. A metodologia clássica de purificação, descrita em 1999 por Luger e colaboradores, utiliza cromatografia por exclusão de tamanho e apenas coluna catiônica na troca iônica (Luger. *et al.*, 1999).

Neste trabalho, as etapas de lise e solubilização de corpos de inclusão foram realizadas separadamente, porém a cromatografia por troca iônica foi realizada simultaneamente ao acoplar as duas colunas ao FPLC. Foram utilizadas colunas HiTrap Q FF e HiTrap SP FF, aniônica e catiônica, respectivamente, com objetivo de reduzir a contaminação da amostra final e promover apenas a eluição das histonas. O gradiente de NaCl foi realizado apenas com a coluna catiônica conectada ao sistema cromatográfico de forma a promover a eluição das histonas. Portanto, proteínas de carga negativa e possíveis resquícios de material genético foram removidos por meio da coluna aniônica.

O impacto deste trabalho está relacionado ao estabelecimento do protocolo de expressão e purificação de histonas recombinantes de forma a ser utilizado pelo grupo de pesquisa conforme a necessidade dos experimentos. Foi possível obter histonas íntegras e puras após otimização dos processos, podendo este protocolo ser utilizado para histonas variantes e ainda para realizar mutações pontuais a fim de elucidar algum mecanismo específico.

A caracterização da superfície nucleossomal como potencial alvo terapêutico foi descrita pelo nosso grupo de pesquisa (Da Silva *et al.*, 2015) através de estudos iniciais sobre moléculas ligantes de nucleossomo (*Nucleosome Binding Molecules* - NBMs) e sua interferência a estrutura do nucleossomo e, conseqüentemente, sobre o desfecho da cromatina. Portanto, as modulações na arquitetura da cromatina são importantes para a

regulação de diversos processos celulares, sendo assim, considerado um potencial alvo terapêutico para tratamento de doenças em que há desregulação da expressão gênica, como o câncer e doenças metabólicas.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho fazem parte de um projeto maior que pretende estudar o nucleossomo como alvo terapêutico e desenhar ligantes capazes de ligar a este complexo e alterar estrutura da cromatina. Para tanto, é necessário reconstituir este complexo com DNA sintético e, agora, com histonas recombinantes humanas. Além de possibilitar estudos estruturais, como cristalografia e crio-microscopia.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que não houve diferença de expressão de histonas recombinantes (H2A, H2B, H3 e H4) quando utilizadas diferentes concentrações de IPTG. No entanto, observou-se que a variação nos valores de densidade óptica (O.D.) afetou significativamente os resultados. Observou-se também que altos valores de O.D resultaram em menor expressão e maior quantidade de contaminantes.

Surpreendentemente, verificou-se que a ausência de um indutor (IPTG) resultou em uma maior expressão de histona em comparação à metodologia clássica, na qual é utilizado IPTG em concentrações variáveis. Desta forma, acredita-se que este trabalho comparativo entre diferentes cepas bacterianas favoreceu a otimização do protocolo de expressão de histonas recombinantes. Finalmente, como esperado, concluímos que a *Rosetta pLysS* apresentou melhores resultados de expressão quando comparados a *Rosetta gami*.

Com relação a metodologia de purificação, a utilização de colunas catiônica e aniônica na cromatografia possibilitou a separação de histonas recombinantes da grande totalidade dos contaminantes das proteínas bacterianas.

Ainda, um entrave para a obtenção de histonas puras é o controle do processo de proteólise. Nos experimentos deste trabalho, obteve-se êxito parcial no controle da proteólise com a utilização de associação de inibidores de protease (PMSF e PIC). Entretanto, esta proteólise, ainda que pequena, deve ser totalmente eliminada.

Para finalizar este trabalho, pretende-se realizar a montagem octâmero de histonas por meio de renaturação das proteínas seguida por cromatografia por exclusão de tamanho. E, conseqüentemente, para confirmação da atividade do HO, pretende-se realizar a reconstituição do nucleossomo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAHVERDI, A. et al. Chromatin compaction under mixed salt conditions: opposite effects of sodium and potassium ions on nucleosome array folding. **Sci Rep**, v. 5, p. 8512, Feb 17 2015.

ALLAHVERDI, A. et al. The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 5, p. 1680-91, Mar 2011.

AN, W. et al. Selective requirements for histone H3 and H4 N termini in p300-dependent transcriptional activation from chromatin. **Molecular Cell**, v. 9, p. 11, 2002.

ARIMURA, Y. et al. Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. **Sci Rep**, v. 3, p. 3510, Dec 16 2013

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 11, 1999.

BARTOVA, E. et al. Histone modifications and nuclear architecture: a review. **J Histochem Cytochem**, v. 56, n. 8, p. 711-21, Aug 2008.

BHATTACHARYA, S. et al. Histone isoform H2A1H promotes attainment of distinct physiological states by altering chromatin dynamics. **Epigenetics Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 48, Oct 18 2017.

BITERGE, B.; SCHNEIDER, R. Histone variants: key players of chromatin. **Cell Tissue Res**, v. 356, n. 3, p. 457-66, Jun 2014.

BOEL, G. et al. Codon influence on protein expression in E. coli correlates with mRNA levels. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 358-363, Jan 21 2016.

BUSCHBECK, M.; HAKE, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 5, p. 299-314, 2017.

CHAKRAVARTHY, S. et al. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. **FEBS Lett**, v. 579, n. 4, p. 895-8, Feb 07 2005.

- CHEREJI, R. V.; MOROZOV, A. V. Functional roles of nucleosome stability and dynamics. **Brief Funct Genomics**, v. 14, n. 1, p. 50-60, Jan 2015.
- CHI, P.; ALLIS, C. D.; WANG, G. G. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 7, p. 457-69, Jul 2010.
- CUTTER, A. R.; HAYES, J. J. A brief review of nucleosome structure. **FEBS Lett**, v. 589, n. 20 Pt A, p. 2914-22, Oct 07 2015.
- DA SILVA, I. T.; DE OLIVEIRA, P. S.; SANTOS, G. M. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. **Trends Pharmacol Sci**, v. 36, n. 5, p. 263-9, May 2015.
- DAVEY, C. A. et al. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 5, p. 1097-1113, 2002. ISSN 00222836.
- FATHI-ROUDSARI, M.; AKHAVIAN-TEHRANI, A.; MAGHSOUDI, N. Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, p. 7, 2016.
- FAZARY, A. E.; JU, Y. H.; ABD-RABBOH, H. S. M. How does chromatin package DNA within nucleus and regulate gene expression? **Int J Biol Macromol**, v. 101, p. 862-881, Aug 2017.
- GASPAR-MAIA, A. et al. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 36-47, Jan 2011.
- GEZER, U.; HOLDENRIEDER, S. Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer. **In vivo** v. 28, p. 6, 2014.
- HAN, Y. et al. High-level expression of soluble recombinant proteins in Escherichia coli using an HE-maltotriose-binding protein fusion tag. **Protein Expr Purif**, v. 142, p. 25-31, Sep 27 2017
- HENRIKE KLINKER, C. H., NADINE HARRER, PETER B. BECKER, FELIX MUELLER-PLANITZ. Rapid purification of recombinant histones. **Plos One**, v. 9, n. 8, 2014.
- HU, Y. et al. Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 1, p. 87-100, 2009.
- HUDSON, G. M. et al. Insights into the Recruitment of Class IIa Histone Deacetylases (HDACs) to the SMRT/NCoR Transcriptional Repression Complex. **J Biol Chem**, v. 290, n. 29, p. 18237-44, Jul 17 2015.
- IWASAKI, W. et al. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. **FEBS Open Bio**, v. 3, p. 363-9, 2013.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biol**, v. 6, n. 8, Aug 2016.

JIANG, X. et al. Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system of *Escherichia coli*. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 93, n. 2, p. 6, 2002.

KALLAPPAGOUDAR, S. et al. Expression, purification and proteomic analysis of recombinant histone H4 acetylated at lysine 16. **Proteomics**, v. 13, n. 10-11, p. 1687-91, May 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. 538-46, Jan 2009.

KATO, S.; ISHII, T.; KOUZMENKO, A. Point mutations in an epigenetic factor lead to multiple types of bone tumors: role of H3.3 histone variant in bone development and disease. **Bonekey Rep**, v. 4, p. 715, 2015

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **Int J Biol Macromol**, Aug 19 2017.

KIM, K. et al. Vpr-binding protein antagonizes p53-mediated transcription via direct interaction with H3 tail. **Mol Cell Biol**, v. 32, n. 4, p. 783-96, Feb 2012.

KOROLEV, N. et al. Electrostatic origin of salt-induced nucleosome array compaction. **Biophys J**, v. 99, n. 6, p. 1896-905, Sep 22 2010.

LASKEY, D. R. A. R. A. Assembly of Nucleosomes and Chromatin in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 170, p. 11, 1989.

LEONARDO MARIÑO-RAMÍREZ, M. G. K., BENJAMIN A SHOEMAKER, AND DAVID LANDSMAN. Histone structure and nucleosome stability. **Expert Rev Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 20 2005.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 10, 1997.

LUGER, K. Nucleosomes: Structure and Function. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, p. 8, 2001.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 436-47, Jun 22 2012

LUGER., K.; RECHSTEINER., T. J.; RICHMOND., T. J. Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. **Methods in Molecular Biology - Chromatin Protocols** v. 119 1999.

MARKS, D. L.; OLSON, R. L.; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. Epigenetic control of the tumor microenvironment. **Future Medicine** p. 17, 2016.

MATTIROLI, F. et al. Structure of histone-based chromatin in Archaea. **Science**, v. 357, p. 3, 2017.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Nucleosome structure and function. **Chem Rev**, v. 115, n. 6, p. 2255-73, Mar 25 2015.

NA, E. L.-B.; LINJAWI, M. H.; REDWAN, E. M. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in Escherichia coli. **BMC Biotechnol**, v. 15, p. 14, Mar 06 2015.

NAGAIA, S. et al. Chromatin potentiates transcription. **PNAS** v. 114, n. 7, p. 6 2017.

NIKOLOV, I.; TADDEI, A. Linking replication stress with heterochromatin formation. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 523-33, Jun 2016. ISSN 1432-0886 (Electronic)

0009-5915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511280> >.

NOVAGEN. **pET System Manual - User Protocol TB055**. NOVAGEN: 63 p.

_____. **Competent cells**. NOVAGEN 2003.

OU, H. D. et al. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. **Science**, v. 357, n. 6349, Jul 28 2017.

P. T. LOWARY, J. W. The new DNA sequences rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning **Journal of Molecular Biology** v. 276, p. 24, 1998.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **CURRENT SCIENCE**, v. 80, n. 9, p. 8, 2001.

RAMACHANDRAN, S.; HENIKOFF, S. Nucleosome dynamics during chromatin remodeling in vivo. **Nucleus**, v. 7, n. 1, p. 20-6, 2016.

REA, M. et al. Quantitative mass spectrometry reveals changes in histone H2B variants as cells undergo inorganic arsenic-mediated cellular transformation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15.7, p. 12, 2016.

RICHMOND, T. J. et al. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution **Nature** v. 311, p. 6, 1984.

ROBINSON, P. J. et al. 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. **J Mol Biol**, v. 381, n. 4, p. 816-25, Sep 12 2008.

ROGGE, R. A. et al. Assembly of nucleosomal arrays from recombinant core histones and nucleosome positioning DNA. **J Vis Exp**, n. 79, Sep 10 2013.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSSETTO, D.; AVVAKUMOV, N.; COTE, J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1098-108, Oct 2012.

RUDNIZKY, S. et al. H2A.Z controls the stability and mobility of nucleosomes to regulate expression of the LH genes. **Nat Commun**, v. 7, p. 12958, Sep 22 2016.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 12, 2004.

SELLECK, W.; TAN, S. Recombinant protein complex expression in E. coli. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 5, p. Unit 5 21, May 2008.

SILVA, I. T. G. et al. Biophysical studies of cholesterol effects on chromatin. **J Lipid Res**, v. 58, n. 5, p. 934-940, May 2017.

SIVASHANMUGAM, A. et al. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. **Protein Sci**, v. 18, n. 5, p. 936-48, May 2009.

SMITH, M. M. Histone structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 3, p. 9, 1991.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **J Biotechnol**, v. 115, n. 2, p. 113-28, Jan 26 2005.

STROM, A. R. et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. **Nature**, v. 547, n. 7662, p. 241-245, Jul 13 2017.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

SULLI, G.; DI MICCO, R.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 10, p. 709-20, Oct 2012.

SZENKER, E.; RAY-GALLET, D.; ALMOUZNI, G. The double face of the histone variant H3.3. **Cell Res**, v. 21, n. 3, p. 421-34, Mar 2011.

TANAKA, Y. et al. Expression and purification of recombinant human histones. **Methods**, v. 33, n. 1, p. 3-11, May 2004.

TELES, K. A. **Mapeando a superfície nucleossomal com finalidade terapêutica** Dissertação de Mestrado, p.49. 2017.

TESSARZ, P.; KOUZARIDES, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 703-8, Nov 2014.

THAKAR, A. et al. H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 10852-7, Nov 24 2009.

THANGADURAI, C. et al. Rare codon priority and its position specificity at the 5' of the gene modulates heterologous protein expression in Escherichia coli. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 376, n. 4, p. 647-52, Nov 28 2008.

THIRIET, C. Analysis of chromatin assembled in vivo using exogenous histones in Physarum polycephalum. **Methods**, v. 33, n. 1, p. 86-92, May 2004.

VARDABASSO, C. et al. Histone variants: emerging players in cancer biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 3, p. 379-404, Feb 2014.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 3, p. 178-89, Mar 2015.

VINCENTELLI, R.; ROMIER, C. Expression in Escherichia coli: becoming faster and more complex. **Curr Opin Struct Biol**, v. 23, n. 3, p. 326-34, Jun 2013.

WAKAMORI, M. et al. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. **Sci Rep**, v. 5, p. 17204, Nov 26 2015.

WEBER, C. M.; HENIKOFF, S. Histone variants: dynamic punctuation in transcription. **Genes Dev**, v. 28, n. 7, p. 672-82, Apr 01 2014.

WOODCOCK, C. L.; SKOULTCHI, A. I.; FAN, Y. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. **Chromosome Res**, v. 14, n. 1, p. 17-25, 2006.

WU, H. et al. Heterologous expression and purification of neurotoxic Hainantoxin-III in E. coli. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 47, n. 2, p. 158-162, Feb 07 2017.

WU, H. et al. The real culprit in systemic lupus erythematosus: abnormal epigenetic regulation. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 5, p. 11013-33, May 15 2015.

ZHANG, X.; STUDIER, F. W. Mechanism of Inhibition of Bacteriophage T7 RNA Polymerase by T7 Lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 269, p. 18, 1997.

ZHANGA, K.; TANGB, H. Analysis of core histones by liquid chromatography–mass spectrometry and peptide mapping. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 7, 2003

ZHU, P.; LI, G. Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber. **Curr Opin Struct Biol**, v. 36, p. 106-15, Feb 2016.