

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Isabel Torres Gomes da Silva

**Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e
obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo**

Brasília, 2013.

Isabel Torres Gomes da Silva

Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

Brasília, 2013.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular, Universidade de Brasília, e no Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas, SP, sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

Isabel Torres Gomes da Silva

Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo

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

Aprovada em 15 de julho de 2013.

Banca Examinadora

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

Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (CNPq)

Dra. Angélica Amorim Amato (Universidade de Brasília)

Agradecimentos

Ao meu orientador, prof. Guilherme Santos, pela oportunidade de trabalhar com uma ciência tão fascinante, que me faz ir ao laboratório, entusiasmada, até mesmo no dia de natal. Agradeço também pelas palavras de motivação, pelo incentivo diário, pela confiança e pela paciência em tentar me fazer ver que todo resultado é sempre importante.

À minha grande companheira de trabalho, Manu, que se tornou uma grande amiga. Obrigada por dividir comigo as alegrias e as frustrações dessa vida científica, e por tornar os experimentos, até mesmo de madrugada, muito mais divertidos.

Ao pessoal do CNPEM, que nos recebeu de forma muito acolhedora. Principalmente à Ana Carolina Figueira pela oportunidade de trabalhar em um centro de pesquisa de excelência. Obrigada pela paciência, por todo o suporte e pelos conhecimentos a nós repassados. Às meninas do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio, pelo carinho e total disposição em ajudar-nos, especialmente à BiaBibia (Beatriz Alves) pelo apoio e companhia constante durante os almoços, banhos de sol e nas cantorias. Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Rodrigo Portugal e Jefferson Bettini, pela paciência e por todos os ensinamentos e dicas para que eu pudesse aprender a “pilotar a nave”. Ao Alexandre Cassago pela atenção e ótimos momentos de descontração. Ao Paulo Sergio de Oliveira (Paulão) e sua equipe por todo esforço em tentar-nos inserir no mundo da bioinformática.

Aos meus pais, minha irmã e meu cunhado, que mesmo apreensivos com o caminho que escolhi me dão todo carinho, apoio e incentivo para continuar. À minha princesinha, Alice, que mesmo sem saber me dá muitas alegrias e motivação para trabalhar.

Ao meu namorado, Fred, pela paciência com que me aguentou nas várias vezes em que fiquei chateada pelos resultados frustrantes dos experimentos ou ao contrário, pelo excesso de empolgação; e também por me acompanhar ao laboratório em horas inusitadas, e pelo imenso apoio e carinho.

À minha família que está distante e mesmo de longe me dão carinho e suporte. À família do Fred, obrigada pelo carinho e por torcerem pelo meu sucesso. Aos meus amigos, pelo apoio e por todos os momentos descontraídos que me proporcionam.

À Ingrid e ao Felipe, do Instituto de Biologia da UnB, pela disposição e paciência após várias horas no microscópio.

Aos meus colegas do Farmol, pelas risadas, pelo carinho, pela ajuda e por tornarem o meu ambiente de trabalho leve e descontraído. Em especial ao Martin pela disposição de ajudar em todos os momentos. A Isabella, ao Pedro e a Mariella que suportaram a bagunça constante e as invasões diárias de bancada com muito bom humor.

À Rilva Soares por todos os ensinamentos e suporte técnico e à Cristina Simeoni pela atenção e pela paciência em resolver a burocracia, que só ela sabe solucionar.

E aos professores do Farmol, pelos conhecimentos compartilhados e pelas contribuições para as discussões ao longo do trabalho, principalmente ao prof. Francisco Neves e à prof.^a Angélica Amato, que nos dão todo apoio e suporte.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

Resumo

SILVA, Isabel Torres Gomes. Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo. Brasília, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

O DNA em seres eucarióticos é organizado na forma de cromatina, sendo esta a principal responsável por regular diversas atividades vitais para célula, como o processo transcricional e a manutenção do genoma. A cromatina é um complexo formado por unidades repetitivas de nucleossomos e pode se apresentar na forma aberta (10nm-permissiva) ou fechada (30nm-repressiva). Está evidente que a dinâmica de modulação da estrutura da cromatina determina a resposta transcricional e consequentemente clínica. Neste trabalho, os objetivos foram: i) estudar a ação do colesterol, um agente desidratante e importante molécula sinalizadora, sobre a arquitetura da fibra de cromatina e ii) estabelecer uma metodologia para obtenção do complexo de Receptor Nuclear:mononucleossomo. Observamos, por ensaios bioquímicos e imagens de microscopia eletrônica de transmissão, que o colesterol auxilia a formação de fibras de cromatina de 10 e 30nm reconstituídas *in vitro*, por direcionar as histonas para interação com o DNA. Entretanto, o colesterol afetou a estabilidade de longas fibras de cromatina. Acreditamos que a alteração da estequiometria das moléculas de água com o nucleossomo, causada pela presença do colesterol, possa ter grande impacto na arquitetura da cromatina e que estes resultados obtidos *in vitro* sirvam de ponto de partida para novas investigações dentro do contexto celular. Na segunda parte, realizamos uma revisão bibliográfica sobre a ação dos RNs no contexto da cromatina, iniciando a construção de clones, contendo elementos responsivos à RNs com o DNA 601, de forte posicionamento de nucleossomos. Também, preparamos um fragmento de DNA 601 para início das reconstituições de mononucleossomo. Estes resultados irão ajudar a implementação de metodologias para estudos *in vitro* das interações de RNs a nucleossomos e cromatina.

Palavras-chave: cromatina, nucleossomo, colesterol, receptor nuclear.

Abstract

SILVA, Isabel Torres Gomes. Estudos estruturais da cromatina: ação do colesterol e obtenção do complexo receptor nuclear:nucleossomo. Brasília, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

The genome in eukaryotes is organized into chromatin, which is the main responsible for regulating many vital cell activities, such as the transcriptional process and the maintenance of genome. It is clear that the local chromatin state open (10nm fiber- permissive) or close (30nm fiber - repressive), regulates the access of transcription factors, co-regulators and basic transcription machinery to specific enhancers in target genes. Thus, it seems obvious that the dynamic modulation of the chromatin structure determines transcriptional and clinical outcome. Herein, we aimed: i) to study the action of cholesterol, a dehydrating agent and an important signalling molecule, on the architecture of the chromatin fiber and ii) to establish a methodology for obtaining the complex Nuclear Receptor: nucleosome. We aimed to dissect the role of the water and electrostatic forces on the three dimensional structure of the first level of folding of nucleosome arrays and the higher order structure of chromatin. By comparing long chromatin fibers reconstituted *in vitro*, in presence and in absence of cholesterol, we observed that cholesterol improves the 10 and 30nm fibers formation by freeing the highly basic histone octamers to interact with the highly negative DNA. However, by thermo-denaturation assays, cholesterol showed to severely affect chromatin fibers stability. These observations suggest that disturbing the water stoichiometry of a chromatin fiber may have a great impact on chromatin architecture. Moreover, these results can be seen as a start point to investigate the effect of cholesterol *in vivo* as a potential chromatin remodeler. In the second part, I conducted a literature review on the action of RNs in a chromatin context. We also initiated the construction of clones containing responsive elements to RNs with DNA 601 that has strong positioning of nucleosomes. Besides that, we prepared a DNA array for nucleosomes reconstitutions *in vitro*. These results will help to establish a new methodology for *in vitro* studies of RNs interaction to nucleosomes and chromatin.

Keywords: chromatin, nucleosome, cholesterol, nuclear receptor.

Lista de Abreviaturas e siglas

AChR - Receptor de Acetilcolina

AF-1 – Região de Ativação 1 (*Ligand-Independent Transcriptional Activation Function*)

AF-2 - Região de Ativação 2 (*Ligand Dependent Activation Function*)

ARC - *Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein*

ATP - Adenosina Trifosfato

AUC – UltraCentrifugação Analítica

CBP - *CREB1-binding protein*

CCK - Receptores de Colecistoquinina

COX-2 - Cicloxigenase 2

crDNA - DNA competidor

DBD – Domínio de Ligação ao Ligante

DLS - Espalhamento Dinâmico De Luz (*Dynamic Light Scattering*)

DRIP - *Vitamin D Receptor Interacting Protein*

DRs – Repetições diretas

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GR – Receptor de Glicocortidóide

HDACs - Histonas Acetil-Transferase

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HMG-CoA – 3-Hidroxi-3-Metil-Glutaril-CoA Redutase

HO – Octâmero de Histonas

HREs - Elementos Responsivos Hormonais

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IL-6 - Interleucina 6

LB - Luria-Bertani

LBD – Domínio de Ligação ao DNA

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

LXR – Receptor X do Fígado (*Liver X Receptor*)

MMTV - *Mouse Mammary Tumor Virus*

MNase - Micrococcal Nuclease

MRC - *Medical Research Council*
NCP – Partícula Central do Nucleossomo (*Nucleosome core particle*)
NEB – *New England Biolabs*
NMR - Ressonância Magnética Nuclear
NREs – Elementos Responsivos a Receptores Nucleares
NRLs – Unidade de Repetição de Nucleossomos (*Nucleosome Repeat Length*)
PCAF - *P300/CBP-associated factor*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PPAR - Receptor de Proliferação Peroxissomal
PTMs -Modificações Pós-Traducionais
RAR - Receptor do Ácido Retinóico
RCC1 - *Regulator of Chromosome Condensation*
RNs – Receptores Nucleares
RXR – Receptor Retinóide X
SANS - *Small-Angle Neutron Scattering*
SAXS – *Small-Angle X-ray Scattering*
SDS-PAGE - Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
SMase – Enzima Esfigomielinase
SRC-1 - *Steroid Receptor Coactivator-1*
SREBPs - Elemento De Resposta A Esterol (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*)
SWI/SNF - *SWItch/Sucrose NonFermentable*
T3 – Triiodotironina
TBE - Tris/Borato/EDTA
TEA – Trietanolamina
TFs - Fatores de Transcrição
TR - Receptor do Hormônio Tireoidiano
TRAP - *Thyroid Hormone Receptor-Associated Proteins*
TSH - Hormônio Estimulante da Tireóide
VDR - Receptor da Vitamina D

Índice de Tabelas

Tabela 1. Diferenças deNRLs. _____	18
Tabela 2. Exemplo de titulação de HO. _____	43
Tabela 3. Exemplo de titulação de H5.. _____	45

Índice de Ilustrações

Figura 1. Estrutura do nucleossomo. _____	18
Figura 2. Compactação da cromatina (Adaptado de BENJAMIN, 2005). _____	19
Figura 3. Esquema dos modelos de fibra de 30nm (Adaptado de QUÉNET; MCNALLY; DALAL, 2012). _____	20
Figura 4. Vista ortogonal do cristal do tetranucleossomo publicado em 2005 (Adaptado de SCHALCH et al., 2005). _____	21
Figura 5. Comparação dos modelos de fibra de 30nm. _____	22
Figura 6. Esquema de estrutura primária do receptor nuclear. _____	23
Figura 7. Receptores nucleares associados as suas sequências cognatas (Adaptado de BARRA; NEVES, 2004). _____	25
Figura 8. Estrutura química do colesterol (Adaptado de Alberts <i>et al.</i> 1994). _____	32
Figura 9. Integridade das histonas utilizadas. Gel de SDS-PAGE 14% corado com solução de comassie blue. _____	38
Figura 10. Plasmídeo (pUC18) contendo o arranjo 197.25 e sítios de enzimas de restrição (Routh, 2009). _____	39
Figura 11. Esquema ilustrativo das etapas realizadas na reconstituição <i>in vitro</i> de fibras de cromatina de 10nm. _____	44
Figura 12. Esquema ilustrativo da formação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída <i>in vitro</i> . _____	44
Figura 13. Esquema ilustrativo da formação da fibra de 30nm. _____	46
Figura 14. Digestão dos plasmídeos. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. _____	49
Figura 15. Purificação com PEG 6000. Arranjo: 197.25. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. _____	49
Figura 16. DNA competidor. Gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. _____	50
Figura 17. Titulação de octâmero de histonas. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Arranjo: 197.25. Observamos no gel o retardo na migração das bandas devido ao aumento de massa e formação da fibra de cromatina de 10nm. As bandas atingem um platô a partir do poço 4. O ponto de saturação (poço 5) é determinado pela diminuição da intensidade da banda do crDNA e formação de mononucleossomos (poço 6). _____	50
Figura 18. Titulação de <i>linker</i> histona. Arranjo: 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. _____	51
Figura 19. Curva dose-resposta colesterol. Arranjo: 197.25. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. _____	52
Figura 20. Antecipação do ponto de saturação na formação da fibra de 10nm de cromatina produzida pelo colesterol. As setas indicam o ponto de saturação. a)Arranjo: 197.15. Ponto de saturação controle: 24µL; _____	

colesterol: 22 μ L; b) Arranjo: 197.25. Ponto de saturação controle: 15 μ L; colesterol: 12 μ L; c) Arranjo: 177.36. Ponto de saturação controle: 24 μ L; colesterol: 18 μ L. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.	53
Figura 21. Desnaturação térmica de fibra de 10nm do arranjo 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. C: controle geral; C1: controle incubado com água; C2: controle incubado com colesterol. Nota-se que a amostra incubada com colesterol a 70° C apresenta desestabilização em relação ao controle (banda mais baixa). A 80° C, em presença do colesterol, a banda observada no gel está na altura do DNA nu, enquanto no controle temos uma mistura de espécies de fibras, caracterizada pelo “arraste” da banda	54
Figura 22. Comparação das reconstituições controle e na presença do colesterol ao longo do tempo. Arranjo: 197.15. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Observa-se que após 30 dias as bandas da reconstituição controle apresentam-se praticamente da mesma forma, enquanto as fibras com colesterol não são visualizadas	55
Figura 23. Coeficientes de sedimentação das fibras de 10nm. a) Coeficientes de Sedimentação obtidos para o arranjo 197.25. Obtivemos os coeficientes esperados (~30S), tanto na presença quanto na ausência de colesterol; b) Coeficientes de Sedimentação obtidos para o arranjo 177.36. O coeficiente de sedimentação esperado (~40S) foi encontrado apenas em uma das amostras, sendo esta com colesterol	56
Figura 24. Coeficientes de Sedimentação das fibras de 30nm.	57
Figura 25. Gel da reconstituição de cromatina do arranjo 197.25. Poços 1-6: titulação de H5. A seta vermelha indica a amostra que foi utilizada para AUC (Coles. 4 - S= 30,665 – figura 23a). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.	58
Figura 26. Reconstituições da fibra de 30nm utilizadas na AUC para o arranjo 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As setas vermelhas indicam as amostras que foram para AUC. Poços 1 e 8: DNA nu; poços 2-7: titulação H5 reconstituição controle; poços 9-14: titulação H5 reconstituição com colesterol.	58
Figura 27. Curvas de correlação obtidas no DLS para incubação com diferentes concentrações de colesterol da mesma amostra, demonstrando que a curva de colesterol 5X não apresentou comportamento sigmóide apropriado e somente a curva de colesterol 1X parece demonstrar apenas uma espécie proeminente.	59
Figura 28. Esquema ilustrativo de dobramento das fibras de cromatina.	60
Figura 29. Proporções de populações de fibras obtidas no DLS na presença e ausência de colesterol. Observou-se que colesterol promoveu um aumento do número de espécies, passando de uma solução com população quase homogênea (99% com raio hidrodinâmico de 67,5 nm) para uma solução contendo três populações distintas (17% com 33nm, 41% com 146nm e 41% com 364,8nm).	61
Figura 30. Titulação de NaCl sobre as fibras de 10nm na ausência e presença do colesterol. Observou-se que o sal promoveu uma redistribuição dos raios hidrodinâmicos das populações das fibras de cromatina, passando de uma população de 75% com raio hidrodinâmico de 572nm (a) para raios em torno de 50nm com a adição de NaCl (b) (c). Na amostra incubada com colesterol, observou-se que o NaCl promoveu uma distribuição mais homogênea das populações, passando de uma amostra com grande maioria da população com raios hidrodinâmicos de 146 e 364nm (e) para raios de ~50nm e 250nm (f) (g).	62
Figura 31. Formação da fibra de cromatina compactada. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O gel mostra que o colesterol não impediu a formação das fibras de 30nm. a) Arranjo: 197.25. Poços 1-5: titulação da H5 na reconstituição com colesterol; b) Arranjo: 177.36. Poços 1-5: titulação da H5 na reconstituição controle; poços 6-10: titulação da H5 na reconstituição com colesterol.	63

Figura 32. Fibras de cromatina controle aberta e compactada visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. _____	64
Figura 33. Fibras de cromatina reconstituídas com colesterol 10X visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. _____	65
Figura 34. Estrutura cristalográfica do complexo RCC1/mononucleossomo (PDB 3MVD). _____	74
Figura 35. Esquema ilustrativo do TR/RXR ligado à cromatina (Adaptado de LI et al., 1999). _____	76
Figura 36. Esquema proposto por Truss e colaboradores representando a possível interação de RNs, NF-1 e OTF-1 à sequência do promotor MMTV em DNA nucleossomal (Adaptado de TRUSS et al., 1995). _	77
Figura 37. Modelagem de ligação RN ao nucleossomo. _____	78
Figura 38. Esquema das construções de DNA com sítio de ligação a RNs. _____	79
Figura 39. Esquema da digestão do plasmídeo pUC18 contendo o arranjo 197.3 para liberação do vetor vazio. _____	81
Figura 40. Amplificação de DNA contendo elementos responsivos a diferentes receptores. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: 197pb+DR1-3'; poço 2: 197pb DR4-3'5'; poço 3: 197pb+DR4-3'. _____	84
Figura 41. Amostras purificadas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. _____	84
Figura 42. Purificação da digestão feita para liberar o vetor vazio. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. _____	85
Figura 43. Análise dos clones formados. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O gel mostra que somente os clones dos poços 1 e 2 parecem ter sido formados corretamente. _____	85
Figura 44. PCR do clone formado. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. _____	86
Figura 45. Digestão do clone com três enzimas de restrição, demonstrando que o clone não contém os sítios para enzimas de restrição (EcoRV, Aval e XbaI) da maneira esperada _____	86
Figura 46. DNA 601 purificado para posteriores ensaios de reconstituição de mononucleossomo. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, cedido pelo colega Martin Fonkoua. _____	87
Figura 47. Lista com as estruturas cristalográficas de diferentes NCPs (Adaptado de TAN; DAVEY, 2011). _____	89
Figura 48. Esquema ilustrativo de inserção de sequências alvo em um vetor (LI; EVANS, 1997). _____	90

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Abreviaturas e siglas	8
Índice de Tabelas	10
Índice de Ilustrações	10
Cromatina e Receptores Nucleares	15
Introdução Geral	17
Estrutura da Cromatina e Nucleossomo	17
Partícula central do nucleossomo (NCP)	17
Fibras de cromatina: 10nm e 30nm	19
Receptores nucleares (RNs)	23
Objetivo geral	27
PARTE I	28
Ação do colesterol sobre fibras longas de cromatina	28
1. Estudo de agentes desidratantes sobre a fibra de cromatina	29
2. Colesterol	32
Estrutura química	32
Papel fisiológico	32
3. Colesterol e cromatina	34
4. Objetivos específicos	37
5. Material e métodos	37
a) Histonas	37
b) Sequências longas de DNA	38
• Transformação e seleção bacteriana	40
• Extração e purificação do DNA	40
• Digestão do DNA plasmidial	40
• Purificação dos arranjos de DNA	41
c) DNA competidor	41
d) Colesterol	42

e)	Reconstituição de fibras longas de cromatina _____	43
•	Fibra de cromatina de 10nm _____	43
•	Fibra de cromatina de 30nm _____	45
f)	Desnaturação térmica _____	46
g)	Ultracentrifugação analítica (AUC) _____	47
h)	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) _____	47
i)	Microscopia eletrônica de transmissão _____	48
6.	Resultados _____	49
6.1)	Arranjos de DNA digeridos e purificados _____	49
6.2)	DNA competidor amplificado _____	49
6.3)	Formação das fibras de cromatina de 10 e 30nm reconstituídas in vitro _____	50
•	Fibra de cromatina de 10nm _____	50
•	Fibra de cromatina de 30nm _____	51
6.4)	Colesterol antecipa o ponto de saturação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída in vitro _____	51
6.5)	Colesterol desestabiliza a fibra de 10nm _____	54
a)	Colesterol promove uma termo instabilidade da fibra de 10nm _____	54
b)	Fibras de 10nm reconstituídas com colesterol apresentam menor estabilidade ao longo do tempo _____	55
6.6)	Colesterol não afeta a compactação das fibras de cromatina de 10nm _____	55
6.7)	Colesterol promove o aumento do raio hidrodinâmico das fibras de cromatina de 10nm _____	58
6.8)	Colesterol não impede a formação da fibra de 30nm _____	62
6.9)	Análise das fibras de cromatina por microscopia eletrônica de transmissão revela modos distintos de compactação _____	63
7.	Discussão e Perspectivas _____	66
8.	Conclusões _____	71
PARTE II _____		72
Estudos estruturais do complexo receptor nuclear-nucleossomo _____		72
1.	Nucleossomo e receptores nucleares _____	73
2.	Objetivos _____	79
3.	Materiais e métodos _____	79
a)	Reação em cadeia da polimerase (PCR) _____	79
b)	Purificação dos produtos da PCR _____	81

c)	Digestão do plasmídeo 197.3 em pUC18 _____	81
d)	Clonagem do HRE 197.1 em pUC18 _____	82
e)	Análise da inserção do fragmento HREs 197.1 no pUC18 _____	82
f)	Purificação do DNA 601 para formação de mononucleossomos _____	83
4.	Resultados _____	84
4.1)	Preparação dos clones _____	84
a)	Amplificação de sequência de DNA 601 contendo elementos responsivos a diferentes receptores _____	84
b)	Obtenção do vetor (pUC18) vazio _____	85
c)	Clone: 197pb +DR4-3' _____	85
4.2)	Preparo de DNA para estabelecimento de metodologia de reconstituição de mononucleossomos _____	87
a)	DNA 601 purificado _____	87
5.	Discussão e Perspectivas _____	88
	ANEXO _____	92
	Bibliografia _____	95

Cromatina e Receptores Nucleares

O DNA em seres eucarióticos é organizado na forma de cromatina, sendo esta a principal responsável por regular atividades vitais para célula, tais como o processo transcricional e a manutenção do genoma.

A cromatina é constituída por unidades repetitivas de nucleossomos, formado por complexos de proteínas (octâmero de histonas) e DNA. Estas unidades de nucleossomos podem interagir para modular a estrutura da fibra de cromatina. Por um longo tempo, o nucleossomo *per se* tem sido considerado uma barreira transcricional por poder ocupar sítios de ligação de fatores de transcrição ao DNA. De fato, recentemente, utilizando tesouras magnéticas que estiram as fitas de DNA, mostrou-se que o contato do DNA com as histonas é muito importante para estabilização do nucleossomo, sugerindo que esse contato atue como controle central da transcrição, visto que uma pequena interrupção do contato adjacente a região de entrada e saída do DNA (“*dyad*”) pode enfraquecer a barreira transcricional (BINTU et al., 2012).

Para a regulação da expressão gênica, o remodelamento constante e ordenado da arquitetura da cromatina permite que diversos complexos proteicos com ou sem atividades enzimáticas possam acessar o DNA. Conceitualmente, estas mudanças estruturais da cromatina podem ser causadas por três principais fatores, (i) mudanças nas carga das caudas das histonas, epigenética, (ii) mudança na concentração de sais e ions divalentes, como o Mg^{2+} , e (iii) presença de *linker* histona, proteína que permite o dobramento da fibra de cromatina (LI; REINBERG, 2011).

A epigenética das histonas consiste de modificações pós-traducionais das porções amino-terminais das caudas destas proteínas altamente básicas. Como fator determinante da regulação transcricional, estas mudanças de cargas das histonas podem afetar a ligação de proteínas remodeladoras à cromatina e/ou interferir no contato entre os nucleossomos, unidades repetitivas de DNA e um octâmero de histonas.

O complexo enzimático responsável por promover a epigenética das histonas é comumente recrutado ao DNA por fatores de transcrição. Os fatores de transcrição reconhecem sequências específicas no DNA, sinalizando à remodeladores da cromatina, co-reguladores e

enzimas que deve ocorrer o remodelamento da cromatina e consequente ativação ou repressão de determinado gene.

Os receptores nucleares (RNs) são conhecidos fatores de transcrição capazes de induzir o remodelamento da cromatina e consequente regulação da transcrição. Os complexos proteicos recrutados pelos RNs possuem diferentes enzimas e remodeladores da cromatina. Por exemplo, as histonas acetil-transferases (HDACs) são enzimas que fazem parte do complexo co-repressor de RNs, podendo promover a condensação da cromatina e assim o silenciamento gênico (WATSON et al., 2012). O consequente remodelamento da cromatina causado pela sinalização de RNs pode facilitar o acesso ao DNA de outros fatores de transcrição e complexos co-reguladores, que afinadamente também proporcionarão a ativação ou repressão da transcrição (HAGER; MCNALLY; MISTELI, 2009).

Assim, observamos que o mecanismo de sinalização dos receptores nucleares envolve uma intercomunicação entre proteínas (enzimas e remodeladores de cromatina), pequenas moléculas (água, sais, lipídeos) e cromatina. O descompasso destas ações ordenadas temporal e espacialmente está intimamente relacionado a diversas doenças, como demência, síndrome metabólica e câncer por exemplo (MCKENNA; O'MALLEY, 2010).

Desta forma, o estudo da modulação da estrutura da cromatina, a identificação de fatores que acarretam na sua modificação e as consequências sobre o contexto celular proteico são de suma importância para a compreensão de mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças.

Esse trabalho foi dividido em duas partes, pois foram desenvolvidos dois estudos paralelos. Sendo assim, consta de uma introdução geral e a seguir a divisão em: I) Ação do colesterol sobre fibras longas de cromatina e II) Estudos estruturais do complexo receptor nuclear-nucleossomo.

Introdução Geral

Estrutura da Cromatina e Nucleossomo

Partícula central do nucleossomo (NCP)

A cromatina é um complexo formado por unidades repetitivas de nucleossomos. Esta unidade básica da cromatina ou partícula central do nucleossomo consiste de 145-47pb de DNA enrolados (1,7 voltas) em um octâmero de histonas. O octâmero de histonas é composto por dois dímeros de H2A/H2B e um tetrâmero de H3/H4 (RICHMOND et al., 1997) (Figura 1). Este complexo é estabilizado por fortes interações entre o arcabouço de fosfato do DNA e resíduos de arginina e lisinas nas superfícies do domínio globular das histonas do octâmero. A porção N-terminal das histonas, conhecidas como caudas, encontram-se no lado externo do nucleossomo (RICHMOND, R. K., *et al.*, 1984) Além disso, todos os eucariotos possuem diversas variantes de histonas que podem ser incorporadas ao nucleossomo para especializar/marcas regiões da cromatina, sendo distinguidas das canônicas por diferenças na sequência primária de aminoácidos (MALIK, H.S.; HENIKOFF, S., 2003). A H2A.Z, por exemplo, é uma variante que apresenta por volta de 60% de similaridade de sua sequência com a H2A canônica e está presente em regiões com alta atividade transcricional (FAN et al., 2002). Intrigantemente, a estrutura atômica do NCP contendo esta variante não mostra grandes diferenças do NCP canônico, sendo a maior alteração resultante da desestabilização da interface entre o dímero (H2AZ/H2B) e o tetrâmero (H3/H4) e de alterações nas características da superfície do nucleossomo, as quais poderiam levar a mudanças na formação da estrutura mais compactada da cromatina e poderiam resultar na associação de proteínas nucleares específicas à H2A.Z (SUTO et al., 2000).



Figura 1. Estrutura do nucleossomo.

a) Visão frontal e lateral da estrutura cristalográfica do nucleossomo de 2.8 Å (PDB 1AOI). (adaptado de RICHMOND, R. K. et al., 1997). b) Estrutura das histonas que compõe o nucleossomo (adaptado de KHORASANIZADEH, 2004).

Os nucleossomos são conectados por pequenos segmentos de DNA, *linkers* DNA, que podem ter seu tamanho variável entre diferentes espécies e até mesmo entre tipos celulares do mesmo organismo. Esse tamanho varia aproximadamente de 0 a 80pb, formando unidades de repetição de nucleossomos (NRLs – *nucleosome repeat length*) em torno de 160 a 240pb (tabela 1), sendo que para a maioria dos vertebrados essa repetição varia de 175 a 190pb (WIDOM, 1992).

Tabela 1. Diferenças de NRLs.

Sistema	NRL (pb)	Ref.
<i>Aspergillus nidulans</i>	154	Morris, N. R. (1976)
Neurônio de rato	162	Pearson <i>et al.</i> (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	165	Downs <i>et al.</i> (2003)
Células HeLa	188	Compton <i>et al.</i> (1976)
Fígado de rato	196	Compton <i>et al.</i> (1976)
Timo de rato	196	Fan <i>et al.</i> (2003)
Células da glia de camundongos	201	Pearson <i>et al.</i> (1984)
Eritrócito de galinha	212	Bates e Thomas (1981)

Fibras de cromatina: 10nm e 30nm

A cromatina é compactada em diversos níveis. O nucleossomo é o primeiro nível de empacotamento do DNA, seguido pela fibra de cromatina de 10nm, conhecida como “colar de contas” (“*beads on a string*”) formadas pela repetição de nucleossomos. Com o auxílio de uma quinta histona, H1 (*linker* histona), que se liga à fibra de 10nm, ocorre uma maior compactação, resultando em uma fibra de aproximadamente 30nm. Isso foi observado em estudos estruturais e bioquímicos *in vitro* (ROBINSON et al., 2006). Além da *linker* histona, dois fatores também contribuem para a compactação da fibra de cromatina, são eles: a ligação da cauda da histona H4 de um nucleossomo a uma região acídica formada pelo dímero de H2A/H2B do nucleossomo adjacente, causando aproximação destes (DORIGO et al., 2003), e a presença de cátions mono ou divalentes que se ligam ao DNA reduzindo sua carga residual, permitindo uma maior compactação (CLARK; KIMURA, 1990). A estrutura continua sendo empacotada até a formação do cromossomo (Figura 2).

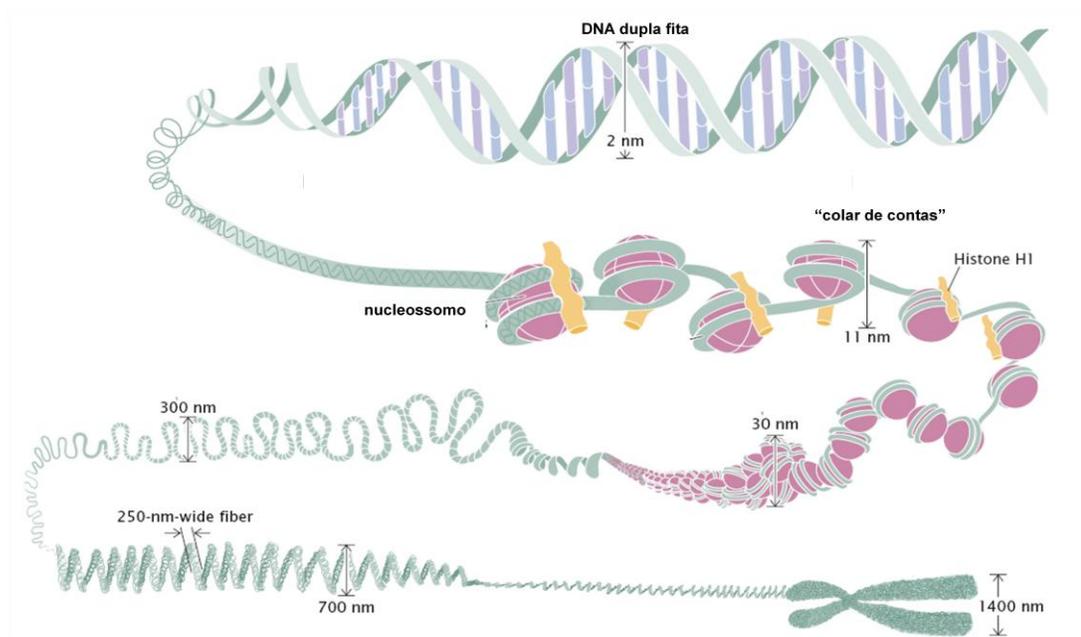


Figura 2. Compactação da cromatina (Adaptado de BENJAMIN, 2005).

A existência *in vivo* da fibra de 30nm ainda é questionável, diversas evidências *in vitro* não deixam dúvida da formação desta estrutura compactada (GHIRLANDO; FELSENFELD, 2008; LI et al., 2010; ROUTH; SANDIN; RHODES, 2008), entretanto ainda não está clara a formação da fibra de 30nm no contexto celular, visto que estudos publicados com cromossomos

de células humanas usando crio-microscopia e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) revelaram não ser possível a visualização dessa fibra (ELTSOV et al., 2008; JOTI et al., 2012).

A primeira evidência da fibra de 30nm foi demonstrada em 1976, por Finch e Klug, que investigaram a cromatina extraída do núcleo de células. O empilhamento dos nucleossomos vizinhos foi denominado por eles de “nucleofilamentos”. Através das observações de microscopia eletrônica, observou-se que as fibras eram formadas pela dissolução dos nucleofilamentos (de aproximadamente 100 Å) em hélices, formando estruturas de pelo menos 300 Å de diâmetro, consistente com uma característica helicoidal. Além disso, Finch e Klug basearam-se em estudos de difração de raios-x anteriores para propor o modelo chamado solenoide (FINCH; KLUG, 1976). Alguns anos depois, novas análises das fibras de cromatina (extraídas de eritrócito de galinha) também por microscopia eletrônica resultaram em outro modelo, o zig-zag (WOODCOCK; FRADO; RATTNER, 1984; WORCEL; STROGATZT; RILEYT, 1981).

Portanto existem dois principais modelos correntes na literatura: hélice de um início ou modelo solenoide, e hélice de dois inícios ou “zig-zag” (Figura 3). O modelo solenoide possui uma hélice de início simples em que os nucleossomos adjacentes do filamento (aproximadamente seis nucleossomos por volta) são conectados pelo *linker* DNA que se dobra para o interior da fibra caracterizando interações entre os nucleossomos consecutivos (FINCH; KLUG, 1976) (Figura 3a). Já o modelo zig-zag é composto por uma ligação reta dos nucleossomos adjacentes, o que implica interações de nucleossomos alternados (WORCEL; STROGATZT; RILEYT, 1981) (Figura 3b).

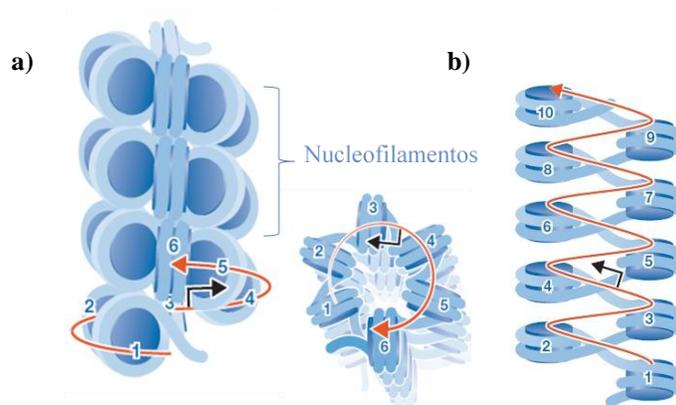


Figura 3. Esquema dos modelos de fibra de 30nm (Adaptado de QUÉNET; MCNALLY; DALAL, 2012).

- a) Modelo solenoide vista frontal e vista superior, caracterizado por seis nucleossomos (n) por volta e pelas interações entre os nucleossomos consecutivos (n1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6); b) Modelo zig-zag, demonstrando que as interações acontecem entre nucleossomos alternados (n1-3, 2-4, sucessivamente).

Uma característica diferencial importante sobre estes dois modelos é a relevância do tamanho do *linker* DNA. O modelo solenóide prediz que a dimensão da fibra é determinada por contatos invariáveis entre os nucleossomos e não leva em conta o tamanho do *linker* DNA. Em contraste, o modelo zig-zag mostrou que mudanças no tamanho do *linker* DNA podem afetar o diâmetro e até mesmo o comprimento da fibra. Além disso, o modelo solenoide mostra a fibra de 30nm sobre condições de alta concentração de sal (0,9 M NaCl), que poderia favorecer o dobramento do *linker* DNA, o qual seria responsável por aproximar os nucleossomos vizinhos e assim formar a estrutura proposta (FINCH; KLUG, 1976). Já no modelo zig-zag as fibras estão em meio isotônico, o que deixaria o *linker* DNA relaxado e por isso esse modelo é sensível ao tamanho do *linker* DNA (WORCEL; STROGATZT; RILEY, 1981).

Em 2005, Richmond e colaboradores publicaram a única estrutura cristalográfica do maior arranjo de nucleossomos cristalizado, um tetranucleossomo (PDB 1ZBB) (SCHALCH et al., 2005). Mesmo com a baixa resolução (9 Å) foi possível definir a posição do *linker* DNA e dos nucleossomos e resolver a estrutura por substituição molecular com base no cristal do NCP. A estrutura mostrou duas fileiras de dois nucleossomos com três *linkers* DNA retos cruzando entre eles, apoiando assim o modelo zig-zag (Figura 4) (SCHALCH et al., 2005). O modelo também foi corroborado por outro estudo do mesmo laboratório, no qual as imagens de microscopia eletrônica revelaram fibras (reconstituídas com histonas recombinantes) com duas fileiras de seis nucleossomos, como predito pelo modelo zig-zag. (DORIGO et al., 2004).

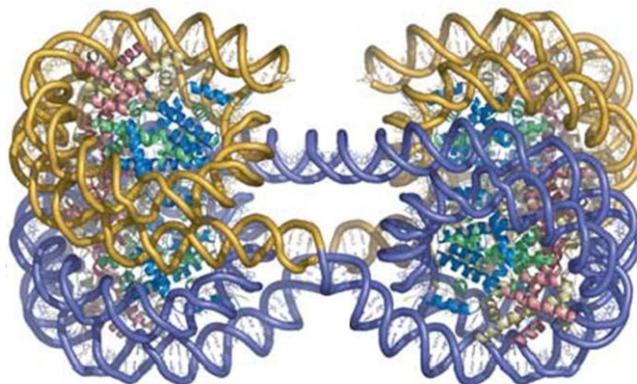


Figura 4. Vista ortogonal do cristal do tetranucleossomo publicado em 2005 (Adaptado de SCHALCH et al., 2005).

Rhodes e colaboradores, favoráveis ao modelo solenoide, publicaram, um ano depois da divulgação do cristal do tetranucleossomo, os resultados do estudo realizado com fibras

reconstituídas *in vitro* com diferentes espaçamentos de DNA e número de repetições de uma sequência descrita como sendo de forte posicionamento de nucleossomos, com fibras contendo até 72 nucleossomos (ROBINSON et al., 2006). As imagens de microscopia eletrônica revelam que foram encontrados dois diâmetros principais de fibra, em torno de 33nm para *linkers* DNA de até 40pb, e 44nm para *linkers* DNA de 50 a 70 pb. Isso tornou o modelo solenoide também sensível ao tamanho do *linker* DNA, mas não de forma escalonada com no modelo zig-zag, em que qualquer mudança no *linker* DNA afeta o diâmetro da fibra. Também foram observados 11 nucleossomos a cada 11 nm para as fibras de 33 nm e 15 nucleossomos a cada 11 nm para as fibras de 44 nm. Em vista desses achados foi proposto um modelo complementar: solenoide interdigitado. Esse novo modelo leva a um maior empacotamento dos nucleossomos com um contato regular face a face entre eles (Figura 5).

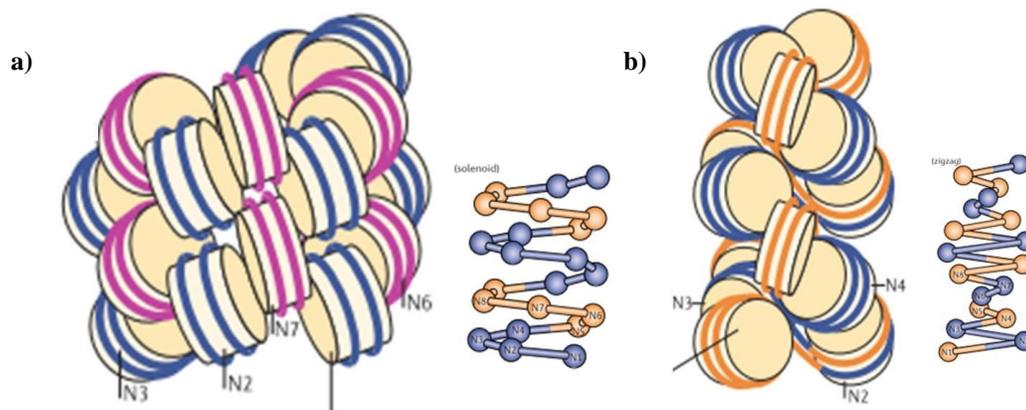


Figura 5. Comparação dos modelos de fibra de 30nm.

a) Modelo solenoide interdigitado b) Modelo zig-zag (Adaptado de LUGER; DECHASSA; TREMETHICK, 2012).

No entanto, ainda existem dúvidas quanto aos dois modelos e os pesquisadores estão em busca de melhores condições de cristalização da fibra de 30nm para finalmente desvendar sua estrutura.

De maneira simplificada, a cromatina de organismos eucariotos pode ser dividida em dois grupos extremos: i) uma forma ativa (induzível) conhecida como eucromatina e ii) uma forma inativa (silenciada) chamada de heterocromatina (BASSETT et al., 2009). Quando a cromatina está em sua estrutura relaxada, eucromatina, existe fácil acesso de fatores de transcrição, como receptores nucleares e co-reguladores a regiões no DNA livres de nucleossomo, podendo ocorrer assim a transcrição. Quando a cromatina está compactada, heterocromatina, os fatores de

transcrição, co-reguladores e a maquinaria transcricional basal não conseguem acessar o DNA para ativar ou reprimir a expressão gênica.

O remodelamento da cromatina é altamente dinâmico, com a participação de diversas proteínas. Em 2002, em um trabalho realizado com cromatina reconstituída *in vitro* observou-se que os fatores de transcrição HNF3 (*hepatocyte nuclear factor 3*) e GATA-4, conhecidos fatores que reconhecem o *enhancer* do gene da albumina, ligam-se aos seus sítios na cromatina compactada e promovem a abertura local do nucleossomo na ausência de enzimas ATP-dependentes (CIRILLO et al., 2002). Além disto, em 2010 foi demonstrado que receptores nucleares podem se ligar primariamente a superfície da cromatina quando esta se encontra em sua forma compactada. Neste trabalho mostrou-se que o RAR/RXR liga-se a superfície da cromatina compactada, possibilitando o recrutamento de enzimas modificadoras de histonas (p300) e remodeladores de cromatina (SWI/SNF). Assim, foi demonstrado que pode ocorrer um rearranjo nucleossomal sob tratamento hormonal (LI et al., 2010).

Receptores nucleares (RNs)

Como um clássico fator de transcrição, os RNs ligam-se a seqüências específicas no DNA, recrutando co-reguladores para auxiliar o processo transcricional. Os RNs regulam a expressão gênica, em resposta a pequenas moléculas lipofílicas, de maneira altamente tecido-específica. Utilizando diversas estratégias, os RNs podem ativar ou reprimir a expressão gênica em resposta a um ligante (SANTOS, GUILHERME M *et al.*, 2011). Esses receptores são proteínas de organização modular, com uma porção N-terminal, um domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio curto de conexão, e a porção C-terminal com o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Figura 6). Extensos estudos estruturais desses domínios isolados de vários receptores já foram realizados, fornecendo uma excelente visão do comportamento individual destes domínios (RENAUD; MORAS, 2000).



Figura 6. Esquema de estrutura primária do receptor nuclear.

O domínio N-terminal é bastante variável tanto em tamanho quanto em conservação de aminoácidos. Este domínio contém uma região de ativação autônoma, AF-1 (*ligand-independent transcriptional activation function*), que promove a ativação da transcrição na ausência de hormônio (ligante). O DBD é um domínio pequeno (até 100 aminoácidos) altamente conservado quanto a sequência entre os diversos receptores e é capaz de reconhecer os elementos responsivos de DNA (sequências específicas localizadas no promotor dos genes). A porção C-terminal possui a interface de dimerização; o domínio de ligação ao ligante (LBD), o qual tem cerca de 250 resíduos de aminoácidos moderadamente conservados, onde ocorre a ligação do receptor ao hormônio (ligante); e a região AF-2 (*ligand dependent activation function*), que após a ligação do ligante, constitui o sítio de ancoragem de proteínas co-ativadoras. Entre o DBD e o LBD encontra-se uma região flexível (*hinge*) que permite a movimentação dos domínios para interação diméricas com outros receptores (NAGY; SCHWABE, 2004). O esquema dessa estrutura pode ser observado na figura 6.

Os RNs reconhecem sequências de DNA específicas, localizadas no promotor dos genes alvos, conhecidas como elementos responsivos hormonais (HREs). Comumente, os HREs são repetições do hexanucleotídeo “AGGTCA” que podem ter diferentes orientações (repetições diretas, palíndromos ou palíndromos invertidos) e são espaçados por um número variável de nucleotídeos. Essas diferentes orientações e espaçamentos dos HREs possuem grande impacto na formação de complexos de RNs com DNA. Como podemos observar na figura 7, o receptor do hormônio tireoidiano (TR), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR) e o receptor ativado por proliferadores peroxissomal (PPAR) formam heterodímeros com o RXR e se ligam a repetições diretas (DRs) do hexâmero, em diferentes espaçamentos.

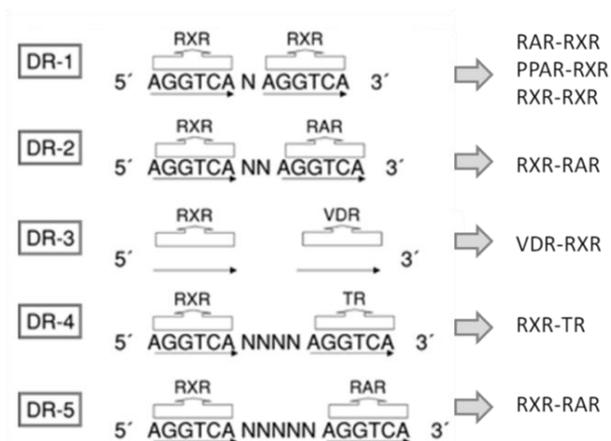


Figura 7. Receptores nucleares associados as suas seqüências cognatas (Adaptado de BARRA; NEVES, 2004).

O mecanismo molecular clássico de ação dos RNs de regulação positiva e negativa já está bem estabelecido (NAGY; SCHWABE, 2004). Na regulação negativa (ausência do ligante) os RNs encontram-se ligados aos elementos responsivos, na forma de homodímeros ou heterodímeros que interagem com proteínas co-repressoras para reprimir a transcrição gênica. A estimulação dos RNs por ligantes específicos promove a dissociação das proteínas co-repressoras e a associação de proteínas co-ativadoras, caracterizando a regulação positiva. Dessa forma, irá ocorrer a ativação da maquinaria de transcrição basal e a transcrição de genes alvo. Entretanto, quando em presença de ligantes, os RNs podem utilizar também diversos mecanismos para reprimir a transcrição. Por exemplo, para que o hormônio tireoidiano (T3) possa inibir a expressão gênica do TSH é preciso ocorrer uma conversa cruzada entre TR e outro fator de transcrição, GATA2 (FIGUEIRA et al., 2010). Este mecanismo é conhecido como transrepressão

Os RNs, como outros fatores de transcrição, dependem de mudanças locais na estrutura da cromatina para ter acesso ao DNA e poder recrutar co-reguladores e fatores remodeladores da cromatina e assim regular a expressão de genes alvo. Estas mudanças estruturais da cromatina favorecem a comunicação entre os RNs, co-reguladores, remodeladores da cromatina e maquinaria transcricional basal (WIENCH; MIRANDA; HAGER, 2011). Dois principais processos foram demonstrados como reguladores dessa dinâmica de remodelação da cromatina regulada por RNs, um envolvendo complexos remodeladores de nucleossomos e outro, que aborda as modificações pós-traducionais (PTMs) das histonas.

Os complexos remodeladores estão divididos basicamente em cinco famílias que possuem um domínio em comum, ATPase, no qual a energia da hidrólise do ATP é utilizada para mover,

desestabilizar, ejetar ou reestruturar o nucleossomo. Cada família possui proteínas especializadas que formarão o complexo ativador ou repressor da transcrição que irá determinar o processo biológico que pode ocorrer (SAHA; WITTMAYER; CAIRNS, 2006). Essa dinâmica envolve vários fatores tais como os complexos co-ativadores que incluem o SWI/SNF, CBP/SRC-1/p/CAF e TRAP/DRIP/ARC. O SWI/SNF são proteínas ATPs-dependentes e o CBP e p/CAF possuem atividade de acetiltransferases. Esses complexos podem atuar em conjunto, relaxando a cromatina e facilitando o acesso dos fatores de transcrição. Como parte do complexo co-repressor, uma deacetilase de histona (HDAC) promove a remoção de grupos acetila de resíduos de lisina nas caldas de histonas resultando na remodelação da cromatina (GLASS; ROSENFELD, 2000)

Em 2011, um estudo mostrou que a ligação ao DNA do heterodímero intacto VDR-RXR altera a dinâmica dos receptores em regiões periféricas dos DBDs, incluindo as superfícies de interação com co-ativadores e co-repressores, sugerindo um mecanismo pelo qual os RNs podem exibir uma atividade específica no promotor e promover efeitos diferenciados em vários genes alvo (ZHANG et al., 2011).

Objetivo geral

Na primeira parte deste trabalho buscamos encontrar as melhores condições experimentais para formação das fibras de cromatina, 10 e 30nm. Para tanto, utilizou-se o colesterol como agente desidratante da fibra de cromatina e possível remodelador da sua estrutura.

Na segunda parte, procuramos melhor compreender da interação, ao nível atômico, de um receptor nuclear a um mononucleossomo. Para isso, intencionamos revisar a literatura e iniciar o estabelecimento de uma metodologia para obtenção da valiosa estrutura do complexo NCP: RN.

PARTE I

Ação do colesterol sobre fibras longas de cromatina

1. Estudo de agentes desidratantes sobre a fibra de cromatina

Com o objetivo de obter estáveis fibras de cromatina para estudos estruturais, o grupo de pesquisa do laboratório de farmacologia Molecular liderado pelo Prof. Dr. Guilherme Santos iniciou novos estudos para observar o efeito de agentes desidratantes, como lipídeos, detergentes e alcoóis, sobre a fibra de cromatina. A idéia de desidratar a fibra, ou seja, retirar a água, veio da observação da contribuição desta molécula para formação do nucleossomo e condensação da cromatina (DAVEY et al., 2002).

De uma forma geral, uma solução de macromoléculas em água possui i) uma parte de moléculas de solventes que não são perturbados pelo soluto, ii) moléculas que interagem com a superfície das macromoléculas, e iii) moléculas que são rigidamente ligadas em fendas profundas ou cavidades. Por meio de técnicas estruturais como a cristalografia e NMR (ressonância magnética nuclear) pode-se observar a água interagindo com proteínas e com o DNA (SCHWABE, 1997)

O interesse pelo papel da água nas interações proteínas/DNA foi despertado primeiramente pelas estruturas cristalográficas de repressores (repressor do fago 434 e repressor *trp*) ligados ao DNA (AGGARWAL et al., 1988; OTWINOWSKI et al., 1988). Esses trabalhos mostraram que determinadas ligações de hidrogênio eram muito importantes para a conformação que o DNA adotava quando ligado ao repressor 434 e ainda, no caso do repressor *trp*, que algumas moléculas de água mediavam o contato entre os resíduos de aminoácidos e os pares de base importantes para a especificidade da interação com o repressor. Conclui-se que a água não se encontrava na estrutura somente preenchendo espaços, mas também com um papel importante nas interações dos complexos.

O DNA é uma molécula altamente carregada devido aos grupos fosfato. Ele possui basicamente dois elementos de carga negativa, a cada giro de DNA (0,34nm), fazendo com que a neutralização de cargas seja essencial para diminuir a auto-repulsão quando acontece a compactação da cadeia para formação da cromatina (KOMURA, OHTA, 2012). Essa neutralização é proporcionada pela ligação das histonas, que são carregadas positivamente, e conseqüentemente, ocorre a formação do nucleossomo (BENTLEY et al., 1984; MATERESE; SAVELYEV; PAPOIAN, 2009).

Em trabalho publicado em 2002, identificaram-se mais de 3.000 moléculas de água na estrutura do cristal de um nucleossomo (1.9 Å) (DAVEY et al., 2002). Na chamada camada primária de hidratação, que compreende moléculas de água na distância máxima de 3,5 Å de algum átomo das histonas ou do DNA, foram encontradas 2.088 moléculas (2/3 do total). Dessas, 1.108 moléculas estavam ao redor do DNA, dentre elas 302 foram encontradas no sulco menor, as quais tinham a importância de facilitar a inserção de cadeias laterais de argininas das histonas. Além disso, pode-se observar que a água é um elemento importante para estabilidade do nucleossomo, uma vez que observou-se número aproximadamente igual de moléculas (121), que faziam a interação entre as histonas e o DNA por meio de ligações de hidrogênio, e de macromoléculas que faziam ligações diretas (116), sem a mediação pela água (DAVEY et al., 2002).

As ligações de hidrogênio envolvidas na interação do DNA com as proteínas podem ocorrer de duas maneiras, assistindo à interação ou facilitando-as. As moléculas envolvidas em “assistir” auxiliam as ligações entre as cadeias principais ou entre as cadeias laterais das histonas com o grupo fosfato do DNA, que já apresenta uma ou mais ligações diretas de hidrogênio. Já as moléculas “facilitadoras” conectam grupos que estão mais distantes ou aqueles grupos que estão orientados inapropriadamente para permitir ligações diretas, por exemplo, as moléculas de água no NCP são na maioria “facilitadoras” representando 83% das ligações de hidrogênio (DAVEY et al., 2002).

Ressalta-se que a visualização detalhada da estrutura da água na interface do nucleossomo mostrou que as moléculas de água não só contribuem de forma significativa para a estabilidade de ligação ao DNA, como também por adaptarem a superfície da histona a variações na conformação do DNA. Isso sugere que as ligações feitas pelas moléculas de água podem desempenhar um papel principal na promoção da mobilidade do nucleossomo, fornecendo uma via de interação para mudar a posição do grupo fosfato (DAVEY et al., 2002). Esse estudo mostrou, portanto, as moléculas de água ao nível de um nucleossomo. No entanto, para longas fibras de cromatina visualizar o comportamento da água não é tarefa fácil, já que envolve milhares de moléculas de água e íons.

Para tentar resolver essa questão, muitos pesquisadores utilizam simulações computacionais. Essas simulações são uma forma robusta de avaliação das interações envolvidas, pois as limitações para a realização desses estudos são muitas, uma vez que devem incorporar milhares de átomos e exigem uma escala de tempo muito além de microsegundos (KOROLEV et al., 2012). Muitos estudos de simulação de cromatina foram publicados ao longo dos anos (GAN; SCHLICK, 2010; KEPPEL et al., 2008; WEDEMANN; LANGOWSKI, 2002), sendo a maioria deles fundamentado pelo modelo “*course-grained*” (CG). Esse modelo baseia-se na simplificação da representação dos átomos do sistema chamados de “centros”. Com essa centralização dos átomos, as simulações têm menos custos, permitindo a análise de sistemas mais complexos, como a cromatina.

No entanto, o objetivo principal desses estudos não foi demonstrar como a água poderia interferir na estrutura da cromatina, e sim demonstrar sua dinâmica (abertura e compactação) e o seu modelo estrutural (zig-zag ou solenoide). Sendo assim o interesse do grupo orientado pelo prof. Guilherme Santos foi o de analisar a estrutura da cromatina frente a alterações nas interações eletrostáticas através da retirada da água.

As interações eletrostáticas que envolvem a cromatina podem ser alteradas por modificações nas caudas das histonas, devido à mudança de cargas, e também pela concentração de íons em meio aquoso (MATERESE; SAVELYEV; PAPOIAN, 2009). A compactação da cromatina sobre diferentes concentrações de íons pode ser predita pela energia eletrostática livre do DNA no sítio de ligação à *linker* histona, o qual determina a proximidade dos *linkers* DNAs. A ligação da H1 ao DNA reduz consideravelmente essa energia livre por deslocar cátions ligados e reduzir a carga residual do DNA (CLARK; KIMURA, 1990). Portanto, o estudo das interações eletrostáticas da cromatina é muito importante para determinação da sua estrutura e consequente controle da expressão gênica.

Utilizando diversas técnicas bioquímicas e biofísicas, estudamos a formação do nucleossomo e fibras de cromatina em presença de agentes desidratantes, como o colesterol.

2. Colesterol

Estrutura química

O colesterol é um álcool de cadeia longa, também considerado como esteroide, devido a quantidade de anéis de carbono (Figura 8). A molécula apresenta três regiões: uma cauda de hidrocarbonetos, uma região com quatro anéis de carbono e um grupo hidroxila. O grupo hidroxila é polar, já os anéis de carbono e a cauda de hidrocarbonetos são apolares, consequentemente é um composto considerado anfipático, ou seja, possui uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso) e outra região hidrofóbica (solúvel em solventes orgânicos). Por esse motivo ele tende a formar bicamadas espontaneamente em solução aquosa (ALBERTS, B. et al., 1994).

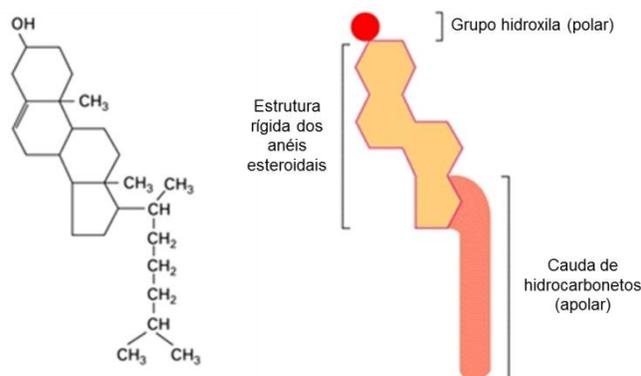


Figura 8. Estrutura química do colesterol (Adaptado de Alberts *et al.* 1994).

Papel fisiológico

O colesterol é um lipídeo largamente encontrado nas membranas celulares e é o principal esteroide sintetizado pelo organismo humano, sendo o precursor dos hormônios esteroidais (progesterona, estrogênio, testosterona, glicocorticoides e mineralocorticoides), ácido biliar e vitamina D (HANUKOGLU, 1992). Esta molécula está associada a diversas doenças, como doenças cardíacas, renais, inflamatórias e até mesmo neurodegenerativas (ANCHISI et al., 2012; FÉLIX-REDONDO; GRAU; FERNÁNDEZ-BERGÉS, 2013).

Os lipídeos em geral são caracterizados por serem insolúveis em água. No caso do colesterol, ele é transportado no sangue por apolipoproteínas (Apo), que se ligam as moléculas de colesterol e formam as lipoproteínas. A Apo-B interage com o colesterol de baixa densidade (LDL) e é responsável pelo transporte do colesterol do fígado para outras partes do corpo, e a Apo-A está associada ao colesterol de alta densidade (HDL) e faz o transporte do colesterol de volta para o fígado para sua excreção (CARROLL, D. J, GRUMMER, 1988).

A síntese do colesterol é realizada principalmente no fígado, mas também acontece no intestino, órgãos reprodutivos e glândulas adrenais. O principal mecanismo regulatório da síntese do colesterol é o próprio nível de colesterol intracelular. Por exemplo, quando há um acúmulo de colesterol dentro das células a atividade da enzima HMG-CoA redutase (principal enzima envolvida na síntese do colesterol) é diminuída, limitando a produção de colesterol. Ademais, as proteínas de ligação ao elemento de resposta à esterol (SREBPs) são muito importantes na regulação da síntese do colesterol, uma vez que regulam a transcrição da enzima HMG-CoA redutase, além de modular a transcrição de vários outros genes de outras enzimas, importantes para a cascata da síntese do colesterol e de genes envolvidos na síntese de receptores mediadores na captação de colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1997).

A referência para o nível de colesterol total no plasma sanguíneo de indivíduos normais adultos é até 200mg/dL, sendo 240mg/dL considerado muito alto (Sociedade Brasileira de Cardiologia). Devido à falta de informação na literatura, não conseguimos dados precisos das concentrações do colesterol no meio celular e nuclear. Algumas evidências mostram que 65 a 90% do total de colesterol celular está presente na membrana plasmática, representando uma concentração, em média, de 200-300µg/mg de proteína (YEAGLE, 1985). O restante encontra-se em organelas ou ligado a proteínas (MAXFIELD; WÜSTNER, 2002).

Além de fazer parte da estrutura de membranas celulares de eucariotos, o colesterol tem um papel importante na modulação da atividade de vários receptores de membrana, tanto por se ligar diretamente à proteínas, alterando suas conformações, como acontece no caso dos receptores de acetilcolina (AChR); ou por modular as propriedades físicas das membranas lipídicas, aumentando a solubilidade da membrana, como no caso dos receptores de colecistoquinina (CCK) (BURGER; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2000).

Como molécula sinalizadora, o colesterol é capaz de interferir no mecanismo de atividade de receptores de membrana acoplados à proteína G e de receptores nucleares. A rodopsina, receptor de membrana encontrado no epitélio pigmentar da retina, é um dos receptores acoplados à proteína G mais estudado, inclusive quanto a sua interação com o colesterol. Frente a uma exposição à luz, o receptor (rodopsina) é induzido a uma série de mudanças conformacionais que levam a conversão de metarrodopsina I à metarrodopsina II, resultando numa cascata de sinalização, responsável pela adaptação do olho ao escuro. O equilíbrio entre essas conformações do receptor e consequente ativação das vias de conversão pode ser alterado pelos níveis de colesterol presentes na membrana plasmática ou pela interação direta do colesterol com o receptor (BURGER; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2000).

No caso dos receptores nucleares, o *liver X receptor* (LXR) atua como um sensor para o colesterol. Diante de um aumento dos níveis de colesterol, há acúmulo celular de oxisteróis, ligantes naturais do LXR e resultantes da oxidação do colesterol, que ativam o receptor. Por sua vez, o LXR ativado promove o aumento da expressão de um grupo de genes, como UGT1A1, UGT1A3, ABCG1, responsáveis pela proteção da célula contra uma possível sobrecarga de colesterol. Isso faz com que haja um aumento do efluxo de colesterol nos tecidos periféricos, ao mesmo tempo em que diminui a absorção e aumenta a excreção fecal do colesterol no intestino (ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT, 2010).

O LXR tem surgido como potente alvo de novas drogas com um grande interesse no desenvolvimento de ligantes sintéticos, pois além de ser considerado um dos maiores reguladores de lipídeos e metabolismo do colesterol, tem atividade anti-inflamatória. Foi demonstrado que o LXR ativado leva a repressão da expressão de mediadores inflamatórios, como a interleucina 6 (IL-6) e a cicloxigenase 2 (COX-2), por exemplo (JAKOBSSON et al., 2012).

3. Colesterol e cromatina

Lipídeos e lipoproteínas podem afetar o ambiente celular, incluindo a sobrevivência e diferenciação de células, por ativação de receptores de superfície celular ou através da interação com fatores regulatórios citoplasmáticos que estimulam ou reprimem vias de transdução de sinais específicos (ZAINA et al., 2005). O mecanismo de expressão gênica mediado pelo colesterol tem sido intensamente estudado (BORTNICK et al., 2000; ZENG et al., 2004), entretanto, ao nosso

conhecimento, ainda não existe muita informação do efeito do colesterol sobre a própria fibra de cromatina. Existem estudos que relacionam alguns ácidos graxos, como o ácido butírico (DAVIE, 2003) e ácido valérico (BENJAMIN; JOST, 2001), com regulação epigenética, porém estudos com o próprio colesterol são mais raros.

Trabalho que evidenciou o colesterol associado à cromatina foi publicado em 2002 realizado com cromatina extraída da fração lipídica do núcleo de hepatócitos de fígado de camundongos em regeneração, e demonstrou que o colesterol forma um complexo com a esfingomielina, associando-se à cromatina (ALBI; MAGNI, 2002). Através de digestão da cromatina com SMase (esfingomielinase) foram encontrados dois *pools* de colesterol: um chamado de colesterol livre, visto na cromatina não digerida; e outro resultante da digestão, que representa a soma do colesterol livre e daquele associado à esfingomielina. Foi observado que durante a regeneração do fígado, logo após a hepatectomia nos camundongos, o colesterol estava aumentado, enquanto a síntese da esfingomielina era inibida pelo aumento da atividade da esfingomielinase natural, demonstrando que o colesterol é muito importante na fase de proliferação celular (ALBI; MAGNI, 2002).

Outros trabalhos publicados não associam diretamente a molécula de colesterol à cromatina, mas sim às lipoproteínas que o transportam. Em 2002, Panin e colaboradores detectaram grande imunoreatividade das apolipoproteínas A-I (associado ao HDL), Apo-B (associado ao LDL) e Apo-E (associado ao HDL e VLDL) na fração de proteínas nucleares não histonas isoladas do núcleo de células de vários tipos de tecidos de camundongo, principalmente aqueles com alta atividade proliferativa (fígado, baço, e medula óssea). O que sugeriu que as apolipoproteínas não participam apenas do transporte de lipídeos dentro do núcleo, mas também exercem um papel regulatório associado a alterações da transcrição (PANIN; RUSSKIKH; POLYAKOV, 2000).

Já em estudo de genômica ampla, publicado em 2004 (LUND et al., 2004), investigou-se o efeito de diferentes lipoproteínas no perfil de metilação global do DNA. Esse estudo demonstrou padrões alterados de metilação do DNA em aorta de ratos propensos à aterosclerose (mutantes nulos para Apo-E) antes do aparecimento de qualquer lesão. Por esse motivo, os autores sugerem que as alterações no perfil de metilação do DNA são marcas para o início da

aterosclerose. Para comprovar esses resultados, nesse mesmo trabalho os pesquisadores realizaram ensaios *in vivo* com células humanas THP-1 (linhagem de células de monócitos) incubadas com lipoproteínas aterogênicas, que demonstraram um perfil de hipermetilação do DNA, além de uma diminuição da acetilação da histona H4. Os autores sugerem que a formação de heterocromatina e consequente silenciamento gênico, devido à diminuição da acetilação, seriam marcas que antecedem e contribuem para as características histopatológicas associadas à aterosclerose. (LUND et al., 2004).

Diante do exposto, podemos observar que há pouca informação na literatura sobre os aspectos estruturais da interação do colesterol com a cromatina. Assim, trabalhamos com fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*, na tentativa de elucidar os potenciais efeitos do colesterol sobre as interações intra e internucleossômicas.

4. Objetivos específicos

Observar o efeito do colesterol sobre a arquitetura da cromatina e possível ação remodeladora de sua estrutura. Para isso objetivou-se estudar:

- Efeito do colesterol na formação da fibra de cromatina de 10nm e 30nm, reconstituídas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de colesterol;
- Efeito do colesterol na estabilidade da fibra de cromatina de 10nm e 30nm, reconstituídas *in vitro*;
- Visualização das fibras de cromatina de 10nm e 30nm reconstituídas *in vitro* na presença e ausência de colesterol.

5. Material e métodos

a) *Histonas*

As histonas foram extraídas de eritrócitos de galinha. Foram usadas histonas já extraídas e purificadas pelo prof. Guilherme Santos no Laboratório de Biologia Molecular do MRC (*Medical Research Council*). Brevemente, o protocolo (Routh, 2009) para purificação do HO consistiu em:

1. Filtração e lavagem do sangue de galinha com posterior centrifugação, a fim de decantar os eritrócitos;
2. Lise dos eritrócitos em tampão contendo sais, agente redutor, EDTA e Triton, com a liberação de núcleos intactos, separados por centrifugação e novamente lavados com o mesmo tampão, até que os núcleos estivessem brancos e o sobrenadante incolor;
3. Isolamento de longos fragmentos de cromatina: digestão da cromatina com a enzima I Micrococcal Nuclease (MNase) a 37°C, lise do núcleo e separação dos debris celulares da cromatina por centrifugação. Os longos fragmentos de cromatina foram purificados em coluna de filtração em gel (Sephacrose 4B-Cl);
4. Purificação do octâmero de histonas: longos fragmentos de cromatina foram concentrados e trazidos à concentração de 3M de NaCl. Nesta concentração, o HO

dissocia do DNA, porém, permanece como octâmero. Remoção do DNA usando coluna de hidroxiapatita (liga ao DNA e HO sai no *void volume*);

5. Para remover qualquer histona que possivelmente tivesse se desvinculado do complexo, foi feita purificação final dos HO por filtração em gel (coluna Superdex 200);

As histonas foram armazenadas a -20°C e estocadas em 50% de glicerol, agente crioprotetor, e em alta concentração de sal (3M NaCl), para manter a estabilidade das proteínas. A integridade dos estoques foi checada por eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida 14% (SDS-PAGE) (Figura 9).

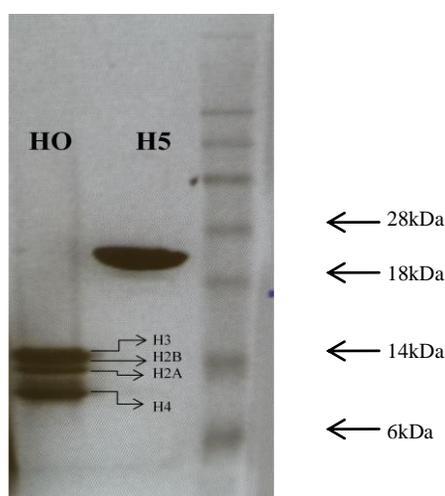


Figura 9. Integridade das histonas utilizadas. Gel de SDS-PAGE 14% corado com solução de comassie blue.

b) Sequências longas de DNA

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

- 177.36 (147pb + 30pb *linker* DNA- repetidos 36 vezes)
- 197.15 (147pb + 50pb *linker* DNA- repetidos 15 vezes)
- 197.25 (147pb + 50pb *linker* DNA- repetidos 25 vezes)

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

1. A sequência (601 DNA) foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de *primers* desenhados contendo sítios de restrição para EcoRI, EcoRV, XbaI, e AvaI;
2. O “DNA 601” foi excisado com as enzimas de restrição EcoRI/XbaI e clonado em um vetor (pUC18);
3. Multimerização: os clones foram transformados e crescidos em DH5 α e *E.coli*, e posteriormente purificados e digeridos com a enzima AvaI. Os fragmentos de “DNA 601” foram unidos com a enzima T4 DNA ligase;
4. Os produtos foram fracionados por corrida eletroforética em gel nativo de agarose 1,2% e as bandas do gel de interesse (arranjos desejados) foram extraídas e purificadas;
5. Os arranjos foram então ligados em vetor pUC18 que possui resistência a ampicilina e regiões flanqueadoras com sítios para EcoRI/XbaI e EcoRV (Figura 10).

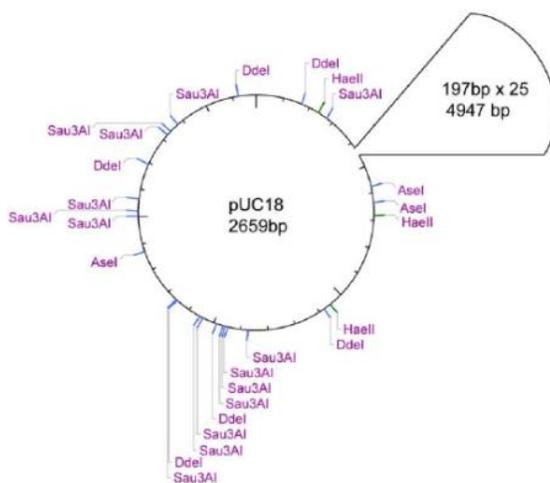


Figura 10. Plasmídeo (pUC18) contendo o arranjo 197.25 e sítios de enzimas de restrição (Routh, 2009).

- ***Transformação e seleção bacteriana***

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

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

- ***Extração e purificação do DNA***

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

- ***Digestão do DNA plasmidial***

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

- ***Purificação dos arranjos de DNA***

A separação dos fragmentos desejados foi realizada utilizando 0,5-5% de PEG 6000 + 2,5M NaCl, que permite a precipitação apenas dos longos fragmentos de DNA. Foi feita incubação por 10 minutos no gelo após a adição do PEG 6000 + 2,5M NaCl e posterior precipitação por centrifugação a 4°C por 20 minutos com velocidade de 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado para outro tubo de centrífuga e o pellet ressuscitado em TE (Tris-HCl/EDTA). O pellet e o sobrenadante foram avaliados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. Na primeira rodada (adição de 5% de PEG) nenhum dos fragmentos precipitou. Assim, acrescentou-se 0,5% de PEG ao sobrenadante e repetiu-se o protocolo até atingir a concentração de PEG ideal para precipitar os longos fragmentos. Após a completa precipitação, juntaram-se todos os pellets, contendo os fragmentos desejados e foi feita purificação com fenol/clorofórmio, precipitação com etanol e a ressuspensão do DNA em TE.

c) DNA competidor

O DNA competidor (crDNA) é uma sequência de 147pb aleatória, que utilizamos na reconstituição de cromatina *in vitro*, e que se liga com menor afinidade que a sequência 601. Assim, na reconstituição da cromatina, o crDNA previne a supersaturação das fibras de cromatina reconstituídas com arranjos de DNA 601, “sequestrando” o excesso de histonas para formar o mononucleossomo. Isso garante que as fibras contenham quantidades estequiométricas de arranjo de DNA 601, HO e *linker* histona.

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

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

Forward Primer: 5'... ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG 3'

Reverse Primer: 5'...GCTCACAATTCCACACAACATACGCGCC 3'

Foi feita uma reação única, para amenizar eventuais erros, e dividida em torno de 60 reações de 50 µL cada, contendo: tampão PCR 1X (+KCl – Fermentas); 2,5mM MgCl₂; 0,25mM dNTPs (Fermentas); 51ng pUC18; 3µM *primers forward e reverse*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As reações foram realizadas simultaneamente com os seguintes ciclos programados no termociclador (BioRad – Thermal Cycler T100):

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

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

d) Colesterol

Foi utilizada uma solução aquosa de colesterol sintético 500X (SyntheChol™ NS0 Supplement – Sigma Aldrich). Este colesterol é patenteado pela Sigma, e apesar de nossos diversos pedidos, não nos foi fornecida a concentração exata. Assim, determinou-se a medida da concentração de colesterol total da solução por método colorimétrico (no laboratório de bioquímica do HUB e no Laboratório Sabin) em três concentrações crescentes: 100X, 200X e 300X. Os resultados obtidos foram: 45mg/dL, 88mg/dL e 143mg/dL respectivamente. A solução estoque de 500X apresenta a concentração estimada de 225mg/dL. As concentrações utilizadas nesse trabalho variaram de 1X a 100X. Em molaridade, as concentrações predominantemente utilizadas nos ensaios foram de 11,6µM e 116µM (cálculos no anexo).

e) *Reconstituição de fibras longas de cromatina*

- *Fibra de cromatina de 10nm*

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

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

Tabela 2. Exemplo de titulação de HO.

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

Cada reação foi transferida individualmente para pequenos tubos de vidro siliconados, que foram fechados com membrana de diálise com poros 3-7 kDa (*Snake Skin Pleated Dialysis Tubing* – Thermo Scientific), para realização de uma diálise lenta.

Todos os pequenos tubos de vidros foram transferidos de cabeça para baixo, de forma que a solução ficasse em contato com a membrana, para um saco de diálise da mesma membrana anterior (*cut-off* de 3 ou 7 kDa), contendo 30 mL de tampão em alta concentração de sal (2M NaCl, 10mM TEA-HCl pH7.4, 1mM EDTA). Este saco com os tubos foi posteriormente transferido para um béquer contendo um grande volume de tampão (4L) na ausência de sal (10mM TEA-HCl pH 7.4, 1mM EDTA) (Figura 11). Deixou-se dialisando sob agitação lenta a 4°C por 12-20hs. Após a diálise os pequenos tubos de vidro foram retirados do saco de diálise e analisados por eletroforese em gel nativo de agarose 0,8% e TBE 0,2X.

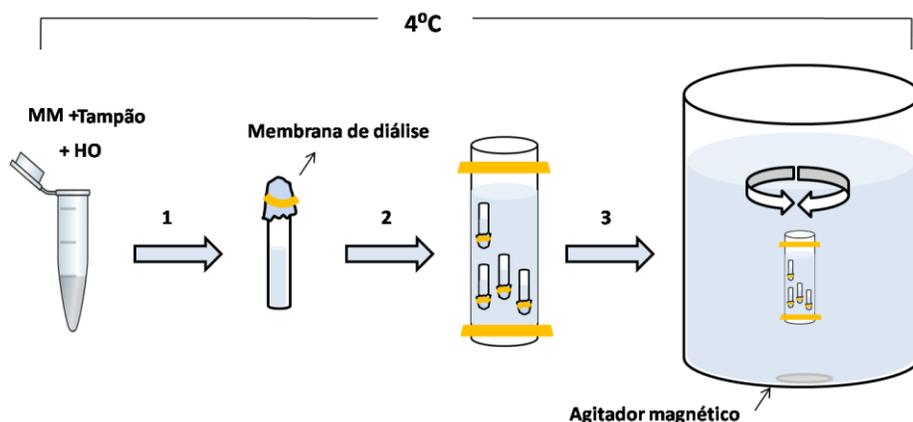


Figura 11. Esquema ilustrativo das etapas realizadas na reconstituição *in vitro* de fibras de cromatina de 10nm. Etapa 1: transferência das reações (contendo alta concentração de sal) para pequenos tubos de vidro siliconados fechados com membrana de diálise. Etapa 2: transferência dos tubos de vidro de cabeça para baixo para um saco de diálise em alta concentração de sal. Etapa 3: transferência do saco de diálise contendo os tubos de vidro para um béquer com tampão na ausência de sal. Diálise *overnight*, sob agitação lenta, a 4°C.

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

Os três “ambientes” de diálise e a agitação moderada são essenciais para que ocorra uma diálise lenta, o que promove a ligação do octâmero de histonas, de forma organizada e preferencial, aos sítios com forte posicionamento de nucleossomos ao DNA 601. Após a total diálise, o sistema encontra-se em equilíbrio, com todos os ambientes com a mesma concentração de sal (aproximadamente 15mM de NaCl) (Figura 12).

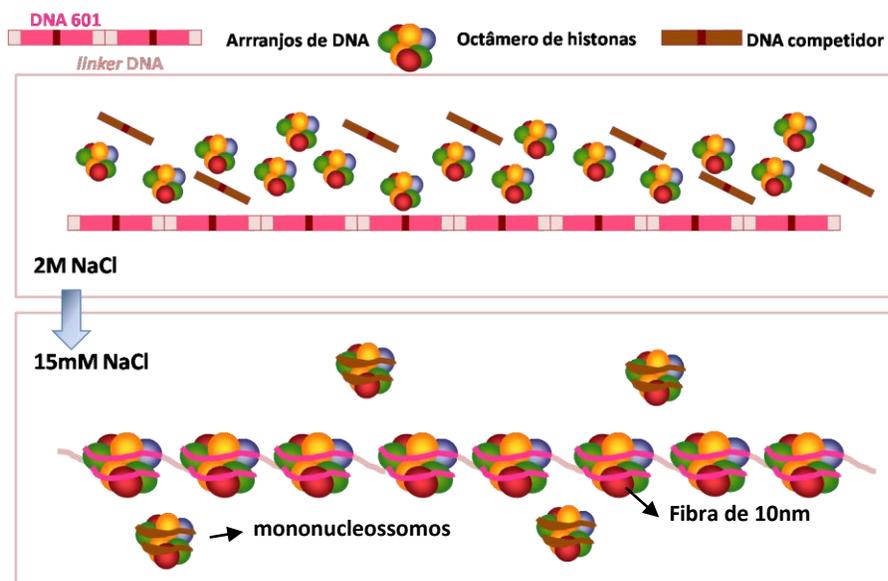


Figura 12. Esquema ilustrativo da formação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída *in vitro*. Após a diálise (~15mM de NaCl) são formadas as fibras de 10nm e os mononucleossomos.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel nativo de agarose 0,8%. A corrida eletroforética deve ser realizada de 15-20 mA e máximo de 100v para que não ocorra o aquecimento do gel e as fibras de cromatina não se desfaçam. Além disso, o gel deve ser corado por 30 minutos com solução contendo brometo de etídio, devido à facilitação da ligação do brometo ao DNA que esta mais inacessível. Foram carregados 10 µL de cada reconstituição com 2µL de tampão de amostra (20% glicerol, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1% *bromophenol blue*). Para as amostras reconstituídas com colesterol foi também realizada uma incubação posterior à diálise e anterior a corrida do gel, por 30 minutos a 4°C, para garantir a presença do composto após a extensa diálise realizada para formação das fibras de cromatina.

- **Fibra de cromatina de 30nm**

Para formação da fibra de 30nm, adicionamos a H5 à fibra de 10nm. Assim, após a determinação do ponto ideal para a formação da fibra de 10nm, faz-se necessário a titulação de H5, utilizando uma quantidade de HO fixa para todas as reações individuais (Tabela 3).

Tabela 3. Exemplo de titulação de H5..

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

A metodologia para reconstituição da fibra de 30nm é a mesma utilizada para formação da fibra de 10nm, que se baseia na diálise lenta de sal. Contudo, para a fibra de 30nm, após a primeira diálise (12-20h) os tubos foram transferidos para um segundo recipiente com 2L de tampão contendo 10mM TEA-HCl pH 7.4 e 1mM MgCl₂, promovendo mais uma diálise de 12-20hs, também sob lenta agitação (sem o saco de diálise). Esse tampão é necessário, pois além da *linker* histona, são necessários cátions mono ou divalentes para a formação da fibra compactada (Figura 13).

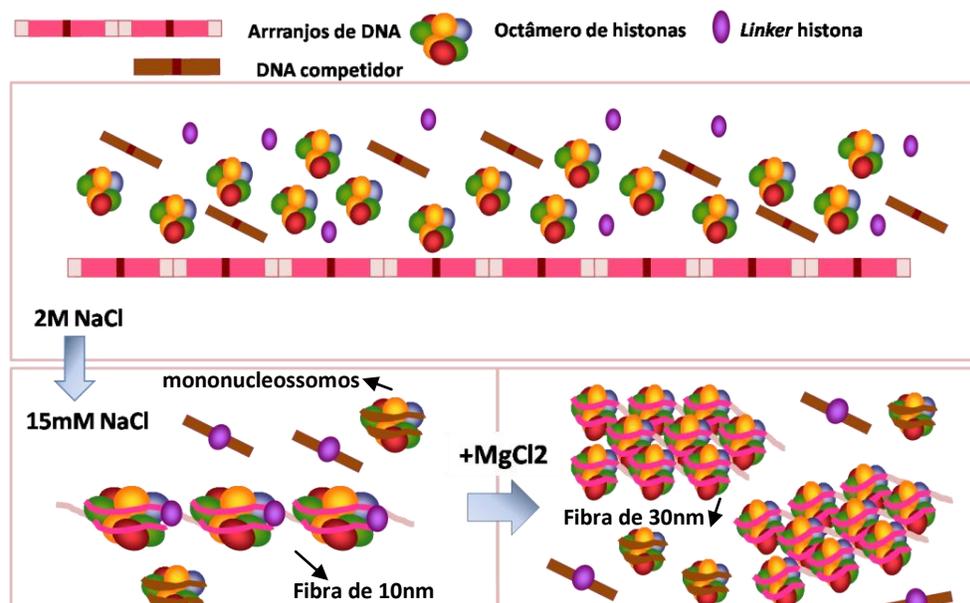


Figura 13. Esquema ilustrativo da formação da fibra de 30nm. Necessidade de uma segunda diálise com tampão contendo $MgCl_2$ para compactação das fibras.

A eletroforese foi realizada nos mesmos padrões descritos anteriormente, inclusive com a etapa de incubação feita para as amostras reconstituídas com colesterol. Contudo, antes de carregar as amostras no gel é necessário fazer uma fixação de *cross-link* com glutaraldeído, reforçando a ligação da H5 à cromatina resistindo a migração eletroforética. As amostras foram incubadas vinte minutos no gelo com 0,1% de concentração final de glutaraldeído e o processo foi interrompido quando se adiciona o *loading buffer* contendo Tris-HCl (20% glicerol, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1% *bromophenol blue*) para corrida no gel, pois o Tris contido no tampão para a reação.

f) *Desnaturação térmica*

O ensaio de desnaturação térmica foi realizado no termociclador (BioRad – Thermal Cycler T100), da seguinte forma:

1. A amostra inicial foi dividida em dois tubos de centrífuga. Um deles foi incubado por 30 minutos no gelo com colesterol (concentração final de $116\mu M$) e o outro com o mesmo volume de água, para controle.

2. Uma alíquota de cada amostra foi retirada e guardada para controle e o restante colocado no termociclador.
3. A cada cinco minutos a temperatura do termociclador foi aumentada 10°C e uma alíquota foi retirada no final dos cinco minutos.

O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, (TBE 0,2X/ 15-20mA/ máximo de 100V) e posteriormente corado com solução contendo brometo de etídio.

g) Ultracentrifugação analítica (AUC)

A ultracentrifugação analítica foi realizada usando a Beckman Coulter Optima XLA. O comprimento de onda de 260nm foi monitorado para as análises devido à alta absorbância do DNA no mesmo. As amostras e o tampão (branco - 15mM TEA-HCl pH 7.4, 1mM EDTA) ficaram uma hora na centrífuga a 4° C, antes de iniciar a ultracentrifugação, para a adequada reprodutibilidade dos dados (ROUTH, 2009). A velocidade utilizada foi de 15.000rpm em celas de 12mm no rotor An50T. Foram coletados 200 scans e para as análises dos dados foi utilizado o programa SEDFIT (versão 14.1c).

h) Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O DLS é uma técnica utilizada para medir o tamanho de moléculas pequenas em solução. O princípio deste ensaio é que as pequenas partículas em solução se movem aleatoriamente, sendo que as partículas maiores se movimentam mais lentamente. Sendo assim, nesta técnica, quando uma fonte de luz como laser é incidida sobre as partículas em movimento ocorre um espalhamento de luz, sendo possível medir as flutuações da intensidade deste espalhamento em função do tempo (“Dynamic Light Scattering”. Disponível em: <http://chemwiki.ucdavis.edu>

[/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Microscopy/Dynamic_Light_Scattering](#))

O DLS utilizado foi o DynaPro (*Protein Solutions*), usando o programa Dynamics (versão 6.12.0.3), com acumulação de 50 *scans*, de 30 segundos cada e poder de laser de 90%. O experimento foi realizado da seguinte forma:

1. A amostra inicial foi dividida em dois tubos de centrífuga. Um deles foi incubado com água (controle), centrifugado a 4°C e 10.000rpm, e realizada a primeira leitura. Para avaliar a estabilidade das fibras, após essa medida foram acrescentadas concentrações crescentes de sal (0,1 e 0,2M de NaCl) e feitas novas aquisições.
2. O mesmo procedimento foi feito para a segunda metade da amostra, que foi incubada com colesterol (concentração final de 11,6µM) por 30 minutos no gelo, antes de iniciar a leitura.

i) Microscopia eletrônica de transmissão

Para visualização das fibras por microscopia eletrônica, procedeu-se o preparo da amostra pela técnica de contraste negativo (*negative staining*) com acetato de uranila 1,5-2%, da seguinte forma: uma gota de oito µL de amostra permaneceu por três minutos em contato com a grade de carbono e o excesso foi removido com papel de filtro. Foi então adicionado acetato de uranila em três etapas de 30 segundos cada, removendo-se o excesso com papel de filtro após cada etapa.

Inicialmente, as grades de carbono foram submetidas a uma descarga elétrica de alta voltagem utilizando o sistema easiGlow (PELCO), para que sua superfície se tornasse hidrofílica, permitindo um melhor espalhamento da amostra. Para as fibras de 30nm foi feita a fixação com glutaraldeído, descrita anteriormente, antes de aplicar o acetato de uranila. A visualização foi feita no microscópio eletrônico de transmissão JEM 3010 no LNNano do CNPEM- Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em Campinas.

6. Resultados

6.1) Arranjos de DNA digeridos e purificados

A digestão dos arranjos 177.36 e 197.25 foram realizadas de forma satisfatória, conforme mostra figura 14.

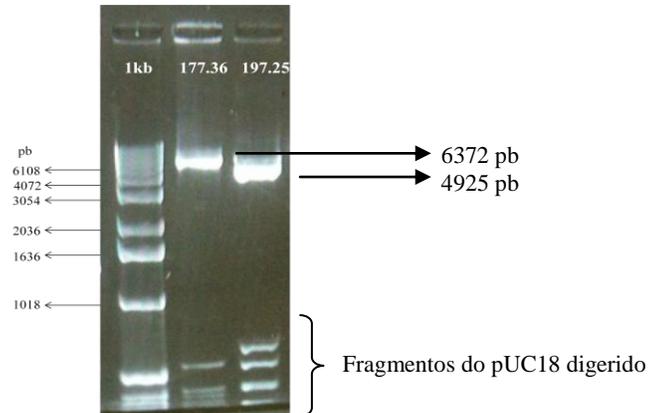


Figura 14. Digestão dos plasmídeos. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Após a digestão realizou-se a purificação dos fragmentos dos arranjos 177.36 (dados não mostrados) e 197.25 (Figura 15) por precipitação com PEG 6000 conforme descrito no “Material e Métodos”.

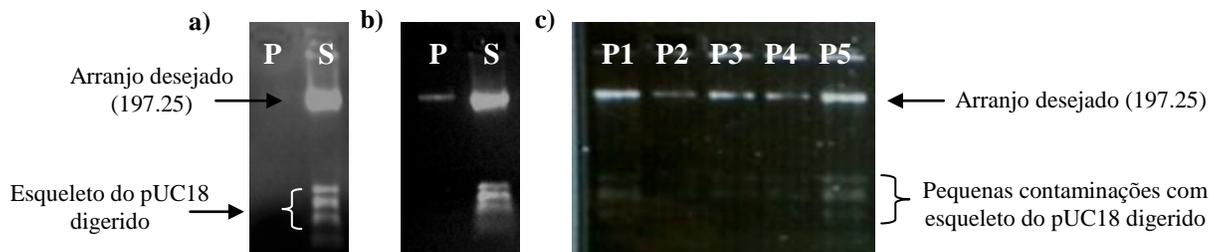


Figura 15. Purificação com PEG 6000. Arranjo: 197.25. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

a) 1ª rodada (5% de PEG) – todo o conteúdo encontra-se no sobrenadante. b) 7ª rodada (+ 0,5% de PEG) – observa-se a banda desejada no pellet. c) Pellets com o DNA de interesse. Legenda: P- pellet; S- sobrenadante; P1-5- pellets já com 197.25 precipitado.

6.2) DNA competidor amplificado

O DNA competidor foi amplificado por PCR (Figura 16) para uso na reconstituição de cromatina *in vitro*, no qual previne a supersaturação das fibras de cromatina reconstituídas por estar disponível para formar mononucleossomos.

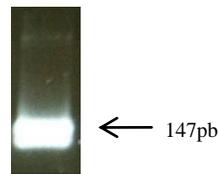


Figura 16. DNA competidor. Gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

6.3) Formação das fibras de cromatina de 10 e 30nm reconstituídas *in vitro*

A metodologia de reconstituição de fibras longas de cromatina de 10 e 30nm *in vitro* foram estabelecidas de forma satisfatória pelo grupo do Prof. Guilherme Santos.

- **Fibra de cromatina de 10nm**

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel nativo de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Podemos observar na figura 17, onde se titulou o HO sobre o arranjo de DNA, o retardo da migração das bandas devido à formação da cromatina. O ponto de saturação de HO é determinado pela observação da formação de um platô, onde, se bem titulado, observamos uma estabilidade, mesmo com o aumento da concentração de HO. Para diferenciar os pontos que estão no mesmo platô contendo excesso de HO, observamos ainda a diminuição da intensidade da banda do crDNA e posterior formação no mononucleossomo (poço 6 – figura 17), pois, conforme mencionado, o excesso de histonas começa a ligar-se ao DNA competidor. Quando todo o DNA competidor é consumido o octâmero de histonas começa a ligar-se de forma inespecífica a qualquer DNA disponível, formando agregados que precipitam a fibra e não aparecem mais no gel de agarose. Assim, por exemplo, neste gel demonstrado na figura 17 observamos que a fibra com maior potencial de ter quantidades estequiométricas de DNA 601 e HO é a do ponto numero cinco.

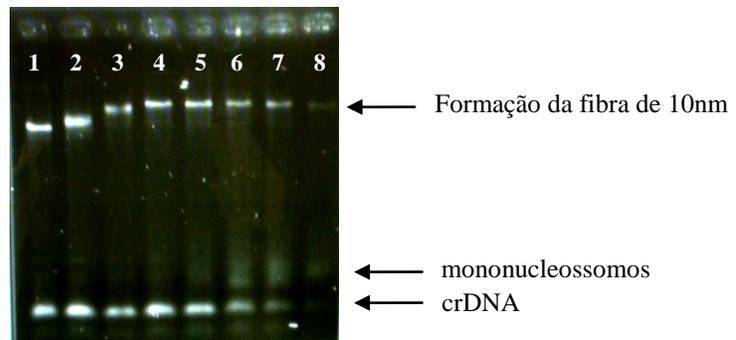
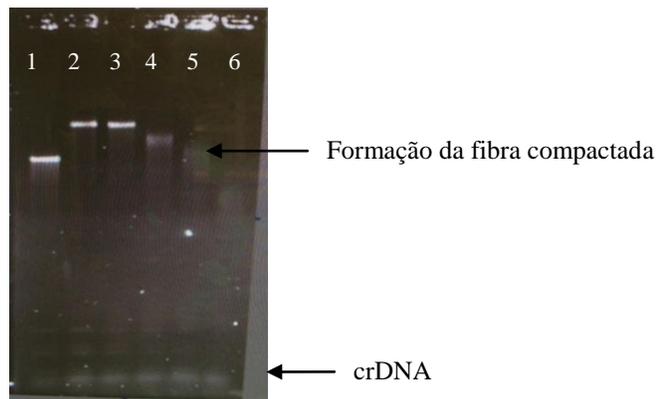


Figura 17. Titulação de octâmero de histonas. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Arranjo: 197.25. Observamos no gel o retardo na migração das bandas devido ao aumento de massa e formação da fibra de cromatina de 10nm. As bandas atingem um platô a partir do poço 4. O ponto de saturação (poço 5) é determinado pela diminuição da intensidade da banda do crDNA e formação de mononucleossomos (poço 6).

- ***Fibra de cromatina de 30nm***

A visualização da fibra de 30nm por mudança de migração eletroforética também foi observada. Contudo, ao contrário da fibra de 10nm, a fibra de 30nm migra mais rapidamente, pois embora haja um aumento de massa com adição da H5, a fibra possui uma conformação mais compactada e atravessa mais rápido a malha do gel (Figura 18). Neste gel, observamos que a fibra de cromatina com maior potencial para ser a de 30nm está no ponto cinco.



6.4) Colesterol antecipa o ponto de saturação da fibra de cromatina de 10nm reconstituída in vitro

Para analisar o efeito do colesterol sobre a fibra de cromatina, realizamos reconstituições de fibras de cromatina de 10nm com diferentes arranjos (197.15, 197.25 e 177.36), sem e com diferentes concentrações de colesterol.

Primeiramente, determinamos a concentração mínima de colesterol necessária para observar algum efeito sobre a fibra de cromatina reconstituída *in vitro*. Assim, realizamos uma curva dose-resposta, com concentrações crescentes de colesterol no tampão de reação da reconstituição (Figura 19).

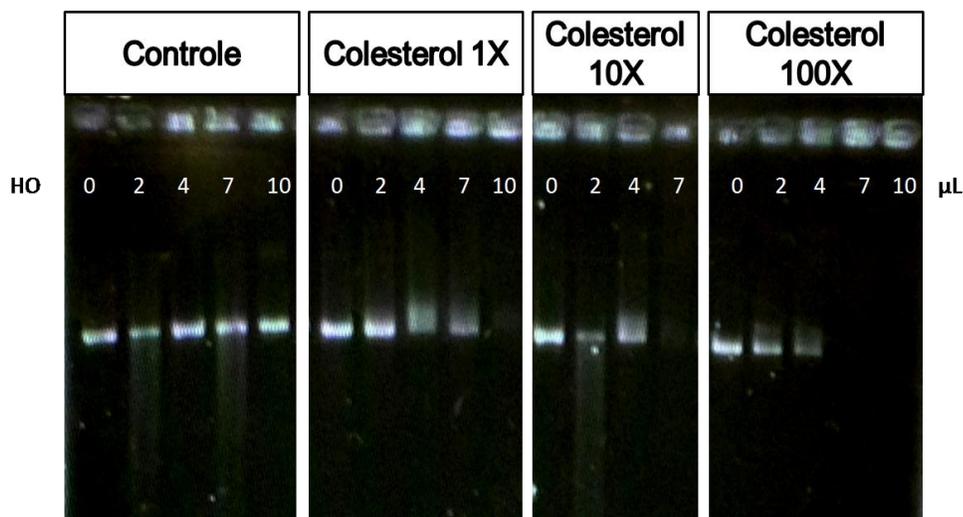


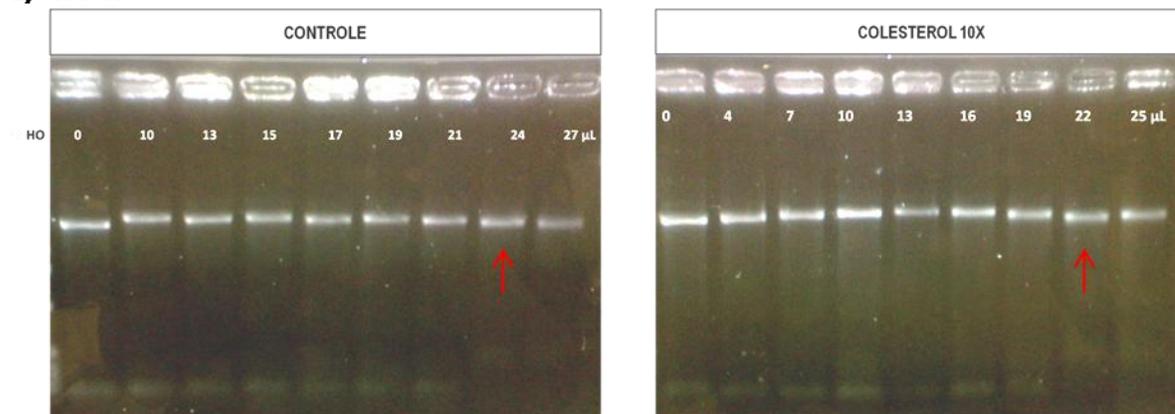
Figura 19. Curva dose-resposta colesterol. Arranjo: 197.25. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Observa-se: i) efeito do colesterol com concentração mínima (1X) devido ao “arrastamento” da banda correspondente a 7μL.; ii) efeito mais pronunciado do colesterol com concentração de 10X devido ao desaparecimento da banda de 7μL.

Em todas as concentrações utilizadas (1X, 10X e 100X), observamos que o colesterol causou uma antecipação do ponto de saturação da fibra pelo HO, ou seja, precisou-se de uma concentração menor de HO para se formar a fibra de 10nm.

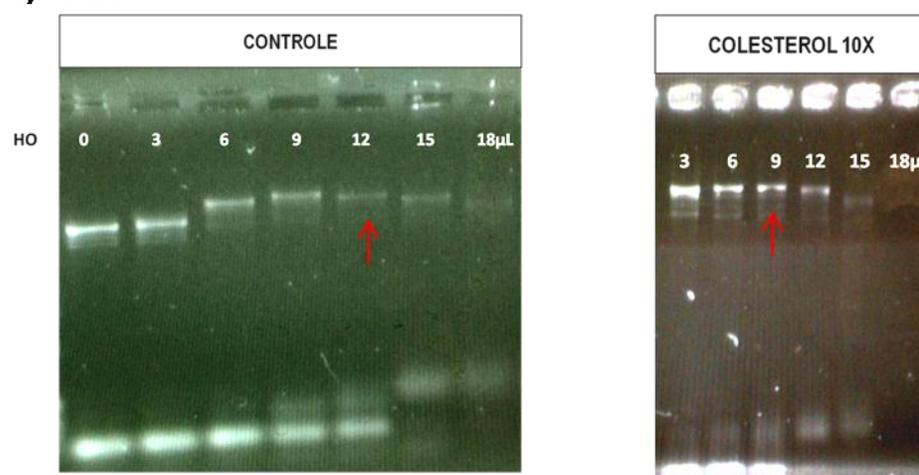
Na concentração de 1X (Figura 19), a banda do ponto com 10μL de HO desaparece, indicando uma precipitação da fibra reconstituída devido ao excesso de HO. No entanto, decidimos usar a concentração intermediária (10X) que corresponde a 116μM, pois possui um efeito mais pronunciado, caracterizado pelo desaparecimento da banda correspondente a 7μL de HO.

Assim, observou-se que foi possível formar a fibra de 10nm de cromatina na presença de baixas concentrações de colesterol. Além disto, notamos que o colesterol diminuiu o ponto de saturação em relação ao controle. Na figura20 podemos observar esse efeito nas reconstituições feitas com todos os arranjos na ausência e presença do colesterol.

a) 197.15



b) 197.25



c) 177.36

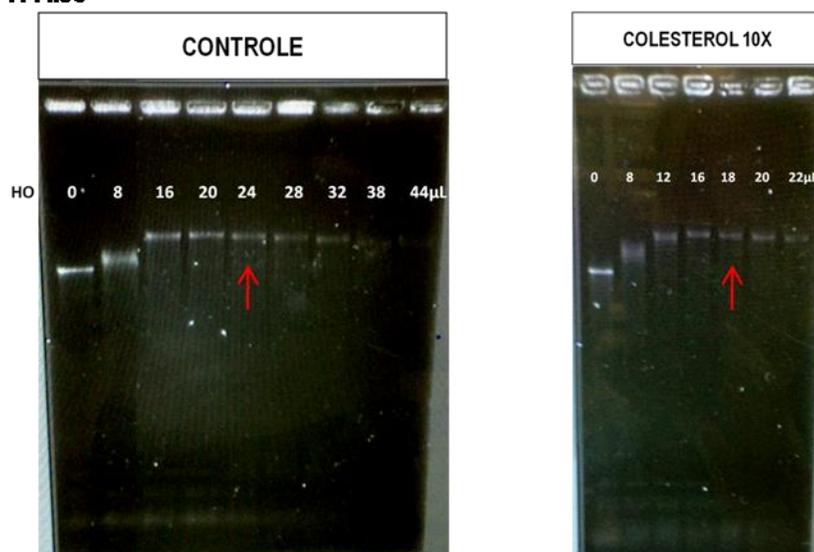


Figura 20. Antecipação do ponto de saturação na formação da fibra de 10nm de cromatina produzida pelo colesterol. As setas indicam o ponto de saturação. a) Arranjo: 197.15. Ponto de saturação controle: 24μL; colesterol: 22μL; b) Arranjo: 197.25. Ponto de saturação controle: 15μL; colesterol: 12μL; c) Arranjo: 177.36. Ponto de saturação controle: 24μL; colesterol: 18μL. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

6.5) Colesterol desestabiliza a fibra de 10nm

a) Colesterol promove uma termo instabilidade da fibra de 10nm

Após observarmos que o colesterol não afetou a formação da fibra de 10nm, resolvemos avaliar o efeito do colesterol sobre a estabilidade das fibras reconstituídas *in vitro*. Para isto, submetemos esta fibra a um estresse térmico gradual, como descrito no material e métodos.

Observamos que a cromatina, em presença de colesterol, é menos resistente ao aumento gradual de temperatura, ou seja, ela perde sua conformação e integridade em temperaturas mais baixas do que as fibras sem colesterol. Com o aumento da temperatura, as bandas tendem a migrar mais no gel, o que indica que as fibras de cromatina estão perdendo os nucleossomos, até observar-se somente o DNA nu, ponto em que todas as interações entre o HO e DNA foram desfeitas.

Na figura 21 podemos observar, com o arranjo 177.36, que a amostra incubada com colesterol a 70° C apresenta desestabilização em relação ao controle (banda mais baixa). A 80° C, notamos que em presença de colesterol, a banda observada no gel está na altura do DNA nu, sugerindo a inexistência da fibra de cromatina, enquanto no controle temos uma mistura de espécies de fibras, caracterizada pelo “arraste” da banda. Esse efeito foi observado para todos os arranjos em temperaturas variando de 37 a 90° C (dados não mostrados).

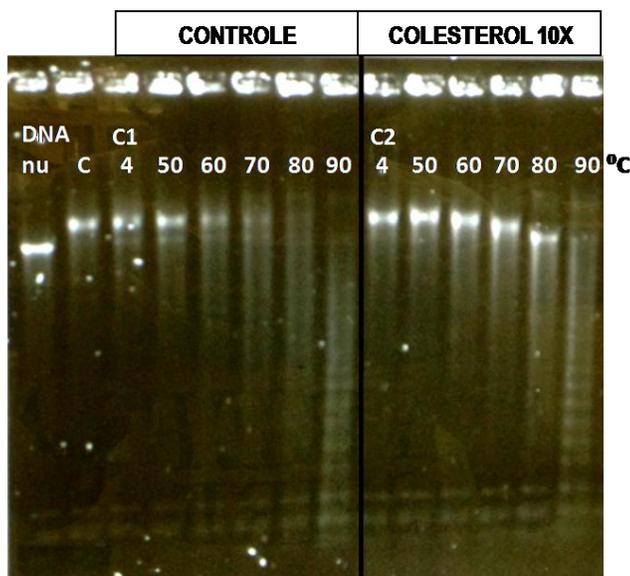


Figura 21. Desnaturação térmica de fibra de 10nm do arranjo 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. C: controle geral; C1: controle incubado com água; C2: controle incubado com colesterol. Nota-se que a amostra incubada com colesterol a 70° C apresenta desestabilização em relação ao controle (banda mais baixa). A 80° C, em presença do colesterol, a banda observada no gel está na altura do DNA nu, enquanto no controle temos uma mistura de espécies de fibras, caracterizada pelo “arraste” da banda

b) Fibras de 10nm reconstituídas com colesterol apresentam menor estabilidade ao longo do tempo

Avaliamos também a estabilidade das fibras de cromatina de 10nm com o passar do tempo. Para isto comparamos a migração eletroforética das fibras logo após a reconstituição ter sido realizada e após 30 dias (controle e com colesterol – mantidas a 4°C). Observou-se no gel (Figura 22) que após 30 dias as bandas da reconstituição controle apresentam-se praticamente da mesma forma, enquanto as fibras com colesterol não são visualizadas. Isso sugere que o efeito do colesterol sobre a estabilidade da fibra é tempo-dependente.

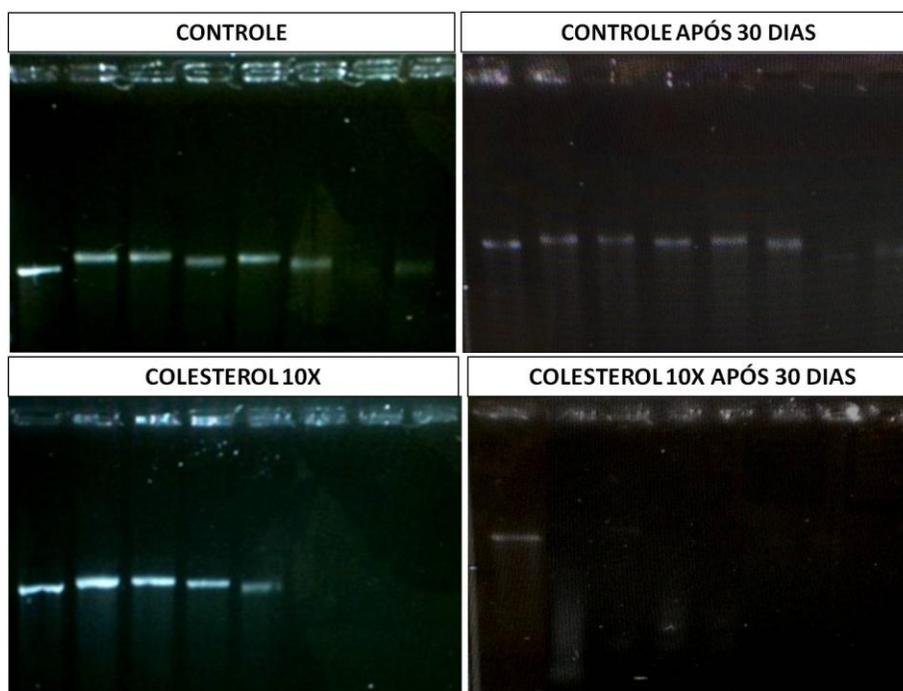


Figura 22. Comparação das reconstituições controle e na presença do colesterol ao longo do tempo. Arranjo: 197.15. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Observa-se que após 30 dias as bandas da reconstituição controle apresentam-se praticamente da mesma forma, enquanto as fibras com colesterol não são visualizadas

6.6) Colesterol não afeta a compactação das fibras de cromatina de 10nm

- Fibra de 10nm

Para avaliar o efeito do colesterol sobre a compactação da fibra de cromatina realizamos a ultracentrifugação analítica (AUC) de fibras de cromatina reconstituídas *in vitro*, na presença de colesterol no tampão de reação.

Os valores do coeficiente de sedimentação (C_s) esperados foram calculados proporcionalmente aos dados publicados por Routh e colaboradores, em 2008 (ROUTH; SANDIN; RHODES, 2008). Os valores de sedimentação esperados para as fibras formadas de 10nm e 30nm com o arranjo 197.25 são respectivamente 30S e 60S aproximadamente; e para o arranjo 177.36, 40S e 80S aproximadamente.

Nos experimentos realizados com a fibra de 10nm com o arranjo 197.25 foram utilizadas quatro amostras reconstituídas separadamente, sendo duas controle e duas com colesterol. Obtivemos os coeficientes esperados, tanto na presença ($C_s \cong 28,7S$; $25,4S$) quanto na ausência de colesterol ($C_s \cong 36,7S$; $29,0S$) (Figura 23a). Estes dados reforçam os resultados bioquímicos anteriores, os quais sugerem que o colesterol não afeta a formação e compactação da fibra de 10nm.

Para as fibras com o arranjo 177.36, analisamos quatro amostras reconstituídas separadamente. O coeficiente de sedimentação esperado foi encontrado apenas em uma das amostras, sendo esta com colesterol ($C_s \cong 43,7S$) (Figura 23b). Acreditamos que as fibras com um C_s baixo ($C_s \cong 33,7S$; $32,9S$) podem ter adotado conformações diferentes ou não estão totalmente saturadas, com um número menor de nucleossomos. Já nas fibras com um C_s de $\sim 52,6S$, acreditamos que possam ser de oligômeros de longas fibras.

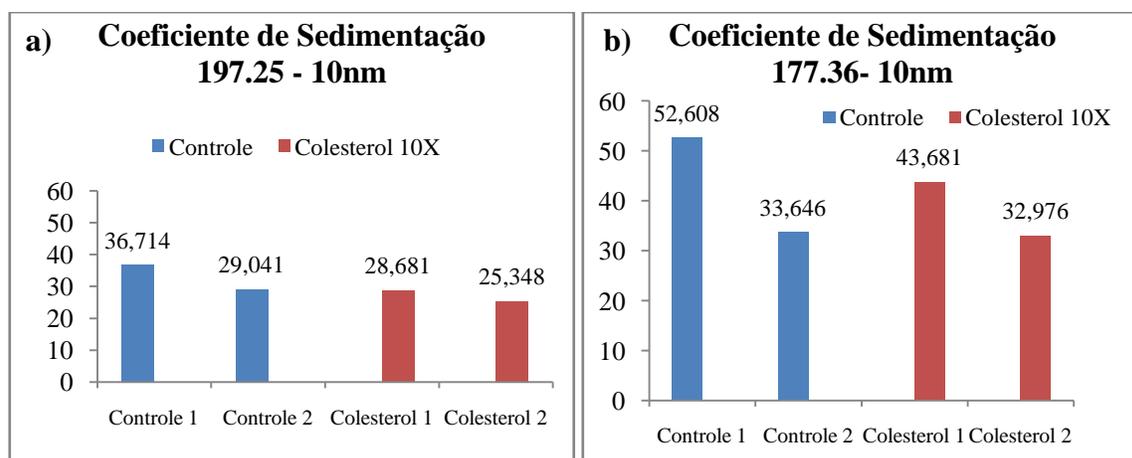


Figura 23. Coeficientes de sedimentação das fibras de 10nm. a) Coeficientes de Sedimentação obtidos para o arranjo 197.25. Obtivemos os coeficientes esperados ($\sim 30S$), tanto na presença quanto na ausência de colesterol; b) Coeficientes de Sedimentação obtidos para o arranjo 177.36. O coeficiente de sedimentação esperado ($\sim 40S$) foi encontrado apenas em uma das amostras, sendo esta com colesterol

- Fibra de 30nm

Analisando os coeficientes da fibra reconstituída em presença de *linker* histona e Mg^{2+} , com o arranjo 197.25 (oito reconstituições – quatro controle e quatro com colesterol), obtivemos uma amostra controle dentro do valor esperado ($C_S \cong 62,3S$), e o restante com valores próximos aos esperados para a fibra de 10nm ($C_S \cong 26-36S$), sugerindo que a fibra de 30nm não estava formada em todas as amostras, apesar de o gel de agarose ter demonstrado o contrário (Figura 25). O resultado com o controle dentro do esperado, com um valor C_S de 62,3S, e todas as fibras em presença de colesterol com C_S de aproximadamente 32,0S (Figura 24a), sugere que o colesterol possa interferir na estabilidade da fibra compactada.

Para o arranjo 177.36 encontramos valores próximos ao esperado para fibra de 10nm ($C_S \cong 41-46S$), tanto no controle quanto em presença de colesterol (Figura 24b), indicando que a fibra de 30nm não foi formada nessas amostras. Estes resultados eram esperados, já que pela análise das bandas no gel de agarose podemos observar que a mudança de migração eletroforética havia sido muito discreta (Figura 26).

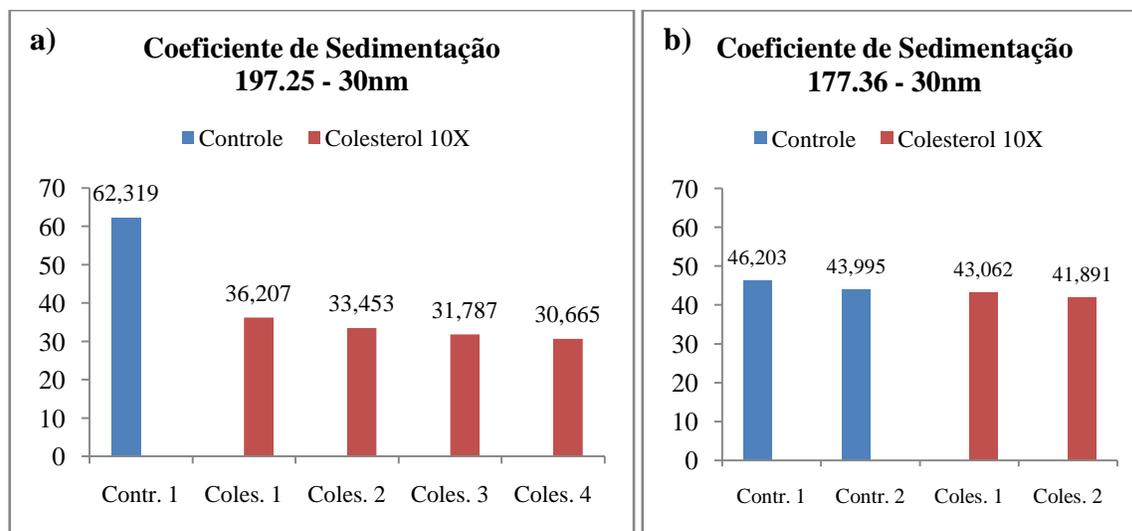


Figura 24. Coeficientes de Sedimentação das fibras de 30nm.

a) Coeficientes de Sedimentação do arranjo: 197.25. Observou-se uma amostra controle dentro do valor esperado ($C_S \cong 62,3S$), e o restante com valores próximos aos esperados para a fibra de 10nm ; b) Coeficientes de Sedimentação do arranjo: 177.36. Observaram-se em todas as amostras valores próximos ao esperado para fibra de 10nm.

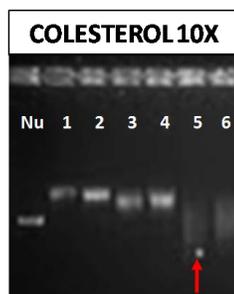


Figura 25. Gel da reconstituição de cromatina do arranjo 197.25. Poços 1-6: titulação de H5. A seta vermelha indica a amostra que foi utilizada para AUC (Coles. 4 - S= 30,665 – figura 23a). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

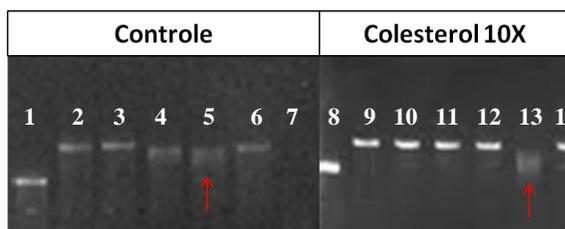


Figura 26. Reconstituições da fibra de 30nm utilizadas na AUC para o arranjo 177.36. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As setas vermelhas indicam as amostras que foram para AUC. Poços 1 e 8: DNA nu; poços 2-7: titulação H5 reconstituição controle; poços 9-14: titulação H5 reconstituição com colesterol.

6.7) *Colesterol promove o aumento do raio hidrodinâmico das fibras de cromatina de 10nm*

Para traçar o perfil de distribuição das partículas por tamanho, realizamos ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com fibras de cromatina de 10nm. Para isso, utilizamos as fibras de cromatina reconstituídas com o arranjo 177.36, incubadas posteriormente com colesterol, na ausência e presença de NaCl em diferentes concentrações (0,1; 0,2M NaCl).

Inicialmente, para padronizar a técnica, foi medido o espalhamento de luz com amostras incubadas com diferentes concentrações de colesterol, 1, 5 e 10X. A figura 27 mostra as curvas de correlação nas três concentrações.

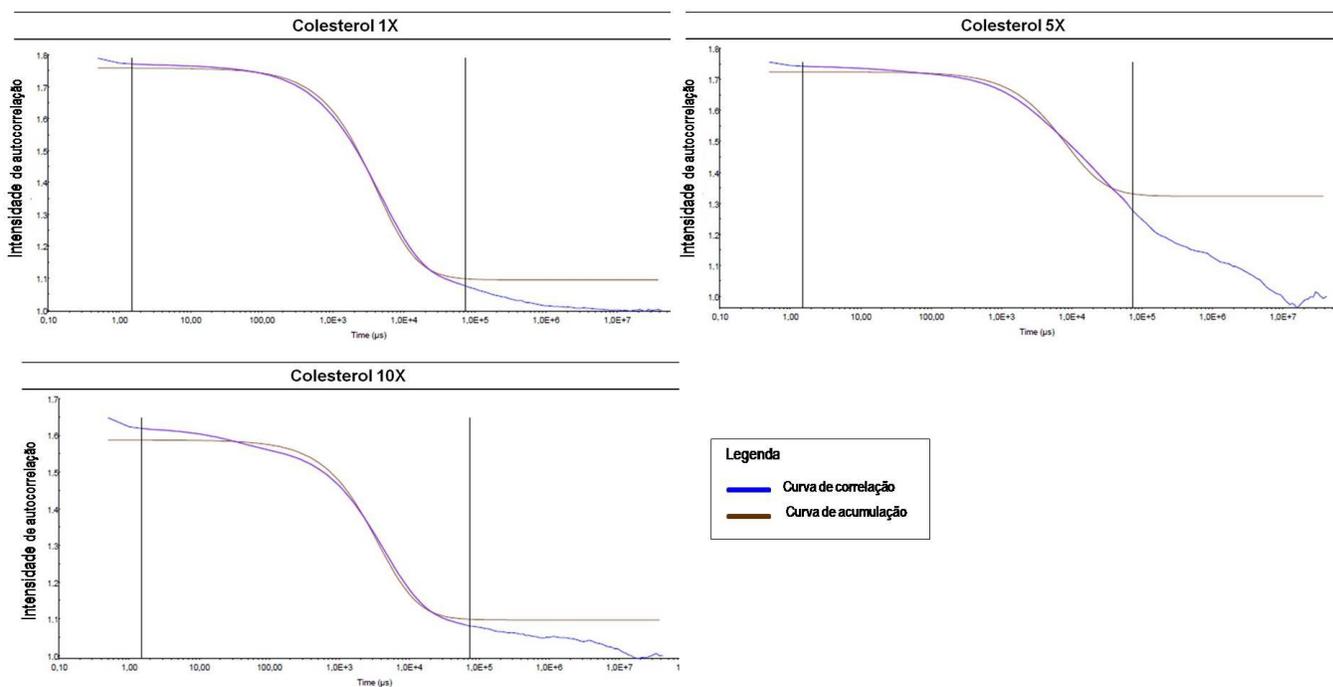


Figura 27. Curvas de correlação obtidas no DLS para incubação com diferentes concentrações de colesterol da mesma amostra, demonstrando que a curva de colesterol 5X não apresentou comportamento sigmóide apropriado e somente a curva de colesterol 1X parece demonstrar apenas uma espécie proeminente.

A curva de correlação baseia-se na intensidade e no tempo das flutuações do espalhamento da luz. Em tempos mais curtos, a variação da intensidade de espalhamento possui um valor máximo. Com o passar do tempo, a variação da intensidade de espalhamento terá cada vez menos correlação com a variação de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades tende a zero. Sendo assim, a curva tende a um decaimento exponencial, já que as flutuações que chegam ao detector em tempos maiores se tornam imperceptíveis. É útil lembrar que as partículas menores movem-se mais rapidamente do que as de maiores dimensão. Portanto, a intensidade de sinal para partículas menores deve flutuar mais rapidamente e, como resultado, a correlação diminui a uma taxa mais rápida. Sendo assim, se tivermos uma mistura de espécies veremos uma curva com uma mistura de funções (“Dynamic Light Scattering”. Disponível em: [http://chemwiki.ucdavis.edu /Analytical_Chemistry/ Instrumental_Analysis/ Microscopy/ Dynamic_Light_Scattering](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Microscopy/Dynamic_Light_Scattering)).

Como resultado da padronização, observa-se na figura 27 que somente a curva com colesterol 1X apresentou um comportamento de decaimento sigmóide apropriado, sugerindo não haver mais de uma espécie proeminente na amostra. Dessa forma, essa concentração (1X) foi

escolhida para realização dos ensaios de DLS com as fibras de cromatina em presença de colesterol.

Assim, para analisar a distribuição das partículas por tamanho, realizaram-se novas reconstituições da fibra de cromatina de 10nm com o arranjo 177.36. Para esta fibra, o raio estimado, considerando a fibra totalmente aberta e esticada, seria de aproximadamente 360nm. Esta estimativa baseou-se no tamanho do nucleossomo (10nm) e *linker* DNA que possui cerca de 0,33nm/pb (LEWIN, 1999). No entanto, devemos considerar, que em solução as fibras de cromatina estão em constante movimento, permitindo que ela possa adotar diferentes conformações se dobrando em vários níveis. Consideramos alguns dobramentos hipotéticos que podem acontecer, tal como a existência de fibras apresentando raios de aproximadamente 45, 90, 180 até 360nm (Figura 28). Além destas espécies, podemos encontrar outras com raios menores (em torno de 4 nm), que corresponderiam aos mononucleossomos formados.

Devemos ressaltar que os cálculos dos raios esperados foram feitos de forma direta, sem levar em conta, por exemplo, a solvatação e a viscosidade do meio. Além disso, propusemos raios esperados de acordo com supostos dobramentos que a fibra poderia adotar, mas não podemos limitar somente a esses raios, pois como já foi dito, as fibras em solução estão constantemente em movimento e adotando diversas conformações.

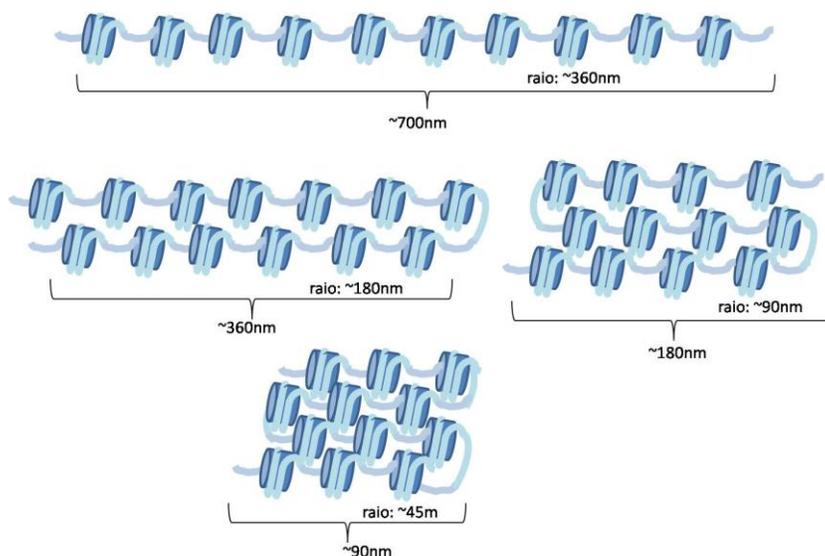


Figura 28. Esquema ilustrativo de dobramento das fibras de cromatina.

Enfim, para a realização do DLS, utilizamos uma única amostra de cromatina reconstituída *in vitro*, dividindo-a em dois grupos, controle e incubado com colesterol. Para melhor visualização dos resultados do DLS, os dados obtidos nas figuras 29 e 30 estão apresentados na forma de gráfico tipo pizza.

Nesta primeira figura, podemos observar que o colesterol promoveu um aumento do número de espécies, passando de uma solução com população quase homogênea (99% com raio hidrodinâmico de 67,5 nm) para uma solução contendo três populações distintas (17% com 33nm, 41% com 146nm e 41% com 364,8nm). Assim, observamos que o colesterol promoveu o aumento do raio hidrodinâmico das fibras de cromatina, de 67,5 nm para 146 e 364,8nm.

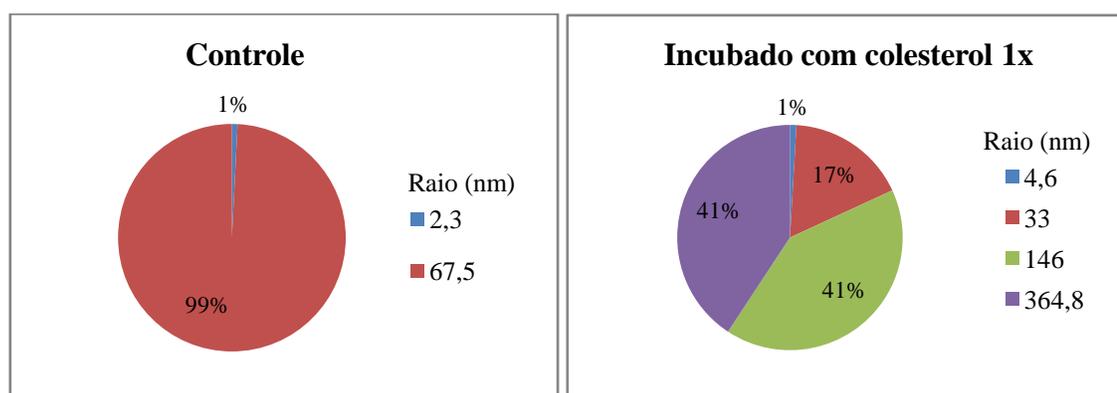


Figura 29. Proporções de populações de fibras obtidas no DLS na presença e ausência de colesterol. Observou-se que colesterol promoveu um aumento do número de espécies, passando de uma solução com população quase homogênea (99% com raio hidrodinâmico de 67,5 nm) para uma solução contendo três populações distintas (17% com 33nm, 41% com 146nm e 41% com 364,8nm).

Para analisar a estabilidade da fibra de cromatina em presença de colesterol, foram adicionadas diferentes concentrações de NaCl à solução. Quando comparamos o efeito do NaCl sobre o controle, observamos que o sal promoveu uma redistribuição dos raios hidrodinâmicos das populações das fibras de cromatina (Figura 30a,b,c). Inicialmente (controle incubado com água), a maioria das espécies (75%) apresentaram raio hidrodinâmicos de 572nm (Figura 30a) e com a adição de NaCl mostraram raios em torno de 50nm (Figura 30b,c). Já com a amostra incubada com colesterol, pode-se observar que o NaCl promoveu uma distribuição mais homogênea das populações, com a maioria delas apresentando raios hidrodinâmicos de ~50nm e 250nm (Figura 30e,f,g). Vale ressaltar que antes da adição de sal, a amostra com colesterol

apresentava espécies, em sua grande maioria de 146 e 364nm (Figura 30e). Assim, estes resultados sugerem que o NaCl, a 0,1 e 0,2M, promove uma neutralização do efeito do colesterol.

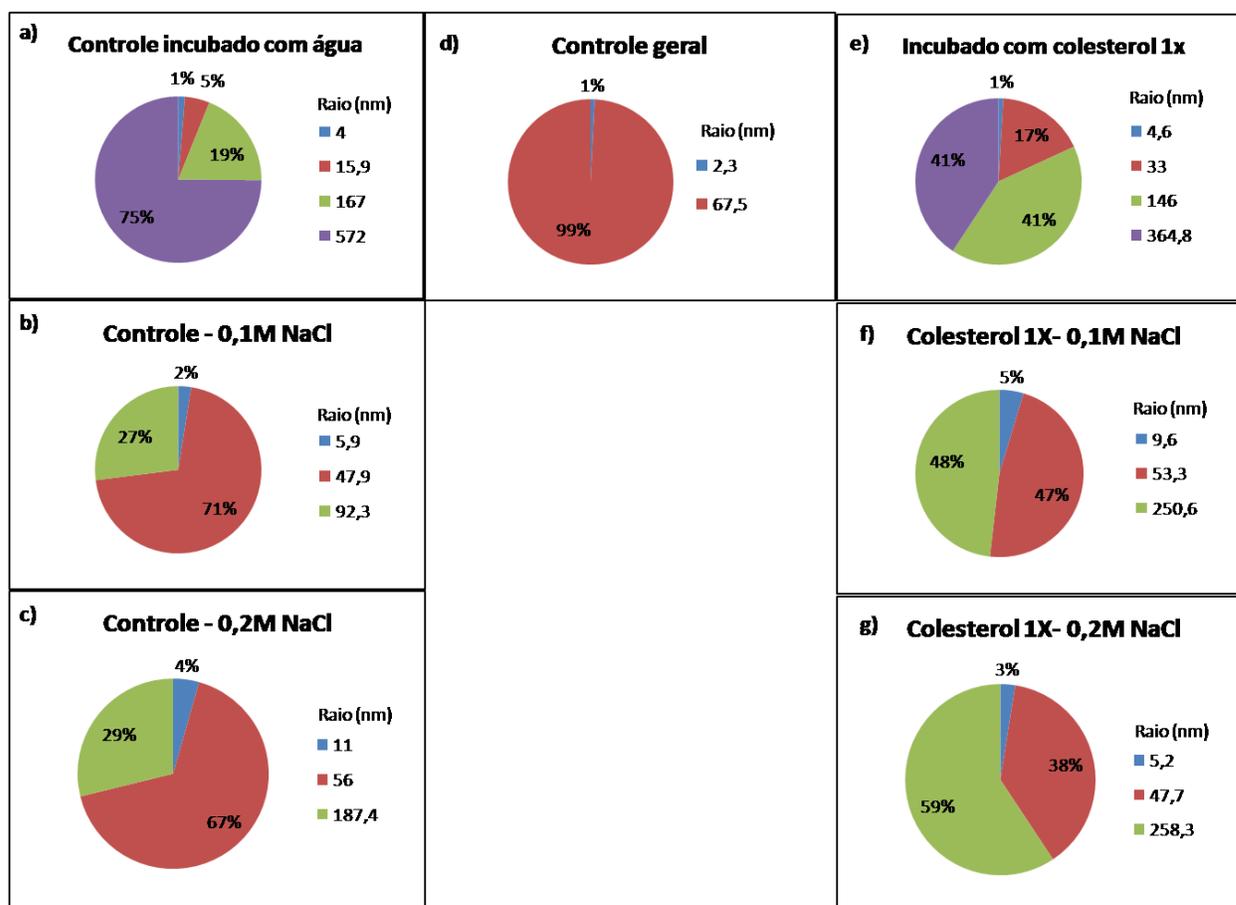


Figura 30. Titulação de NaCl sobre as fibras de 10nm na ausência e presença do colesterol. Observou-se que o sal promoveu uma redistribuição dos raios hidrodinâmicos das populações das fibras de cromatina, passando de uma população de 75% com raio hidrodinâmico de 572nm (a) para raios em torno de 50nm com a adição de NaCl (b) (c).

Na amostra incubada com colesterol, observou-se que o NaCl promoveu uma distribuição mais homogênea das populações, passando de uma amostra com grande maioria da população com raios hidrodinâmicos de 146 e 364nm (e) para raios de ~50nm e 250nm (f) (g).

6.8) Colesterol não impede a formação da fibra de 30nm

Após a análise do efeito do colesterol sobre fibra de cromatina de 10nm, realizamos novas reconstituições *in vitro* para observar a ação do colesterol sobre a fibra de 30nm. Para esta fibra, não se pode comparar o ponto de saturação da fibra controle e fibra com colesterol, pois já partimos de concentrações diferentes para formação da fibra de 10nm. Estas reconstituições foram realizadas com os arranjos 197.15 (dados não mostrados), 197.25 (Figura 31a) e 177.36

(Figura 31b). Na figura 31b, observa-se a rápida migração das bandas, ou seja, formação da fibra compactada, tanto no controle (Figura 31b - poço 4) como na fibra reconstituída com colesterol (Figura 31b – poço 8).

De forma importante, observamos que a formação da fibra de cromatina compactada na presença de *linker* histona não foi afetada pela presença do colesterol. Ou seja, o colesterol não impede a perfeita reconstituição *in vitro* da fibra de cromatina de 30nm.

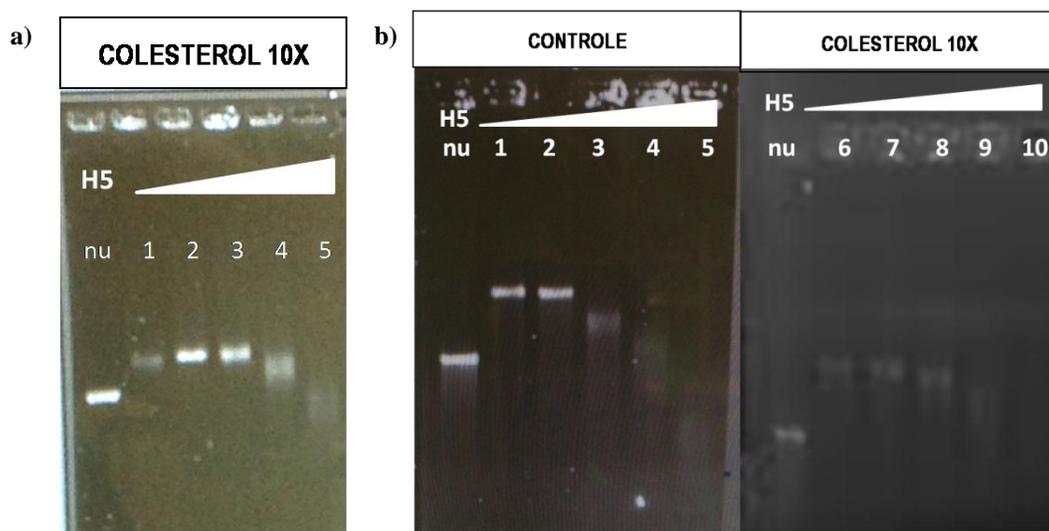


Figura 31. Formação da fibra de cromatina compactada. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O gel mostra que o colesterol não impediu a formação das fibras de 30nm. a) Arranjo: 197.25. Poços 1-5: titulação da H5 na reconstituição com colesterol; b) Arranjo: 177.36. Poços 1-5: titulação da H5 na reconstituição controle; poços 6-10: titulação da H5 na reconstituição com colesterol.

6.9) Análise das fibras de cromatina por microscopia eletrônica de transmissão revela modos distintos de compactação

Para racionalizar as diferenças observadas nos ensaios anteriores, as fibras abertas (10nm) e compactadas (30nm) foram observadas por coloração negativa no microscópio eletrônico de transmissão.

Primeiramente, pode-se observar que as fibras formadas com diferentes arranjos de nucleossomos foram reconstituídas com sucesso (Figura 32). Como esperado, observamos que as fibras de 10nm apresentam-se como um colar de contas (*beads-on-a-string*) em diferentes conformações.

Também como esperado, as fibras de 30nm apresentaram-se mais compactadas que as de 10nm (Figura 32). Entretanto, não observamos a compactação máxima esperada para a fibra de 30nm. Ressaltamos que observamos claramente a diferença na compactação entre as duas fibras, com e sem *linker* histona e Mg^{2+} . Assim, mostramos ter obtido êxito nesta delicada e complexa metodologia de reconstituição de fibras de cromatina *in vitro*.

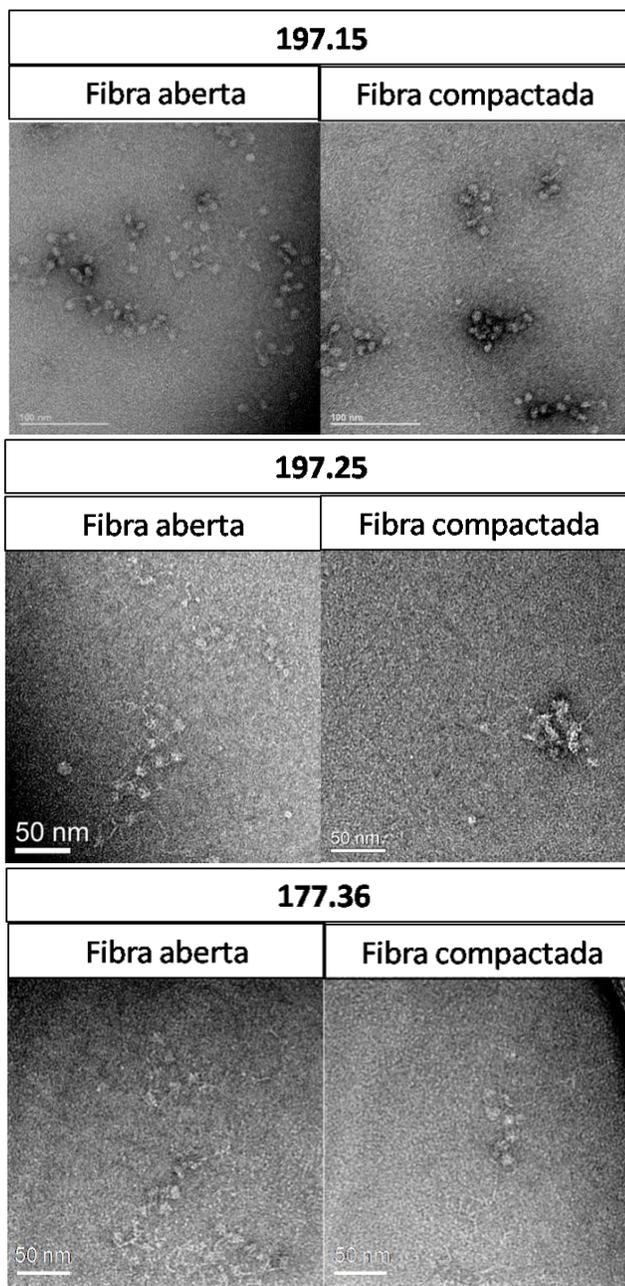


Figura 32. Fibras de cromatina controle aberta e compactada visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Quando em presença de colesterol, não conseguimos visualizar fibras de 10nm. Observamos somente arranjos de DNA e nucleossomos soltos e dispersos no campo (Figura 33). Entretanto, foi possível a visualização da fibra compactada somente com o arranjo 177.36 reconstituída com colesterol (Figura 33), sugerindo que a compactação inibe o efeito destabilizador do colesterol.

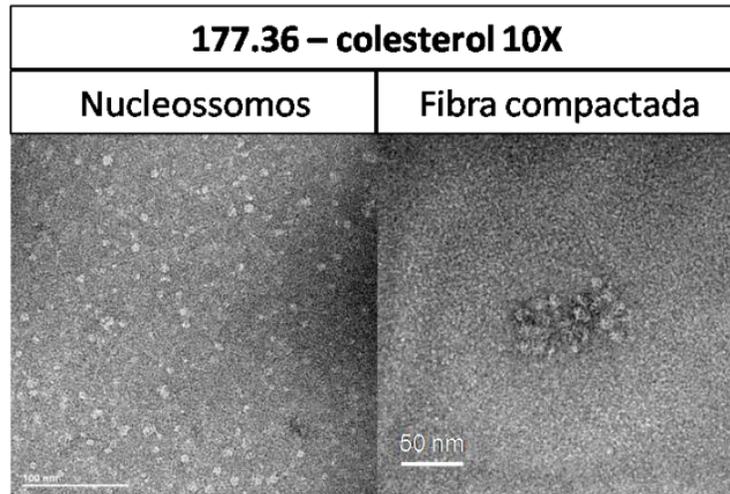


Figura 33. Fibras de cromatina reconstituídas com colesterol 10X visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.

7. Discussão e Perspectivas

Há algumas décadas, o estudo da estrutura da cromatina apresenta destaque no mundo científico. Em 2009, o artigo “*Structures of Desire*”, publicado na revista Nature, trouxe uma relação de estruturas altamente desejadas pelos cristalógrafos (BHATTACHARYA, 2009). Dentre elas, figurava a estrutura da cromatina de alta ordem, sendo até hoje considerado um grande desejo. Mais do que somente a estrutura, a regulação da arquitetura da cromatina, por interferir diretamente em desfechos de importantes processos celulares, é tida atualmente como um dos grandes enigmas que a ciência tenta e, aos poucos, consegue desvendar.

Neste sentido, trabalhamos com o objetivo de realizar estudos estruturais da cromatina, por meio da reconstituição *in vitro* de longas fibras, contendo diferentes arranjos de nucleossomos. Para isso, usamos histonas extraídas de eritrócito de galinha, contendo as modificações pós-traducionais naturais realizadas pela maquinaria enzimática do organismo vivo. Trabalho publicado em 2003 mostrou os sítios de modificações pós-traducionais em histonas de galinha, utilizando espectrometria de massa em histonas de galinha (ZHANG; TANG, 2003). Observaram-se, nesse trabalho, sítios de metilação na H2B, H3 e H4, e sítios de acetilações em todas as histonas, exceto na H2B. Futuramente pretendemos também analisar quais são as modificações pós-traducionais destas histonas através de espectrometria de massa, a fim de relacioná-las com os resultados deste trabalho e responder a perguntas sobre a sinalização hormonal. Para este trabalho, acreditamos que as modificações pós-traducionais do *pool* de histonas utilizadas não interfere em nossos resultados. Aqui, nosso objetivo foi traçar comparações entre fibras de cromatina reconstituídas em presença e ausência de colesterol, no que tange à sua estabilidade e arquitetura.

A reconstituição de cromatina *in vitro* é um método que nos permite realizar o estudo estrutural da mesma de uma forma isolada do contexto celular. Com o posicionamento preciso dos nucleossomo em uma sequência de DNA, podemos formar longas fibras de cromatina, com diferentes tamanhos de *linker* DNA e número de nucleossomos. Além disto, podemos racionalmente modular a compactação das fibras de cromatina alterando a concentração de sais (NaCl e cátions divalentes, como o Mg^{2+}) ou adicionando outra proteína, a *linker* histona, crucial para o dobramento das fibras.

A principal crítica desse sistema fundamenta-se em sua artificialidade, podendo ser enfatizado que a natureza não evoluiu tal sequência de DNA (601) por conter forte posicionamento de nucleossomos. No entanto, deve-se ressaltar que sem um ambiente controlado haveria perdas diante da complexidade dos sistemas naturais. Estes apresentam diversos outros fatores importantes para a formação e compactação das fibras de cromatina, como por exemplo, modificações pós-traducionais. Em um futuro próximo, pretendemos também reconstituir longas fibras de cromatina e mononucleossomos com sequências naturais com conhecido posicionamento de nucleossomos, como a sequência do promotor MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) (FRAGOSO et al., 1995).

Vale ressaltar que o DNA 601 já foi utilizado por diversos pesquisadores na tentativa de elucidar a estrutura de cromatina e NCP, como a estrutura cristalográfica do tetranucleossomo (SCHALCH et al., 2005) e da proteína RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation*) com um nucleossomo (MAKDE et al., 2010).

Assim, a partir de resultados obtidos através deste sistema de reconstituição de cromatina *in vitro*, com o DNA 601 e histonas de galinha, podemos racionalizar os mecanismos atuantes e propor novos modelos para compreensão da dinâmica da cromatina *in vivo*. Neste trabalho, mostramos ser capazes de reconstituir *in vitro* longas fibras de cromatina, com diferentes tamanhos de *linker* DNA e arranjos de nucleossomos. Assim, consideramos ter um excelente modelo artificial para estudar a estrutura da cromatina.

Aqui, estudamos o efeito do colesterol sobre a arquitetura da cromatina e sua ação como remodelador de sua estrutura. Sabemos que, além de estar associado a muitas doenças, o colesterol é uma importante molécula sinalizadora e participa de diversos processos celulares (PUCADYIL; CHATTOPADHYAY, 2006). Portanto, é plausível considerar a possibilidade de o colesterol participar diretamente a modulação da arquitetura da cromatina, apontando um novo mecanismo molecular para ação do colesterol e para a regulação e manutenção do genoma.

Demonstramos nesse trabalho ser possível a reconstituição *in vitro* das fibras de cromatina de 10nm e 30nm em presença de diferentes concentrações de colesterol. Análises bioquímicas mostraram as bem sucedidas reconstituições de longas fibras de cromatina em presença do colesterol. Os resultados de ultracentrifugação analítica (AUC) das longas fibras de

cromatina reforçaram estes resultados bioquímicos que sugerem que o colesterol não afeta a reconstituição da fibra de 10nm.

Além disso, observamos que o colesterol antecipou o ponto de saturação da fibra de cromatina de 10nm em relação ao controle, precisando-se de uma menor concentração de HO para a formação das longas fibras. Sugerimos que isso possa ocorrer por dois motivos: i) o colesterol mantém o DNA em solução em uma forma mais linear, o que facilita a interação de HO para formação das fibras; ii) o colesterol causa menor adesão de HOs às paredes dos tubos e pipetas e assim disponibiliza mais histonas para a reação.

Ainda não está completamente elucidado como esse fenômeno ocorre. Algumas hipóteses são levantadas para explicar tal fenômeno. A primeira hipótese baseia-se que em solução, o colesterol poderia formar micelas com as histonas, evitando a aderência destas proteínas às paredes dos tubos e ponteiros. Em presença do DNA, acreditamos que este feito seja anulado, pois a afinidade de ligação destas proteínas seria maior pelo DNA, especialmente em se tratando da sequência 601 Widom. À medida que a diálise de sal acontece, as cargas que estavam neutralizadas são aos poucos “liberadas” e o colesterol se aproximaria das histonas com sua porção hidrofílica rica em elétrons. No entanto, quando a concentração de sal diminuiu ainda mais, a afinidade das HOs pelo DNA anula esse efeito de “neutralização” exercido pelo colesterol e as proteínas começam a ligar-se ao DNA. Não sabemos de que forma o colesterol se liga às histonas, mas é evidente que essa interação acontece e que depois esse complexo (HO/colesterol) se liga ao DNA. Análises futuras serão necessárias para tentar identificar o modo de ligação do colesterol às histonas e cromatina.

A outra hipótese para explicar a antecipação do ponto de saturação da fibra é baseada no deslocamento do equilíbrio: $\text{histonas} + \text{DNA} \rightarrow \text{histonas:DNA}$. Considerando sua porção hidrofóbica como indutora do comportamento, a presença do colesterol em solução poderia desviar as histonas para interação com o DNA, evitando que permaneçam livres em solução. Porém, acreditamos que o colesterol possa interagir com as fibras de cromatina, e não repeli-las.

Assim, nos parece mais atraente a primeira hipótese, que aponta o colesterol como um agente capaz de cercar as histonas altamente positivas, na tentativa de neutralizar suas cargas com sua porção hidrofílica abundante em elétrons.

Observamos também que o colesterol perturba a estabilidade da fibra de 10nm. Demonstramos neste trabalho que a fibra reconstituída com colesterol foi mais rapidamente desfeita quando comparada à fibra controle, que após um mês se manteve estável. Além dessa evidência temporal, os ensaios de desnaturação térmica corroboram com os resultados da perda de estabilidade da fibra em presença do colesterol. Observamos aqui que a fibra de cromatina de 10nm reconstituída *in vitro* em presença de colesterol diminuiu sua termoestabilidade em relação ao controle (na ausência do colesterol).

Estes resultados bioquímicos estão em concordância com os resultados obtidos pelo DLS, no qual se observou que as fibras reconstituídas e posteriormente, incubadas com colesterol, apresentaram um aumento do número de espécies, com três populações distintas (17% com 33nm, 41% com 146nm e 41% com 364,8nm). Destacamos aqui que o colesterol promoveu o aumento do raio das fibras de cromatina, de 67,5nm para 146 e 364,8nm. As espécies com raio menor sugerem a presença de histonas isoladas, que vieram dos nucleossomos das longas fibras de cromatina. Já a presença de espécies com raio maior sugere que as fibras “desfalcadas” de nucleossomos, possam ter formado agregados, ou ainda que as fibras intactas possam ter se apresentado de maneira mais linear, perdendo a tendência de dobramento sobre si mesmas, o que as tornaria mais vulneráveis ao estresse térmico submetido ao ensaio de desnaturação térmica.

Ainda em ensaios de DLS, observamos que o aumento da concentração de sal na solução com longas fibras de cromatina incubadas com colesterol não possui um grande impacto sobre a conformação das mesmas quando comparado ao controle. Estes ensaios sugerem que o sal possa estar neutralizando o efeito desestabilizador do colesterol. Todavia, devemos analisar estes resultados do DLS com muita cautela. Primeiro porque a amostra submetida é heterogênea, contendo longas fibras de cromatina em diversas conformações, mononucleossomos e DNA competidor. Dessa forma, esperamos observar diversas espécies com variados tamanhos de raios hidrodinâmico. Segundo, porque devemos lembrar também que o cálculo dos raios esperados foi feito de forma direta, baseado somente no tamanho real da fibra de cromatina, sem levar em conta, por exemplo, a solvatação e a viscosidade do meio. Vale ressaltar que, após a reconstituição das fibras *in vitro*, temos basicamente três espécies predominantes em nossas amostras, as fibras, os mononucleossomos e o crDNA. Esta mistura de espécies impõe grandes dificuldades para as análises por DLS e AUC. De fato, realizamos alguns testes preliminares de

purificação, utilizando gradiente de sacarose, no entanto a amostra ficou muito diluída e não foi possível a visualização das frações por corrida eletroforética em gel de agarose. Futuramente, investiremos na purificação das longas fibras.

Devido a todos esses fatores, não conseguimos, nas condições empregadas, alcançar uma reprodutibilidade dos efeitos, pois medidas realizadas com as mesmas amostras apresentaram resultados variados. Vale ressaltar que os resultados aqui apresentados derivam de apenas um experimento. Portanto novos experimentos de DLS devem ser realizados para que possamos indicar mais fortemente uma tendência de comportamento geral das fibras na ausência e presença de colesterol.

Resumindo, o colesterol auxilia a formação das fibras reconstituídas por disponibilizar mais HO à reação. Contudo, o mesmo perturba a estabilidade da fibra de 10nm. Para explicar essa ação desestabilizadora, a principal hipótese levantada é a de que o colesterol possa desfazer a fibra através da alteração estequiométrica da água de uma fibra, afetando, principalmente, a interação do octâmero de histonas com o DNA. Novos ensaios *in vitro* com mononucleossomos estão sendo realizados pelo nosso grupo na tentativa de elucidar este mecanismo.

Através dos resultados obtidos nesse trabalho demonstramos que as fibras reconstituídas com colesterol são menos estáveis, o que poderia facilitar a abertura da cromatina e alteração da expressão gênica. Isso pode estar em consonância com o trabalho publicado em 2002, que mostrou um aumento do colesterol associado à cromatina na fase de proliferação celular, sugerindo ser uma molécula que pode alterar os níveis transcricionais (ALBI; MAGNI, 2002).

Sobre a compactação das fibras de cromatina, observamos através, da migração no gel de agarose, que o colesterol não afetou a formação da fibra de 30nm. Por meio das imagens obtidas por microscopia eletrônica, apesar de não termos visualizado a fibra de 30nm propriamente dita, foi possível observar maior compactação mesmo com a reconstituição na presença do colesterol, reafirmando o resultado anterior. Os coeficientes de sedimentação obtidos pelo ensaio da ultracentrifugação analítica também sugerem que o colesterol possa afetar a estabilidade das fibras compactadas. Como o colesterol afeta esta estabilidade da fibra de 30nm será também alvo para futuros estudos. Em princípio, podemos imaginar que a ação desestabilizadora do colesterol sobre a fibra de 10nm terá um forte impacto sobre a estabilidade

da fibra de 30nm. Entretanto, devemos ressaltar que a fibra de 30nm é formada na presença da H5. Consequentemente, observar se o colesterol modifica a ligação desta *linker* histona à fibra será crucial para podermos compreender este fenômeno.

Conforme mencionado na introdução, existem aproximadamente 3.000 moléculas de água presentes no nucleossomo, sendo que 121 participam das interações da HO com o DNA. Neste trabalho, observamos que o colesterol já produziu efeito sobre as fibras de cromatina com uma baixa concentração - 0,45mg/dL, ou seja, 11,6µM. As fibras reconstituídas estão em uma concentração de cerca de 3-5nM. Assim, estaríamos com uma relação de cerca de 3.000 moléculas de colesterol por fibra de cromatina. Considerando que as fibras contêm 25 a 36 nucleossomos, teríamos cerca de 100 moléculas de colesterol por nucleossomo. Comparando com as 121 moléculas de água que participam da formação do nucleossomo, acreditamos ter observado o efeito do colesterol mantidas as relações estequiométricas pertinentes.

Desta forma, acreditamos que nossos resultados obtidos *in vitro* possam servir de ponto de partida para novas investigações dentro do contexto celular. Futuramente, nosso grupo pretende iniciar projetos que objetivam o estudo em cultura de células de mamífero, no qual trataremos as células com colesterol e observaremos o posicionamento dos nucleossomos em genes alvos.

8. Conclusões

Concluimos que colesterol não impede a formação das fibras de 10 e 30nm reconstituídas *in vitro*. Observamos também que o colesterol antecipou o ponto de saturação da fibra de cromatina de 10nm. Além disso, notamos que o colesterol desestabilizou tanto as fibras de 10nm quanto as de 30nm, em relação ao controle, quando submetidas ao aumento da temperatura, exposição temporal e ultracentrifugação.

PARTE II

Estudos estruturais do complexo receptor nuclear-nucleossomo

1. Nucleossomo e receptores nucleares

A ligação de fatores de transcrição à cromatina é um processo fundamental para regulação da expressão gênica. A identificação e mapeamento das interações entre as proteínas reguladoras da transcrição com o nucleossomo e a compreensão ao nível atômico de como elas acontecem são objetivos fundamentais da biologia moderna.

Em princípio, existem três modos de interação entre proteínas e nucleossomos: interação com (i) as histonas do NCP, geralmente por proteínas que reconhecem modificações nas caudas das histonas; (ii) com o DNA nucleossomal, por proteínas que reconhecem o DNA exposto na superfície do nucleossomo ou no *linker* DNA; e (iii) proteínas que potencialmente colidem com nucleossomos de forma dirigida, como as polimerases e helicases. (KOERBER et al., 2009).

Entretanto, apesar de diversas estruturas atômicas de mononucleossomos já terem sido resolvidas, nosso conhecimento estrutural de complexos proteicos com nucleossomos ainda é muito limitado (BENTLEY et al., 1984; RICHMOND, et al. 1984; RICHMOND, R. K. et al., 1997), (MAKDE et al., 2010). Até este ano foram publicadas quatro estruturas de peptídeos e proteínas, através de cristalografia, que se ligam diretamente ao nucleossomo (ARMACHE et al., 2011; BARBERA et al., 2006; KATO et al., 2013; MAKDE et al., 2010).

Duas modelagens comparativas complexos proteicos com nucleossomos foram publicadas, mostrando a IL-33 (interleucina 33) (ROUSSEL et al., 2008) e as proteínas HMGN (*High Mobility Group Nucleosome-binding*) (KATO et al., 2011) interagindo com o *patch* ácido formado pelo dímero de H2A/H2B no nucleossomo. Quanto às estruturas reais de complexos com mononucleossomos, obtidas por cristalografia, a primeira foi publicada em 2006. Este artigo mostrou o cristal de um peptídeo, LANA (Antígeno Nuclear Associado à Latência) do Herpes vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV), também ligado ao *patch* ácido (BARBERA et al., 2006). Em 2011, o domínio BAH (*bromo-associated domain*) da proteína Sir3 (Sir3BAH) foi cristalizado com resolução de 3,0 Å e mostrou que as interações desse domínio ocorrem com o DNA. Entretanto o principal contato acontece predominantemente com as histonas em diversas regiões: na cauda da H4, em resíduos de superfície da H3 e da H4 e, ainda, no *patch* ácido (ARMACHE et al., 2011).

A única das estruturas publicadas até o momento, que demonstrou uma proteína inteira complexada com um mononucleossomo foi o RCC1 (MAKDE et al., 2010). O RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation*) é uma proteína que interage com os nucleossomos na cromatina, recrutando outras proteínas que auxiliarão a formação do fuso mitótico durante a divisão celular.

O cristal do complexo mostrou duas proteínas do RCC1 interagindo com o nucleossomo em lados opostos de maneira similar. Foram observadas interações com as histonas no *patch* ácido e mais duas regiões do RCC1 que fazem interações com o DNA (Figura 34).

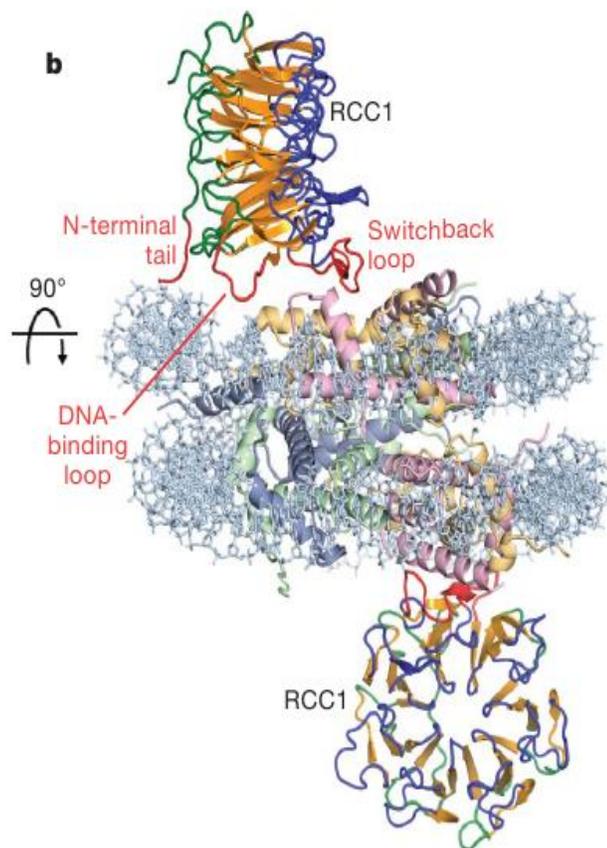


Figura 34. Estrutura cristalográfica do complexo RCC1/mononucleossomo (PDB 3MVD). Duas moléculas de RCC1 interagindo de forma equivalente ao nucleossomo. Interação do RCC1 com as histonas, H2A(amarelo)/H2B (rosa), pelo *Switchback loop* e com o DNA (azul claro) pelo *DNA-binding loop* e *N-terminal tail*.

Em relação a fatores de transcrição (TFs), sabe-se que existe uma cooperação natural entre os TFs que se ligam ao nucleossomo (MOYLE-HEYRMAN; TIMS; WIDOM, 2011), ou seja, a ligação de um TF favorece a ligação do próximo TF. Por exemplo, foi observado que um TF se liga ao DNA e recruta um fator de remodelamento, que por sua vez promove uma mudança

estrutural da cromatina, facilitando a ligação de um segundo TF (CHÁVEZ; BEATO, 1997). Na ausência de remodeladores da cromatina, os TFs podem se ligar ao DNA nucleossomal através de flutuações conformacionais que são inerentes ao nucleossomo, causando exposições transitórias locais de DNA. Esta ligação, também de maneira cooperativa, facilita a acessibilidade de ligação de um segundo fator de transcrição (LI et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado por ensaio de FRET (Transferência de Energia de Ressonância) que um fator de transcrição pode contribuir favoravelmente para a ligação de outras proteínas a sítios do mesmo lado no nucleossomo, mas não para lados opostos. Esses resultados abrem uma nova perspectiva para ajudar na predição da atividade de cooperação de fatores de transcrição em todo o genoma (MOYLE-HEYRMAN; TIMS; WIDOM, 2011).

Os receptores nucleares são conhecidos fatores de transcrição capazes de induzir o remodelamento da cromatina em resposta a pequenos ligantes lipofílicos. Eles parecem ser proteínas pioneiras, membros de um grupo restrito de ativadores com a habilidade de se ligar à cromatina e iniciar o processo de remodelamento (GEORGE; SCHILTZ; HAGER, 2009; LEMON; FREEDMAN, 1999). Por exemplo, o GR (receptor de glicocorticoide) pode induzir o reposicionamento de nucleossomos, formando sítios na cromatina acessíveis à clivagem pela enzima DNaseI (BELIKOV et al., 2000).

Apesar de termos um considerável conhecimento atômico sobre a ligação de fatores de transcrição ao DNA (estruturas cristalográficas de TF com DNA (RASTINEJAD et al., 2000; SCHWABE et al., 1993), sabemos ainda muito pouco sobre como isso acontece no contexto da cromatina. Perguntas cruciais para a compreensão da regulação transcricional na cromatina ainda persistem. Por exemplo, se os TFs se ligam ao NCP, onde e como ocorrem estas interações? Ou ainda, os TFs devem sofrer modificações conformacionais para se interagir ao NCP?

Com essas e outras perguntas em mente, acreditamos que o estudo das interações dos receptores nucleares com nucleossomo possa ser uma excelente estratégia para tentar elucidar mecanismos moleculares fundamentais para célula e, assim, propor novas estratégias farmacológicas. Contudo, como foi dito, no que diz respeito à interação do RNs com nucleossomos, a literatura é escassa.

Estudos realizados em meados de 1980 mostraram a interação do TR (receptor do hormônio tireoidiano) com nucleossomos através de digestão da cromatina com a enzima micrococcal endonuclease, que digere regiões internucleossomais (*linker* DNA). Os pesquisadores encontraram o TR ligado tanto aos fragmentos digeridos de *linker* DNA quanto nas frações contendo nucleossomos, como ilustrado na figura 35 (SAMUELS et al., 1980, 1982).

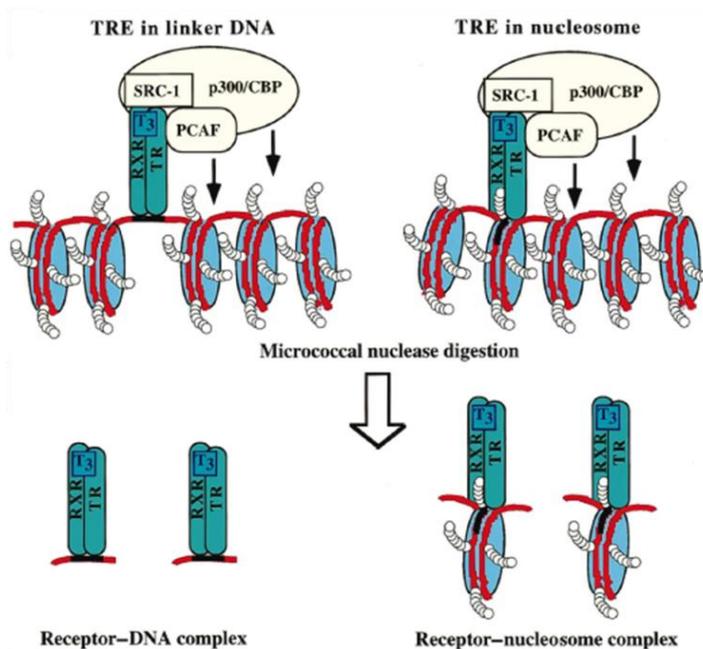


Figura 35. Esquema ilustrativo do TR/RXR ligado à cromatina (Adaptado de LI et al., 1999).

Desenho do experimento realizado por Samuels et al., 1980, mostrando que o heterodímero TR/RXR ligado ao T3 pode recrutar co-ativadores (p300/CBP, SRC-1) e enzimas acetil-transferases (PCAF) e pode se ligar tanto ao *linker* DNA como em regiões do DNA do próprio nucleossomo.

Esses resultados foram corroborados posteriormente em outros estudos (WONG et al., 1995, 1997), que também mostraram o TR/RXR ligado a regiões de DNA nucleossomal. Além de demonstrar que a ligação da H1 (*linker* histona) ao nucleossomo não alterou a afinidade do receptor ao seu elemento responsivo presente no DNA nucleossomal.

Em trabalho publicado em 1995, Truss e colaboradores estudaram a sequência do promotor MMTV (*Mouse Mammary Tumour Virus*) em células intactas e em núcleos de células para tentar elucidar a organização desse promotor no DNA nucleossomal e a ligação de fatores de transcrição antes e após a indução hormonal (TRUSS et al., 1995). Foi observado que o promotor MMTV adotou a mesma conformação na cromatina em todas as células analisadas e que antes da indução hormonal nenhum fator estava ligado ao DNA nucleossomal. Após a adição de

hormônios, foram observado sítios de DNase para HREs e NF-1 (*Nuclear Factor*), sugerindo a ligação simultânea do PR (receptor de progesterona), NF-1 e OTF- 1 (*Octamer Binding Factor*). Os autores sugerem que a ligação desses fatores ocorre na superfície do nucleossomo, sem a remoção ou o deslocamento deste. Isso aconteceria em vista da adoção de uma conformação que faria com que uma região estreita do DNA próxima a região da *dyad* fosse altamente acessível à DNaseI e enzimas de restrição (Figura 36).

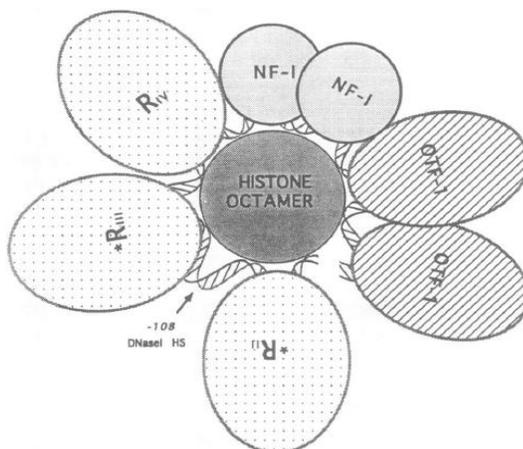


Figura 36. Esquema proposto por Truss e colaboradores representando a possível interação de RNs, NF-1 e OTF-1 à sequência do promotor MMTV em DNA nucleossomal (Adaptado de TRUSS et al., 1995).

Em 2008 foi resolvida, pela primeira vez, a estrutura cristalográfica de um receptor nuclear intacto, o PPAR- γ :RXR- α , em complexo com DNA e um peptídeo co-ativador. Estudos anteriores a este focaram principalmente na estrutura dos receptores de forma separada, demonstrando a arquitetura do DBD e LBD isoladamente e, portanto, não elucidavam como os multidomínios interagem. Esse trabalho trouxe grandes perspectivas para pesquisas nesse campo, pois, com a estrutura inteira do complexo, foi possível observar que o LBD do PPAR se liga aos dois DBDs, cooperando para a ligação de seus respectivos elementos responsivos (CHANDRA et al., 2008). Além disto, observou-se que a região de dobradiça pode interagir com o DNA, aumentando a especificidade do RN no reconhecimento dos elementos responsivos hormonais.

Já em 2011, utilizando uma combinação de técnicas como SAXS (*Small-Angle X-ray Scattering*), SANS (*Small-Angle Neutron Scattering*) e FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), foram propostos modelo das estruturas em solução de três heterodímeros, RXR-RAR, PPAR-RXR e RXR-VDR (ROCHEL et al., 2011). Com base nestes modelos, foram feitos estudos de modelagem molecular dos complexos de receptores nucleares sobre um

mononucleossomo, que sugerem uma organização espacial onde um co-regulador com atividade enzimática poderia se ligar a caudas de histonas conforme mostra a figura 37 (ROCHEL et al., 2011).

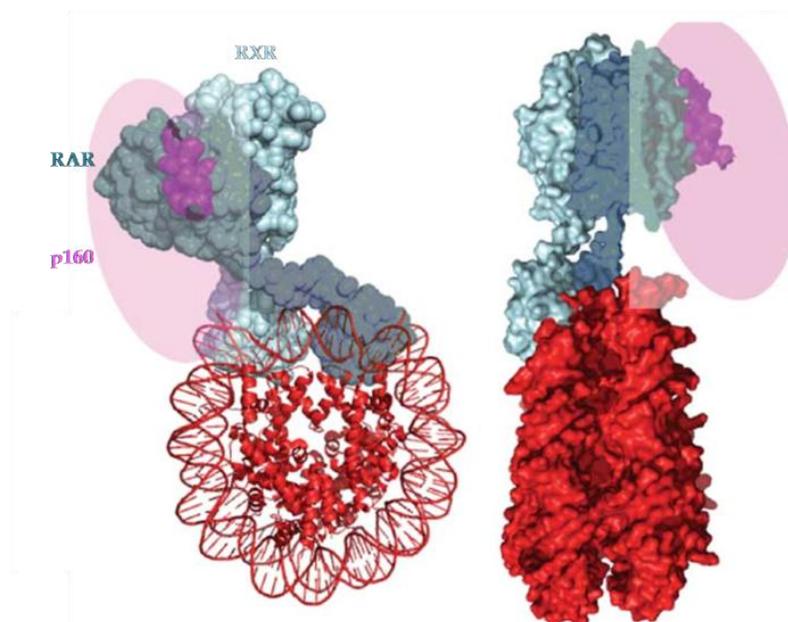


Figura 37. Modelagem de ligação RN ao nucleossomo. Modelo de ligação do RXR-RAR ligado ao DNA no nucleossomo, sugerindo que o coativador p160 (forma oval rosa) pode se posicionar no sítio catalítico na cauda das histonas H3 e H4 (Adaptado de ROCHEL *et al.*, 2011)

Além desta modelagem proposta em 2011 não temos conhecimento de outros estudos que mostrem de que forma os RNs podem interagir com um nucleossomo em nível atômico.

Assim, observando as interações dos RNs ao nucleossomo em nível atômico, poderemos observar os contatos entre os RNs e co-reguladores com mononucleossomos. Esse conhecimento é de suma importância uma vez que essas moléculas estão relacionadas à manutenção da homeostase, metabolismo em geral, desenvolvimento embrionário e sexual, entre outras funções, expandindo o campo para novos alvos farmacológicos.

2. Objetivos

Desenvolver uma metodologia para obtenção do complexo de RN-mononucleossomo que seja estável para estudos estruturais. Para isso, nessa primeira etapa objetivamos especificamente:

- Revisar a literatura sobre interações de RN ao nucleossomo e cromatina;
- Construção de clones contendo sítios de ligação a RNs;
- Estabelecer uma metodologia para reconstituição de mononucleossomos.

3. Materiais e métodos

a) *Reação em cadeia da polimerase (PCR)*

Realizou-se a PCR utilizando *primers* específicos com diferentes HREs e diferentes plasmídeos contendo a sequência de DNA 601.

Os plasmídeos com diferentes arranjos de DNA 601 (197.3 e 147.1pb) foram gentilmente cedidos pela Dr^a. Daniela Rhodes do *Medical Research Council*, Cambridge, Reino Unido.

Os *primers* foram desenhados com diferentes NREs (DR4, DR1 e meio sítios) em regiões de *linker* DNA e com um fragmento da sequência do vetor (pUC18), contendo sítios para enzimas de restrição (EcoRI, EcoRV e AvaI). Utilizou-se os *primers* somente de um lado (3') ou dos dois lados (3'5') da sequência 601, como mostra a figura 38.

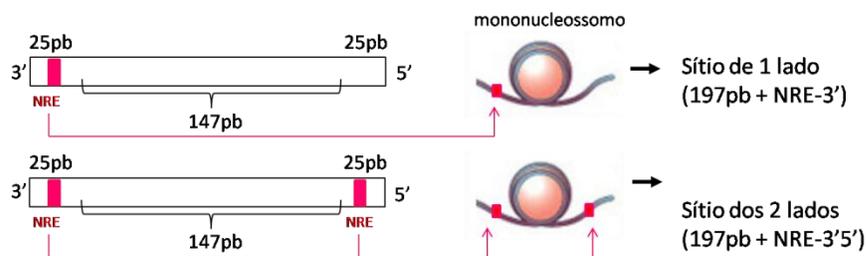


Figura 38. Esquema das construções de DNA com sítio de ligação a RNs.

A seguir, as sequências com os sítios de restrição destacados das reações que já foram feitas.

- 197pb – DR4 – 3' (F1 + R1); 3'5' (F1 + R2):

Forward primer (F1)

5' GCTAGGAATTCGATATCTCGGGTACAGGTCACag gAGGTCACGGGACCTC

EcoRV AvaI DR4 601 Widom

Reverse primer (R1)

3' aACAgCGacCTTGAGCCCTATAGAGATCTGCTAG

PUC 18 AvaI EcoRV

Reverse primer (R2)

3' TCCTGTGCATTGACCTcctgTGACCTTTGAGCCCTATAGAGATCTGCTAG

601 Widom DR4 AvaI EcoRV

- 197pb – DR1 – 3' (F1 + R1); 3'5' (F1 + R2):

Forward primer (F1)

5' GCTAGGAATTCGATATCTCGGGTACAGGTCAAaAGGTCACGGCGGG

EcoRV AvaI DR1 PUC 18 601 Widom

Reverse primer (R1)

3' aACAgCGacCTTGAGCCCTATAGAGATCTGCTAG

PUC 18 AvaI EcoRV

Reverse primer (R2)

3' TGCATTGACCTtTGACCTacCTTGAGCCCTATAGAGATCTGCTAG

601 Widom AvaI EcoRV

Inicialmente, realizou-se a otimização da PCR para chegar à seguinte reação: 1X PCR buffer (+KCl – Fermentas), 5mM dNTPs, 1mM MgCl₂, 1µg DNA 601, 10pmol primers F e R,

1,25 U Taq DNA Polimerase (Fermentas). Os seguintes ciclos foram programados no termociclador (BioRad- Thermal Cycler T100):

x40 {
2 minutos - 94°C
30 segundos - 94°C
30 segundos - 62°C
30 segundos - 72°C
15 segundos - 72°C

Os produtos resultantes foram analisados por gel nativo de agarose a 1% corado com brometo de etídio e quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus- GE).

b) Purificação dos produtos da PCR

Foi realizada a purificação das construções obtidas pela PCR através da excisão da banda do gel de agarose e remoção do DNA pelo kit Qiagen (Gel Extraction Kit), seguindo protocolo do próprio kit. Novamente, o DNA purificado foi analisado por gel nativo de agarose a 1% corado com brometo de etídio e quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus- GE).

c) Digestão do plasmídeo 197.3 em pUC18

O plasmídeo, contendo o arranjo 197.3, foi digerido com a enzima EcoRV -321 (NEB) para obtenção do vetor (pUC18) vazio (Figura 39). A reação foi feita a 37°C por duas horas, utilizando uma unidade de enzima para digerir 1µg de DNA e o tampão utilizado foi o “NEB R”. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A purificação do vetor foi feita da mesma maneira descrita anteriormente, através da excisão da banda no gel de agarose e remoção do DNA pelo kit Qiagen.

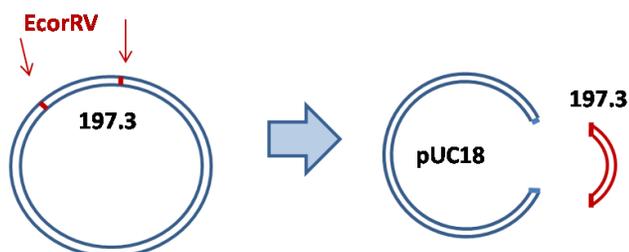


Figura 39. Esquema da digestão do plasmídeo pUC18 contendo o arranjo 197.3 para liberação do vetor vazio.

d) Clonagem do HRE 197.1 em pUC18

Com o vetor vazio e as amplificações das construções purificadas (197pb + DR1- 3' 5'; 197pb DR4- 3') foi realizada a reação de formação do clone conforme publicado por Li e Evans em 1997.

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

Foram coletadas sete colônias de cada clone para análise dos potenciais novos clones. As colônias foram crescidas em 5mL de meio de cultura LB contendo 60mg/mL de ampicilina (incubado a 37° sob agitação constante). Após 8 horas, apenas duas colônias do clone 197pb + DR4-3'apresentou crescimento; para o clone 197pb+DR1-3'5', apenas quatro. Transferiu-se o conteúdo para erlenmeyer, contendo 300mL de meio LB com ampicilina (mesma concentração usada anteriormente) e incubou-se novamente a 37° sob agitação constante, por 12 horas. Após o crescimento, o pellet foi isolado e o material encaminhado para purificação. A extração do DNA plasmídeo foi realizada, utilizando-se uma mini preparação plasmídica, conforme protocolo adaptado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular (já descrito na parte I).

A purificação final foi feita com fenol/clorofórmio, conforme descrito no material e métodos da parte I deste trabalho, seguida pela precipitação dos plasmídeos com etanol e resuspensão do DNA em TE. O resultado foi analisado por gel nativo de agarose a 1% corado com brometo de etídio e quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus- GE).

e) Análise da inserção do fragmento HREs 197.1 no pUC18

Para verificar a obtenção dos clones, foram feitas novas PCRs com os mesmos *primers* e ciclos utilizados para construção dos insertos desejados. Além disso, para verificar a correta inserção no vetor realizei a digestão do clone com três enzimas de restrição (EcoRV, AvaI, XbaI

- NEB). As reações foram feitas individualmente a 37°C por quatro horas e os resultados foram analisados por gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

f) Purificação do DNA 601 para formação de mononucleossomos

A partir de um plasmídeo contendo um arranjo de 197.61 realizamos a digestão com a enzima *AvaI* (NEB) para liberação de 61 cópias de DNA 601 com 25pb de *linker* DNA por plasmídeo digerido. A reação foi feita a 37°C durante oito horas e o resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Após a digestão seguiu-se para a etapa de precipitação com PEG 6000, purificação com fenol/clorofórmio (conforme descrito na parte I), precipitação com etanol e resuspensão do DNA em TE. O resultado foi analisado por gel nativo de agarose a 1% corado com brometo de etídio e quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus- GE).

4. Resultados

4.1) Preparação dos clones

a) Amplificação de sequência de DNA 601 contendo elementos responsivos a diferentes receptores

Com o objetivo de construir uma sequência que contivesse 147pb clonado a diferentes NREs, realizou-se a PCR tendo como molde um plasmídeo (pUC18), contendo a sequência 601. Para tanto realizou-se a PCR dos seguintes elementos: (Figura 40): 197pb + DR1 – 3’; 197pb + DR1 – 3’5’ e 197pb + DR4 – 3’.

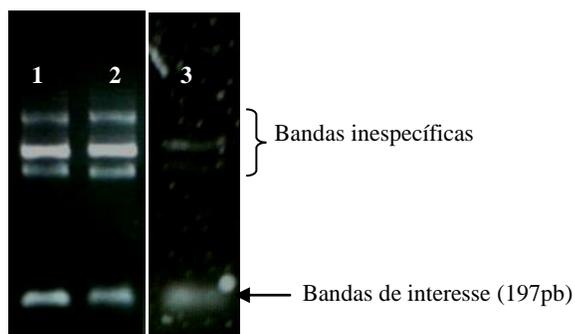


Figura 40. Amplificação de DNA contendo elementos responsivos a diferentes receptores. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: 197pb+DR1-3’; poço 2: 197pb DR4-3’5’; poço 3: 197pb+DR4-3’.

Podemos notar, no gel de agarose (Figura 40), bandas com tamanhos não esperados, provavelmente oriundos de amplificações inespecíficas. Por isso, em seguida, foi realizada a purificação das bandas de interesse, conforme descrito no tópico “Materiais e métodos”. A figura 41 mostra o material purificado.

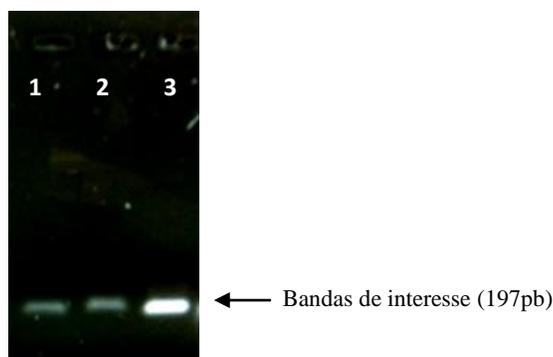


Figura 41. Amostras purificadas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: 197pb+DR1-3’; poço 2: 197p+DR1-3’5’; poço 3: 197pb+DR4-3’.

b) *Obtenção do vetor (pUC18) vazio*

Foi realizada uma digestão para liberação do vetor vazio, para posterior uso na reação clonal. Conforme observamos na figura 42 o material foi separado e purificado corretamente.

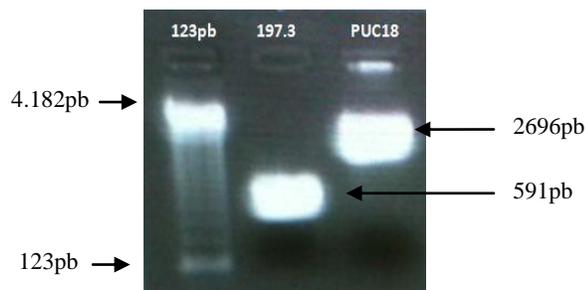


Figura 42. Purificação da digestão feita para liberar o vetor vazio. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

c) *Clone: 197pb +DR4-3'*

Após a reação de formação e purificação dos clones, apenas duas amostras (provenientes da coleta de diferentes colônias do mesmo clone) do clone 197pb+DR4-3' foram consideradas satisfatórias e nenhuma do clone 197pb+DR1-3'5' (Figura 43). Esse julgamento foi feito a partir da análise das bandas no gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, no qual se observa um grande "rastros" das bandas do mini prep, provenientes de diferentes colônias do clone 197pb+DR1-3'5', sugerindo que os clones não haviam sido bem formados (Figura 43).

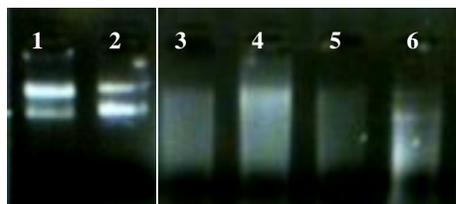


Figura 43. Análise dos clones formados. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O gel mostra que somente os clones dos poços 1 e 2 parecem ter sido formados corretamente. Poço 1: 197pb DR4-3'(colônia 1); poço 2: 197pb DR4-3' (colônia 2); poços 3-6: 197pb DR1-3'5' (colônias 1 a 4)

A formação do clone (197pb+DR4-3') foi confirmada pela PCR, com os mesmos *primers* utilizados na reação de amplificação da construção das sequências desejadas (Figura 44).

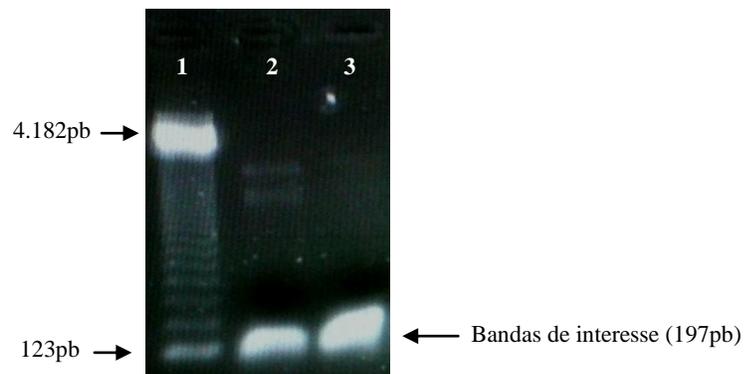


Figura 44. PCR do clone formado. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: marcador de 123pb; poço 2: 197pb DR4-3' (1); poço 3: 197pb DR4-3' (2);

Porém, quando realizamos a digestão para confirmação da inserção correta do fragmento desejado ao pUC18, (Figura 45), observamos que somente a enzima EcoRV conseguiu agir sobre o plasmídeo, demonstrando que os sítios para *Ava*I e *Xba*I não estão presentes no clone. Além disso, a banda da digestão obtida pelo corte feito pela EcoRV não está com o tamanho esperado (197pb), sugerindo que o clone não foi formado corretamente.

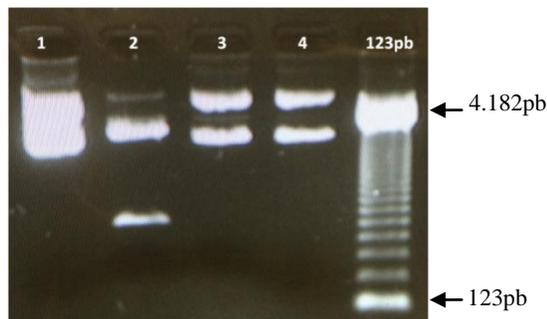


Figura 45. Digestão do clone com três enzimas de restrição, demonstrando que o clone não contém os sítios para enzimas de restrição (*EcoRV*, *Ava*I e *Xba*I) da maneira esperada. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: controle (clone sem digerir); poço 2: clone digerido com *EcoRV*; poço 3: clone digerido com *Ava*I; poço 4: clone digerido com *Xba*I. Tamanho do fragmento esperado: 147pb.

4.2) *Preparo de DNA para estabelecimento de metodologia de reconstituição de mononucleossomos*

a) *DNA 601 purificado*

Conforme descrito na parte I desta dissertação, mostramos ter bem estabelecida a metodologia de reconstituição de longas fibras de cromatina *in vitro*. Utilizando uma estratégia similar, estamos isolando sequências de DNA 601 para formação de mononucleossomos. O plasmídeo 197.61 foi corretamente digerido, liberando o fragmento 197 que, posteriormente, foi purificado (Figura 46). Esse DNA será usado posteriormente em ensaios para desenvolvimento e implementação da metodologia de reconstituição de mononucleossomo.

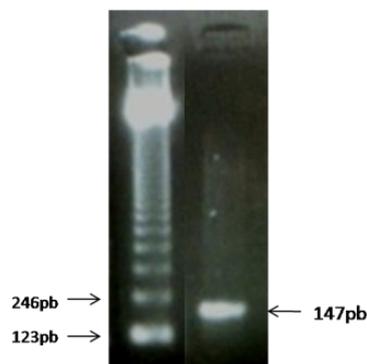


Figura 46. DNA 601 purificado para posteriores ensaios de reconstituição de mononucleossomo. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, cedido pelo colega Martin Fonkoua.

5. Discussão e Perspectivas

Ao longo de todo esse trabalho, discutimos como o remodelamento da cromatina é um importante meio de regulação da expressão gênica. Na parte II enfatizamos que o estudo das interações entre os mononucleossomo e os RNs é crucial para compreensão dos princípios básicos que regem os processos transcricionais. Por meio do mapeamento de possíveis sítios de interação de RNs no nucleossomo, poderemos identificar se ocorrem mudanças estruturais desse complexo em presença de ligantes e tentar responder qual a importância destas possíveis mudanças.

Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares de um grande projeto, com o objetivo final de realizar estudos estruturais do complexo RN: mononucleossomo, com ênfase na cristalografia.

A literatura foi visitada para auxiliar a traçar os objetivos a curto e longo prazo. Além disso, procuramos relatar a discussão em torno da estratégia adotada para se obter o complexo RN:mononucleossomo, iniciando pela construção de clones contendo NREs e DNA 601. Demonstramos também os ensaios de digestão e purificação de uma sequência de 197.1, dando início ao estabelecimento da metodologia para reconstituição de mononucleossomos *in vitro*.

Conforme já visto, diversas estruturas de nucleossomos já foram publicadas, sendo a estrutura de um mononucleossomo com o RCC a única proveniente de um cristal com a proteína inteira. Os NCPs já cristalizados foram reconstituídos de diferentes formas (Figura 47). Dentre estas, os pesquisadores utilizaram uma metodologia para obtenção do complexo RCC1: NCP, similar àquela que relatamos na parte I deste trabalho para reconstituir longas fibras de cromatina. A principal diferença é que o NCP foi reconstituído utilizando histonas recombinantes de *Xenopus*. Em outro trabalho, para a reconstituição do NCP e posterior cristalização, observamos a utilização de histonas de galinhas com um DNA alfa satélite (HARP, et al., 2000). Estas observações levam-nos a crer que nossa metodologia está bem fundamentada e que a reconstituição do mononucleossomo não será uma tarefa tão árdua.

Nucleosomal X-ray crystal structures			
Variant/ligand	Histone species	DNA length	DNA sequence
<i>NCPs differing in histone content</i>			
Major histones	Frog	146	α -Satellite
Major histones	Chicken	146	α -Satellite
Major histones	Yeast	146	α -Satellite
Major histones	Human	146	α -Satellite
Major histones	Fly	147	α -Satellite
H2A.Z	Frog/mouse	146	α -Satellite
macroH2A	Mouse/human	146	α -Satellite
H3T	Human	146	α -Satellite
Sin mutants	Frog	146	α -Satellite
Methylated H3/H4	Frog	146	α -Satellite
H3K56Q/E	Frog	146	α -Satellite
<i>NCPs differing in DNA fragment</i>			
Distinct sequence	Frog	146	α -Satellite (type 2)
Length	Frog	147	α -Satellite
Length	Frog	145	α -Satellite
A ₁₆ , MRE	Frog	147	α -Satellite-based ^a
TTTAA elements	Frog	147	α -Satellite-based
Strong positioning	Frog	145	601 ^a
<i>NCP in complex with small molecules</i>			
Polyamides	Frog	146	α -Satellite
Polyamide dimer	Frog	146	α -Satellite
LANA peptide	Frog	146	α -Satellite
Platinum drugs	Frog	147	α -Satellite
Intercalating agent	Frog	145	α -Satellite
MnCl ₂ , MnSO ₄	Frog	147	α -Satellite
Co ²⁺ , Ni ²⁺	Frog	147	α -Satellite
Rb ⁺ , Cs ⁺	Frog	147	α -Satellite
<i>NCP in complex with protein factors</i>			
RCC1	Frog	147	601 ^a
<i>Higher order structure</i>			
Tetranucleosome	Frog	694	601 ^a

^a Non-palindromic DNA fragments.

Figura 47. Lista com as estruturas cristalográficas de diferentes NCPs (Adaptado de TAN; DAVEY, 2011).

Concomitantemente aos trabalhos de clonagem das sequências desejadas, contendo o DNA 601 e NREs, foi importante ter conseguido demonstrar, juntamente com o colega Martin Fonkoua, que foi possível a extração do arranjo 197.61 do pUC18 e sua digestão para obtenção de somente o 197.1. Ressaltamos também que conseguimos purificar estes pequenos fragmentos, separando-os do esqueleto, através da utilização de PEG 6000. Estes ensaios serão importantes para o estabelecimento completo da metodologia de reconstituição do mononucleossomo, com DNA 601 ou, o nosso NRE 601.

Inesperadamente, a obtenção das construções desejadas está se mostrando desafiadora. Aqui, utilizamos um sistema de clonagem independente de ligases. Esta reação foi descrita em 1997 (LI; EVANS, 1997), sendo uma abordagem muito eficiente, que facilita a clonagem independentemente de compatibilidade local. Isso acontece devido a utilização do sistema de reparo bacteriano, que resolve os desencontros residuais, saliências ou falhas de forma previsível para gerar inserções de sequencias alvo ao vetor (Figura 46). Este sistema basea-se na utilização de uma enzima, a ExoIII nuclease, que catalisa por etapas a retirada de mononucleotídeos das regiões terminais 3' do DNA dupla fita. Um número limitado de nucleotídeos são removidos

durante cada evento de ligação, resultando em deleções progressivas coordenadas no DNA. Na figura 48 mostramos um modelo esquemático da reação.

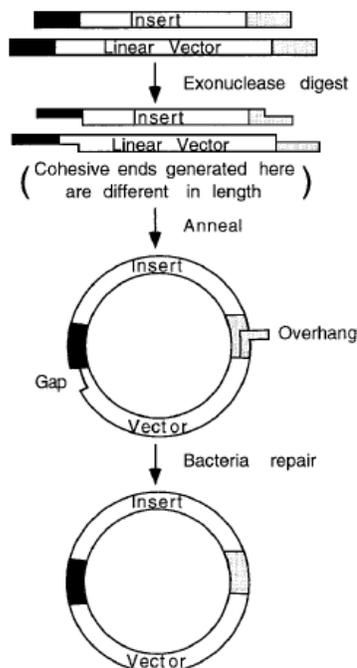


Figura 48. Esquema ilustrativo de inserção de sequências alvo em um vetor (LI; EVANS, 1997).

Em princípio, acreditamos que, utilizando este sistema fomos capazes de inserir o nosso fragmento de interesse no vetor pUC18, entretanto parece que a inserção foi aleatória.

Conforme demonstrado, realizou-se com sucesso a otimização da PCR para amplificação de 197pb do DNA 601, contendo nos 50pb NREs. Mostrei também que o isolamento do esqueleto do pUC18 é possível através da retirada de um inserto de DNA 601. Após observação, por PCR, que o fragmento desejado tinha se inserido no vetor pUC18, realizou-se os ensaios de digestão. Surpreendentemente, quando analisamos a digestão teste para verificar o correto posicionamento do inserto no vetor, observamos que a nossa construção não continha os sítios esperados (para *AvaI* e *XbaI*) e ainda, que a banda no gel de agarose resultante do corte com a enzima *EcoRV* não estava dentro do tamanho esperado. Assim, esses resultados sugerem que a sequência desejada foi inserida aleatoriamente no vetor. Possivelmente, a *Exo III* nucleasse seja a principal responsável por esta inserção mal posicionada. Isto pode ter ocorrido devido a esta enzima possuir ação de digestão das extremidades de duplas fitas extremamente sensível ao tempo e concentração.

Outra hipótese para explicar a presença do inserto com a destruição dos sítios de restrição, são os anelamentos inespecíficos dos *primers* utilizados. Assim, será importante rever as sequências, na tentativa de aumentar a especificidade de reconhecimento ao vetor.

Futuramente, como parte do meu projeto de doutorado, pretendemos trabalhar na construção de novos clones contendo os NREs 601 e na reconstituição dos mononucleossomos com estas sequências. Também focarei na expressão e purificação de receptores nucleares para os estudos de ligação dos RNs aos mononucleossomos.

Assim, apesar de ainda não termos obtidos as construções esperadas, acredito ter avançado em alguns aspectos importantes para implementação desta nova metodologia aqui descrita. Tenho ciência do longo caminho que ainda tenho a percorrer para atingir o principal objetivo, a obtenção de um complexoRN:nucleossomo.

ANEXO

1) Cálculos da concentração da solução de colesterol em molaridade:

Utilizou-se a fórmula:

$$M = \frac{m(\text{g})}{\text{MM} \cdot V(\text{L})}$$

Sendo:

M= massa molar; m= massa; MM= massa molecular; V= volume da solução

MM do colesterol = 386,65g/mol

Portanto:

- Colesterol 10x = 4,5mg/dL → 0,045g/L

$$M = \frac{0,045 \text{ (g)}}{386,65 \cdot 1(\text{L})} \rightarrow M = 1,16 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 116 \mu\text{M}$$

- Colesterol 1x = 0,45mg/dL → 0,0045g/L

$$M = \frac{0,0045 \text{ (g)}}{386,65 \cdot 1(\text{L})} \rightarrow M = 1,16 \cdot 10^{-5} \text{ M} \rightarrow 11,6 \mu\text{M}$$

2) Cálculos da concentração das fibras em molaridade:

- Arranjo 197.25:

Multiplicamos a quantidade de pares de bases pelo número de repetições do arranjo, portanto:

$$197\text{pb} \times 25 = 4925\text{pb}$$

Considerando que: $1\text{pb} = 640 \text{ Da}$, então:

$$4925\text{pb} \times 640\text{Da} = 3,152 \cdot 10^6 \text{ Da}$$

Considerando que $1\text{Da} = 1\text{g/mol}$

Utilizamos $1\mu\text{g}$ ($1 \cdot 10^{-6} \text{ g}$) de DNA na reconstituição, então:

$$1 \cdot 10^{-6} \text{ (g)} \text{ ——— } x \text{ (mol)} \rightarrow x = 0,32 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$$

$$3,152 \cdot 10^6 \text{ (g)} \text{ ——— } 1 \text{ (mol)}$$

Cada reação se constitui de $80\mu\text{L}$ ($80 \cdot 10^{-6} \text{ L}$), portanto:

$$3,2 \cdot 10^{-13} \text{ (mol)} \text{ ——— } 80 \cdot 10^{-6} \text{ L}$$

$$Y \text{ (mol)} \text{ ——— } 1\text{L} \rightarrow y = 4 \cdot 10^{-9} \text{ M} \rightarrow 4\text{nM}$$

O mesmo raciocínio foi utilizado para o cálculo do arranjo 177.36:

- 177.36:

$$177 \times 36 = 6372 \text{pb}$$

$$6372 \text{pb} \cdot 640 = 4,078 \cdot 10^{-6} \text{Da}$$

Na reconstituição:

$$1 \cdot 10^{-6} \text{ (g)} \text{ ————— } x \text{ (mol)} \rightarrow x = 0,25 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$$

$$4,078 \cdot 10^{-6} \text{ (g)} \text{ ————— } 1 \text{ (mol)}$$

Em 80 μ L de reação:

$$2,5 \cdot 10^{-13} \text{ (mol)} \text{ ————— } 80 \cdot 10^{-6} \text{ (L)}$$

$$y \text{ (mol)} \text{ ————— } 1 \text{ L} \rightarrow y = 3 \cdot 10^{-9} \text{ M} \rightarrow 3 \text{ nM}$$

Bibliografia

AGGARWAL, A. K. et al. Recognition of a DNA operator by the repressor of phage 434: a view at high resolution. **Science**, 1988.

ALBERTS B.; BRAY, D.; LEWIS, J. et al. Molecular Biology of the Cell. 3rd edition. New York: Garland Science; 1994. The Lipid Bilayer. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28414/>

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

ANCHISI, L. et al. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. **Frontiers in physiology**, v. 3, n. January, p. 486, jan. 2012.

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

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

BASSETT, A. et al. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 2, p. 159–65, abr. 2009.

BATES, D. L.; THOMAS, J. O. Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? **Nucleic Acids Res.** 25, 5883–5894, 1981.

BELIKOV, S. et al. Hormone activation induces nucleosome positioning in vivo. **The EMBO journal**, v. 19, n. 5, p. 1023–33, 1 mar. 2000.

BENJAMIN, D.; JOST, J. P. Reversal of methylation-mediated repression with short-chain fatty acids: evidence for an additional mechanism to histone deacetylation. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 17, p. 3603–10, 1 set. 2001.

BENTLEY, G. A. et al. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 16Å Resolution. **Journal of molecular biology**, n. 257, p. 55–75, 1984.

BENTLEY, G. A. et al. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 16Å Resolution. **Journal of molecular biology**, n. 176, p. 55–75, 18 set. 1984.

BHATTACHARYA, A. Structures of Desite. **Nature**, v. 459, n. May, 2009.

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

BORTNICK, A E. et al. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28634–40, 15 set. 2000.

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

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

CARROLL, D. J, GRUMMER, R. . A Review of Lipoprotein Cholesterol Metabolism : Importance to Ovarian Function. **journal of animal science**, v. 66, p. 3160–3173, 1988.

CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 350–6, 20 nov. 2008.

CHÁVEZ, S.; BEATO, M. Nucleosome-mediated synergism between transcription factors on the mouse mammary tumor virus promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 2885–90, 1 abr. 1997.

CIRILLO, L. A. et al. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. **Molecular cell**, v. 9, n. 2, p. 279–89, fev. 2002.

CLARK, D. J.; KIMURA, T. Electrostatic mechanism of chromatin folding. **Journal of molecular biology**, v. 211, n. 4, p. 883–96, 20 fev. 1990.

COMPTON, J. L.; BELLARD, M.; CHAMBON, P. Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 73, 4382–4386, 1976.

DAVEY, C. A et al. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. **Journal of molecular biology**, v. 319, n. 5, p. 1097–113, 21 jul. 2002.

DAVIE, J. R. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. **The journal of nutrition**, p. 2485–2493, 2003.

DORIGO, B. et al. Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 1, p. 85–96, mar. 2003.

DORIGO, B. et al. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5701, p. 1571–3, 26 nov. 2004.

ELTSOV, M. et al. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19732–7, 16 dez. 2008.

FAN, J. Y. et al. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. **Nature structural biology**, v. 9, n. 3, p. 172–6, mar. 2002.

FAN, Y.; NIKITINA, T.; MORIN-KENSICKI, E. M.; ZHAO, J.; MAGNUSON, T. R.; WOODCOCK, C. L.; SKOULTCHI, A. I. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4559-4572, 2003.

FÉLIX-REDONDO, F. J.; GRAU, M.; FERNÁNDEZ-BERGÉS, D. Cholesterol and cardiovascular disease in the elderly. Facts and gaps. **Aging and disease**, v. 4, n. 3, p. 154–69, jun. 2013.

FIGUEIRA, A. C. M. et al. Dissecting the Relation between a nuclear receptor and GATA: binding affinity studies of thyroid hormone receptor and GATA2 on TSH β promoter. **PLoS one**, v. 5, n. 9, p. e12628, jan. 2010.

FINCH, J. T.; KLUG, A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 6, p. 1897–901, jun. 1976.

FRAGOSO, G. et al. Nucleosome positioning on the MMTV LTR results from the frequency-biased occupancy of multiple frames. **Genes & Development**, v. 9, n. 15, p. 1933–1947, 1 ago. 1995.

GAN, H. H.; SCHLICK, T. Chromatin ionic atmosphere analyzed by a mesoscale electrostatic approach. **Biophysical journal**, v. 99, n. 8, p. 2587–96, 20 out. 2010.

GEORGE, A. A.; SCHILTZ, R. L.; HAGER, G. L. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 1, p. 214–24, jan. 2009.

GHIRLANDO, R.; FELSENFELD, G. Hydrodynamic studies on defined heterochromatin fragments support a 30 nm fiber having 6 nucleosomes per turn. **Journal of molecular biology** *Mol Biol*, v. 376, n. 5, p. 1417–1425, 2008.

GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes & Development**, p. 121–141, 2000.

HAGER, G. L.; MCNALLY, J. G.; MISTELI, T. Transcription dynamics. **Molecular cell**, v. 35, n. 6, p. 741–53, 24 set. 2009.

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

HUYNH, V. A T.; ROBINSON, P. J. J.; RHODES, D. A method for the in vitro reconstitution of a defined “30 nm” chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. **Journal of molecular biology**, v. 345, n. 5, p. 957–68, 4 fev. 2005.

JAKOBSSON, T. et al. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. **Trends in pharmacological sciences**, v. 33, n. 7, p. 394–404, jul. 2012.

JOTI, Y. et al. Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. **Nucleus**, n. October, p. 1–7, 2012.

KATO, H. et al. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12283–8, 26 jul. 2011.

KATO, H. et al. A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1110–1113, 30 maio. 2013.

KEPPER, N. et al. Nucleosome geometry and internucleosomal interactions control the chromatin fiber conformation. **Biophysical journal**, v. 95, n. 8, p. 3692–705, out. 2008.

KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. **Cell**, v. 116, p. 259–272, 2004.

KOERBER, R. T. et al. Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. **Molecular cell**, v. 35, n. 6, p. 889–902, 24 set. 2009.

KOMURA, S.; OHTA, T., eds. Non-Equilibrium Soft Matter Physics.. Series in Soft Condensed Matter 4. World Scientific, Hackensack, NJ, 2012.

KOROLEV, N. et al. Modelling chromatin structure and dynamics: status and prospects. **Current opinion in structural biology**, v. 22, n. 2, p. 151–9, abr. 2012.

LEMON, B. D.; FREEDMAN, L. P. Nuclear receptor cofactors as chromatin remodelers. **Current opinion in genetics & development**, p. 499–504, 1999.

LI, C.; EVANS, R. M. Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 20, p. 4165–6, 15 out. 1997.

LI, G. et al. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 1, p. 46–53, jan. 2005.

LI, G. et al. Highly compacted chromatin formed in vitro reflects the dynamics of transcription activation in vivo. **Molecular cell**, v. 38, n. 1, p. 41–53, 9 abr. 2010.

LI, G.; REINBERG, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 21, n. 2, p. 175–86, abr. 2011.

LI, Q. et al. Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 10, n. 4, p. 157–164, maio. 1999.

LOWARY, P. T.; WIDOM, J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. **Journal of molecular biology**, v. 276, n. 1, p. 19–42, 13 fev. 1998.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 7, p. 436–47, jul. 2012.

LUND, G. et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29147–54, 9 jul. 2004.

MAKDE, R. D. et al. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 562–6, 30 set. 2010.

MATERESE, C. K.; SAVELYEV, A.; PAPOIAN, G. A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 41, p. 15005–13, 21 out. 2009.

MAXFIELD, F. R.; WÜSTNER, D. Intracellular cholesterol transport. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 891–898, 2002.

MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. SnapShot: Nuclear receptors II. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 986.e1, 17 set. 2010.

MORRIS, N. R. Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, 8, 357–363, 1976.

MOYLE-HEYRMAN, G.; TIMS, H. S.; WIDOM, J. Structural constraints in collaborative competition of transcription factors against the nucleosome. **Journal of molecular biology**, v. 412, n. 4, p. 634–46, 30 set. 2011.

NAGY, L.; SCHWABE, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 6, p. 317–24, jun. 2004.

OTWINOWSKI, Z.; SCHEVITZ, R. W.; ZHANG, R-G.; LAWSON, C. L.; JOACHIMIAK, A.; MARMOSTEIN, R.Q.; LUISI, B. F.; SIGLER, P. B. Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. **Nature**, 335:321-329, 1988.

PANIN, L. E.; RUSSKIKH, G. S.; POLYAKOV, L. M. Detection of apolipoprotein A-I, B, and E immunoreactivity in the nuclei of various rat tissue cells. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 65, n. 12, p. 1419–23, dez. 2000.

PEARSON, E. C.; BATES, D. L.; PROSPERO, T. D.; THOMAS, J. O. Neuronal nuclei and glial nuclei from mammalian cerebral cortex. Nucleosome repeat lengths, DNA contents and H1 contents. **Eur. J. Biochem.** 144, 353–360, 1984.

PUCADYIL, T. J.; CHATTOPADHYAY, A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 4, p. 295–333, jul. 2006.

QUÉNET, D.; MCNALLY, J. G.; DALAL, Y. of chromatin fibre folding in vivo. **EMBO reports**, v. 13, n. 11, p. 943–944, 2012.

RASTINEJAD, F. et al. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. **The EMBO journal**, v. 19, n. 5, p. 1045–54, 1 mar. 2000.

RENAUD, J. P.; MORAS, D. Structural studies on nuclear receptors. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 57, n. 12, p. 1748–69, nov. 2000.

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

RICHMOND, T. J., J. T. FINCH, et al. "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution." **Nature** 311(5986): 532–537, 1984.

ROBINSON, P. J. J. et al. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 17, p. 6506–11, 25 abr. 2006.

ROCHEL, N. et al. Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 5, p. 564–70, maio. 2011.

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

ROUTH, A. L. The Determinants of the Structure of the 30 nm Chromatin Fibre. 165 f. Tese (Doutorado em filosofia) – MRC Laboratório de Biologia Molecular, Cambridge, 2009.

ROUTH, A.; SANDIN, S.; RHODES, D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 8872–7, 1 jul. 2008.

SAHA, A.; WITTMAYER, J.; CAIRNS, B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 6, p. 437–47, jun. 2006.

SAMUELS, H. H. et al. Thyroid Hormone Nuclear Receptor Levels Are Influenced by the Acetylation of Chromatin-associated Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 2499–2508, 1980.

SAMUELS, H.H.; PERLMAN, A.J.; RAAKA, B.M; STANLEY, F. Organization of the thyroid hormone receptor in chromatin. *Recent Prog. Horm. Res.* 38, 557–599, 1982.

SANTOS, G. M.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 22, n. 3, p. 87–93, mar. 2011.

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

SCHWABE, J. W. et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 567–78, 5 nov. 1993.

SCHWABE, J. W. The role of water in protein-DNA interactions. **Current opinion in structural biology**, v. 7, p. 126–34, fev. 1997.

SUTO, R. K. et al. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A .Z. **Nature structural biology**, v. 7, n. 12, p. 1121–1124, 2000.

TAN, S.; DAVEY, C. A. Nucleosome structural studies. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 1, p. 128–36, fev. 2011.

TRUSS, M. et al. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. **The EMBO journal**, v. 14, n. 8, p. 1737–51, 18 abr. 1995.

WATSON, P. J. et al. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 335–40, 19 jan. 2012.

WEDEMANN, G.; LANGOWSKI, J. Computer simulation of the 30-nanometer chromatin fiber. **Biophysical journal**, v. 82, n. 6, p. 2847–59, jun. 2002.

WIDOM, J. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. **PNAS**, v. 89, n. February, p. 1095–1099, 1992.

WIENCH, M.; MIRANDA, T. B.; HAGER, G. L. Control of nuclear receptor function by local chromatin structure. **The FEBS journal**, v. 278, n. 13, p. 2211–30, jul. 2011.

WONG, J. et al. Structural and functional features of a specific nucleosome containing a recognition element for the thyroid hormone receptor. **The EMBO journal**, v. 16, n. 23, p. 7130–45, 1 dez. 1997.

WONG, J.; SHI, Y-B; WOLFFE, A. P. A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the Xenopus TRbA gene by the thyroid hormone receptor. **Genes Dev.** 9, 2696–2711, 1995.

WOODCOCK, C. L. F.; FRADO, L. Y.; RATTNER, J. B. The Higher-order Structure of Chromatin : Evidence for a Helical Ribbon Arrangement. **Journal of Cell Biology**, v. 99, n. July, p. 45–52, 1984.

WORCEL, A.; STROGATZT, S.; RILEY, D. Structure of chromatin and the linking number of DNA. **PNAS**, v. 78, n. 3, p. 1461–1465, 1981.

YEAGLE P. L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta.** 822: 267–287, 1985.

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

ZENG, L. et al. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48801–7, 19 nov. 2004.

ZHANG, J. et al. DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR–RXR complex. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 5, p. 556–563, 2011.

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

ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. **The Journal of endocrinology**, v. 204, n. 3, p. 233–40, mar. 2010.