

Universidade de Brasília

Wanessa Felix Cabral

**Desenho e Síntese de peptídeos miméticos ligantes da
superfície nucleossomal**

Brasília, 2017.

Wanessa Felix Cabral

**Desenho e Síntese de peptídeos miméticos ligantes da
superfície nucleossomal**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins
Santos

Brasília, 2017.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cabral, Wanessa
CC117d Desenho e Síntese de peptídeos miméticos ligantes
da superfície nucleossomal / Wanessa Cabral;
orientador Guilherme Martins Santos. -- Brasília,
2017.
75 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia
Molecular) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. Peptídeos stapled. 2. Proteínas ligantes de
nucleossomo. 3. Nucleossomo. I. Santos, Guilherme
Martins, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e pelas oportunidades que me foram concedidas.

À minha família, que sempre aceitou e me acompanhou em todas as minhas decisões, à minha mãe pela paciência com meus estresses, preocupação com a minha saúde e noites mal dormidas e ao meu pai sempre estimulando a nossa busca por ser alguém melhor, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao professor doutor Guilherme Santos, pela oportunidade de participar desse projeto, pelos ensinamentos sobre ciência e cromatina. Sua orientação foi essencial para a minha formação científica.

Ao professor doutor Angelo Machado, co-orientador de coração, pela orientação científica e pessoal. Vejo nele, um exemplo de profissional e excelente professor.

Ao meu namorado Luiz Gustavo, companheiro e paciente, sempre me estimulando a continuar e não desistir. Sem seu carinho e cuidado nada disso seria possível.

Agradeço aos meus amigos Jéssica Delavechia, Beatriz Lemes, Lélío Thalys, Michele Ávila, Julimar de Fátima, Fernanda Rodrigues e Letícia Ruas, pela amizade e carinho, por terem compartilhado comigo todos os momentos de alegria e tristeza ao longo do mestrado. Especialmente meu amigo querido, Diego Hilarino, pela assistência emocional e técnica na finalização desse trabalho.

Agradeço aos professores doutores Rafael Oliveira Rocha, Guilherme Dotto Brand, Fátima Borin, Luiz Simeoni, por todo o auxílio com reagentes, vidrarias, equipamentos e por toda contribuição científica. Em especial ao professor Dr. Guilherme Dotto que tanto auxiliou no meu estudo de síntese de peptídeos.

Aos meus amigos do grupo Cromatina, Isabel Torres, Kaian Telles, Camyla Ribeiro, Vinícius Fernandes e Paloma Almeida, pelos almoços, apoio e pelas conversas científicas ou não. Em Especial a Bel que tanto me ensinou sobre cromatina.

Aos queridos do Farmol, laboratório que me acolheu, e apesar de pouco tempo, foram essenciais nos meus dias e me ensinaram bastante sobre uma área totalmente desconhecida para mim. Ao Henrique, Simone, Cinthia, Carol, Sidney, Flora, Mariella, Mariana, Cibele, Camila,

Isadora, Mariana, Hanna, Anyk, Erica, Fernanda, Bruna, Daniela, meu carinho e agradecimento.

Aos meus amigos do LITMO, Fernanda, Jorge, Terezinha, Diana, José, Éder, Luís, Bárbara, pelas inúmeras conversas científicas ou não, regadas a café e Master chef. A companhia e as risadas de vocês foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor José Cardozo, da Embrapa, pela colaboração científica, sem a sua ajuda técnica na realização das análises a finalização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada.

Ao Doutor Carlos Bloch, da Embrapa, pela cessão de seu laboratório e de seus equipamentos envolvidos na caracterização dos peptídeos.

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

Meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte e colaboraram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Abreviações e Siglas	9
Índice de Tabelas	11
Índice de Figuras	11
1. Introdução	14
1.1. Cromatina e Nucleossomo	14
1.2. Moduladores da arquitetura da Cromatina	16
1.2.1. Íons de metais divalentes	16
1.2.2. <i>Linker</i> histonas	17
1.2.3. Cauda da H4 e modificações pós-traducionais	17
1.2.4. Proteínas Ligantes de Nucleossomo (NBPs)	17
a) LANA:	18
b) RCC1:	19
c) Sir3:	19
d) CENP-C:	20
e) PRC1:	20
1.3. Moléculas Exógenas ligantes de nucleossomo.....	21
1.3.1. Peptídeos miméticos	23
1.3.2. Peptídeos <i>Stapled</i>	25
1.3.3. Desenho de Peptídeos <i>Stapled</i>	26
1.4. Síntese em fase sólida dos Peptídeos “ <i>Stapled</i> ”	27
1.5. Fechamento de anel por metátese de olefina (RCM)	29
1.6. Dicroísmo Circular:	32
2. Objetivo Geral:	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Desenho dos Peptídeos <i>Stapled</i> :	35
3.2. Síntese dos Peptídeos <i>Stapled</i> :	36
3.3. Preparação da resina para a SPFS	38
3.4. Etapa de Desproteção:	38
3.5. Etapa de acoplamento:	39
3.5.1. Síntese utilizando HATU ou HCTU	39
3.5.2. Síntese utilizando DIC:	40

3.6.	Reação de metátese de olefina para fechamento do anel	42
3.7.	Clivagem do peptídeo da resina	42
3.8.	Caracterização dos peptídeos	42
3.9.	Purificação dos peptídeos:.....	43
3.10.	Padronização das amostras de peptídeos	43
3.11.	Dicroísmo Circular	44
4.	Resultados e Discussão:	45
4.1.	Síntese do peptídeo GMIP1	45
4.1.1.	Síntese e Caracterização Primária do peptídeo GMIP1-NH ₂	46
4.1.2.	Síntese e Caracterização da estrutura primária do peptídeo GMIP1 utilizando a Resina Wang:	52
4.2.	Síntese dos peptídeos <i>stapled</i>	53
4.2.1.	Síntese e Caracterização da estrutura primária do Peptídeo GMIPw2 .	54
4.3.	Caracterização das estruturas secundárias dos peptídeos.....	61
4.3.1.	Análise estrutural por Dicroísmo Circular (DC).....	61
5.	Conclusões e perspectivas	64
6.	Referências:	66
	ANEXO A	75

Resumo

CABRAL, Wanessa Felix. Desenho e síntese de peptídeos miméticos ligantes da superfície nucleossomal. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2017

A cromatina é um complexo macromolecular formado por unidades repetitivas básicas, o nucleossomo. Este, por sua vez, é constituído por DNA e histonas. As Proteínas Ligantes de Nucleossomo (NBPs) são capazes de controlar a dinâmica de abertura e fechamento da cromatina e, dessa forma, regulam a expressão gênica e a manutenção do genoma. Acredita-se, com isso, que moléculas que se ligam à superfície nucleossomal possam ter profundo impacto na estrutura da cromatina. Uma classe de peptídeos, conhecida como *stapled*, é descrita por ter maior estabilidade que os peptídeos nativos frente à ação de proteases, bem como o aumento da sua penetrabilidade celular. Diante disso, esta pesquisa tem como objetivo o desenho e a síntese química de peptídeos miméticos ligantes de nucleossomo, e estabelecer a melhor metodologia de síntese em fase sólida no laboratório de pesquisa. Foram desenhados peptídeos *stapled*, baseados em estruturas atômicas e cristalográficas de NBPs, em especial a proteína RCC1 complexada ao nucleossomo, contendo uma restrição conformacional, um *crosslink* formado por hidrocarbonetos. Os peptídeos compostos por 19 aminoácidos foram sintetizados em fase sólida (SPPS) pela inserção de aminoácidos α,α -dissubstituídos. A reação de metátese (RCM) foi escolhida para a formação do macrociclo utilizando catalisadores de Grubbs contendo rutênio. Além disso, alguns desses peptídeos foram purificados com sucesso e analisados por dicroísmo circular.

Palavras-chave: Nucleossomo, peptídeos *stapled*, NBPs

Abstract

CABRAL, Wanessa Felix. Desenho e síntese de peptídeos miméticos ligantes da superfície nucleossomal. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2017

The chromatin is a macromolecular complex formed by basic repeating units, the nucleosome, which is composed of DNA and histones. Nucleosome Binding Proteins (NBPs) are able to control the opening and closing dynamics of chromatin, and thus regulate gene expression and genome maintenance. It is plausible to believe that molecules that bind to the nucleosomal surface can have a profound impact on the clinical outcome. A class of peptides known as stapled is described by increasing the stability of their native peptides to the action of proteases, as well as increasing their cellular penetrability. The present work aims at the design and chemical synthesis of nucleosome binding mimetic peptides, optimizing solid phase synthesis methodology in the research laboratory. Stapled peptides were designed based on atomic and crystallographic structures of NBPs, in particular protein RCC1 complexed to the nucleosome, containing a conformational constraint, a crosslink formed by hydrocarbons. Peptides composed of 19 amino acids were synthesized in solid phase (SPPS) by the insertion of α,α -disubstituted amino acids. The metathesis reaction (RCM) was chosen for macrocycle formation using ruthenium-containing Grubbs catalysts. In addition, some of these peptides were successfully purified and analyzed by circular dichroism.

Keywords: Nucleosome, stapled peptides, NBPs

Lista de Abreviações e Siglas

- ACN - Acetonitrila
- BAH - *Bromo-Associated Domain*
- CD - Circular Dichroism
- CENP-C - *Centromere Protein C*
- DCM - Diclorometano
- DIC - N,N'- diisopropilcarbodiimida
- DIPEA - diisopropiletilamina
- DMF - N,N-dimetilformamida
- DMSO - Dimetilsulfoxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EDT - Etanoditiol
- EM - Espectrometria de Massas
- eNBMs- *exogenous Nucleosome Binding Molecules*
- Fmoc - 9-fluorenilmetoxicarbonila
- GB-1 - Grubbs 1ª geração
- GHRH - *Growth Hormone–Releasing Hormone*
- GMIP1 - *Genetic Modified Inducible Peptide 1*
- GMIPw - *Genetic Modified Inducible Peptide wild*
- GMIPw0 - *Genetic Modified Inducible Peptide wild 0*
- GMIPw2 - *Genetic Modified Inducible Peptide wild 2*
- HATU - hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium3-oxido
- HCTU - hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium)
- HMGN2 - *High Mobilty Group Nucleosome Binding Protein 2*
- HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*
- IL-33 - Interleucina 33
- KCN - Cianeto de potássio
- KSHV - *Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus*
- LANA - *Latency-Associated Nuclear Antigen*
- m/z - razão entre a massa e a carga
- MALDI – *Matrix Assisted Laser Dessorption/Ionization*
- MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight*

Mdm2 - *Murine Doble Minute 2*
MS – *Mass Spectrometry*
NBMs – Moléculas Ligantes de Nucleossomo
NBPs - *Nucleosome Binding Proteins*
NCP – *Nucleosome Core Particle*
PDB - *Protein data bank*
PRC1 - *Polycomb Repressive Complex 1*
PTMs -Modificações Pós-Traducionais
RCC1 - *Regulator of Chromosome Condensation*
RCM- *Ring-closing Metathesis*
SAGA - *Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase*
SAHBs - *Stabilized alpha-helix of BLC-2 domains*
Sir3 - *Silent Information Regulator 3*
SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TFA - ácido trifluoroacético
TNF α – Fator de Necrose Tumoral alpha
Tr - tempo de retenção

Índice de Tabelas

Tabela 1: Massa molecular dos aminoácidos protegidos e a massa utilizada de cada aminoácido durante o acoplamento	41
Tabela 2: Dados de acompanhamento das sínteses do peptídeo GMIP1 e o GMIP1-NH ₂	46
Tabela 3: Dados de acompanhamento das sínteses do peptídeo GMIPw2.	54
Tabela 4: Dados para padronização das concentrações dos peptídeos GMIP1, GMIP-NH ₂ e GMIPw2: as absorvâncias medidas para os λ 205, 215 e 225 nm, os resultados k, T e C das equações 1, 2 e 3 e a concentração final que consiste na multiplicação de C pelo fator de diluição.	61
Tabela 5: Dados cálculo de porcentagem de α -helicidade (% α) dos peptídeos analisados.....	62

Índice de Figuras

Figura 1: Partícula Fundamental do Nucleossomo (NCP) (PDB: 1KX5).....	14
Figura 2: Octâmero de histonas por superfície eletrostática (vermelho, regiões negativas; azul, regiões positivas) mostrando a região mais negativa referente ao <i>patch ácido</i> (Adaptado de (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015)).....	15
Figura 3: A superfície de carga do nucleossomo. As regiões em vermelho têm densidade negativa e as em azul, positiva, mostrando as porções de interação entre as proteínas ligantes de nucleossomo (NBPs) com a superfície nucleossomal. Na figura, estão representadas as proteínas: LANA (PDB - 1ZLA); RCC1 (PDB - 3MVD); PRC1 (PDB - 4R8P); CENP-C (PDB - 4X23) e Sir3 (PDB - 3TU4) (Extraído de CABRAL; MACHADO; SANTOS, 2016).	18
Figura 4: Região de interação do LANA com o <i>patch ácido</i>. a) Imagem ampliada da Figura 2 (página 5) demonstrando apenas o peptídeo LANA (azul turquesa) ligado à região ácida (em vermelho) do NCP. b) Sequência primária do LANA (resíduos de aminoácidos 1-23) com destaque em vermelho para os resíduos descritos como sítios importantes de ligação.	19
Figura 5: Desenho do peptídeo GMIP1. a) Regiões da superfície nucleossomal que faz interações com as duas porções de RCC1. As histonas são mostradas por superfície de carga, em que o <i>patch ácido</i> se destaca como a região em vermelho mais intenso. A fita dupla de DNA está representada na cor laranja. As duas porções de RCC1 estão representadas na forma de <i>sticks</i> (carbonos em verde; oxigênios, vermelho e nitrogênio, azul) b) Sequência de resíduos de peptídeos do GMIP1: A porção 2 (vermelho) é referente aos resíduos de aminoácidos da proteína RCC1 que fazem interação com DNA nucleossomal e a porção 1 (em azul) àqueles que fazem ligação com o <i>patch ácido</i> . As porções foram unidas por 3 alaninas (<i>linker</i> – em preto) formando o peptídeo intulado GMIP.	22
Figura 6: Peptídeos miméticos. a) peptídeos - a troca da ligação peptídica por ligações de éster (vermelho); b) depsi-peptídeo - o reposicionamento da cadeia lateral do aminoácido do C α para o N α (azul); c) peptídeo stapled - ou a formação de um crosslink entre aminoácidos por meio de ligações covalentes (verde).	24
Figura 7: Desenho de Peptídeos Stapled. a) Aminoácidos modificados com cadeias laterais olefínicas utilizados na síntese de peptídeos <i>stapled</i> . b) Representação dos três tipos mais comuns de Peptídeos <i>stapled</i> . (Adaptado de KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011).	27
Figura 8: Síntese de Peptídeos Stapled em fase sólida usando a estratégia Fmoc. Na imagem, y equivale ao tipo de estereoisomeria do carbono α , R ou S; para hélices formadas entre os aminoácidos nas posições i,i+3 temos a combinação n=2, x=1 e y=R; para aminoácidos modificados nas posições i,i+4 a melhor combinação seria n=3, x=1 e y=S; já para i,i+7 temos combinação de n=6, x=4 e y=R. Podem ser feitos acoplamentos de aminoácidos naturais (Fmoc-AA-OH) ou aminoácidos modificados (Fmoc-S ₅ -OH), no caso, foi representado o aminoácido modificado com uma cadeia lateral olefínica de 5 carbonos e estereoisomeria S. (Adaptado de VERDINE; HILINSKI, 2012).....	28
Figura 9: Equilíbrio típico de uma reação de metátese de olefina. (Adaptado de GRUBBS, 2004). ..	30
Figura 10: Ciclo catalítico de Chauvin (extraído de GRUBBS, 2004)	30

Figura 11: Catalisadores mais utilizados em RCM de peptídeos. a) difenilalildieno)bis(triciclohexilfosfina)-diclororutênio; b) Grubbs 1ª Geração (GB-1); c) Grubbs 2ª Geração (GB-2); d) Hoveyda-Grubbs 1ª Geração (HG-1).	31
Figura 12: Esquema da RCM para formação de <i>crosslink</i> em peptídeos em que m e n variam conforme o tipo de peptídeos gerado por $i, i+3$; $i, i+4$ ou $i, i+7$ (Extraído de KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011).	32
Figura 13: Espectro de dicroísmo circular obtido para peptídeos estruturados. Espectro característico para estrutura randômica; espectro característico para folha β ; espectro característico para α -hélice.	33
Figura 14: Estrutura primária do peptídeo nativo GMIP1 e do peptídeo stapled GMIPw.	35
Figura 15: Estrutura primária dos peptídeos GMIP1, GMIPw2 e GMIPw0.	36
Figura 16: Suportes sólidos utilizados para a síntese dos peptídeos, (a) Resina Wang–Fmoc-Arg(Pbf)-OH e (b) Resina Rink Amida MHBA.	37
Figura 17: Mecanismo de reação da ninhidrina com o grupo amino livre de aminoácidos (teste de Kaiser).	38
Figura 18: Mecanismo de desproteção (Retirada do grupo protetor Fmoc).	39
Figura 19: Mecanismo de acoplamento utilizando HATU ou HCTU/DIPEA (Adaptado de BENOITON, 2006).	40
Figura 20: Mecanismo de acoplamento utilizando DIC/Oxyma (Adaptado de BENOITON, 2006).	41
Figura 21: Estrutura do peptídeo GMIP1 (1) na sua forma ácida (azul) e (2) na sua forma amidada (vermelho).	45
Figura 22: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo GMIP1-NH ₂ . A imagem à direita no canto superior da figura trata-se da ampliação da região de m/z 2040 a 2050, destacando a presença do íon de interesse ($[M+H]^+ = 2042,312$ Da).	47
Figura 23: Perfil cromatográfico da amostra bruta contendo o peptídeo GMIP1-NH ₂ . As Frações recolhidas e analisadas estão indicadas no cromatograma. O Peptídeo foi eluído em gradiente de acetonitrila + 1% (v/v) TFA, em coluna preparativa C18.	48
Figura 24: Os três pontos possíveis de clivagem na cadeia principal do peptídeo: $-a$, $-b$ e $-c$ quando a carga é mantida na porção N-terminal e $-x$, $-y$ e $-z$ quando a carga é mantida na parte C-terminal (Adaptado de ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984).	49
Figura 25: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor ($[M+H]^+ = 2042,344$ Da) do peptídeo GMIP1-NH ₂ .	50
Figura 26: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor ($[M+H]^+ = 1886,19$ Da) do peptídeo análogo ao GMIP1-NH ₂ sem o resíduo de arginina N-terminal.	51
Figura 27: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo GMIP1-OH. A imagem à direita da figura trata-se da ampliação da região de m/z 2042 a 2047 destacando a presença do íon de interesse ($[M+H]^+ = 2043,256$).	52
Figura 28: Análise estrutural das hélices dos peptídeos stapled: a) GMIPw e b) GMIPw2. Projeções das estruturas de wheels helicoidais de peptídeos simuladas pelo programa RZ lab (http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi)	53
Figura 29: Representação do peptídeo GMIPw2 ciclizado com a liberação de etileno (C ₂ H ₄).	55
Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra bruta contendo o peptídeo GMIPw2. A seta azul indica a fração que continha apenas o peptídeo de interesse. O Peptídeo foi eluído em gradiente de 5 a 95% de acetonitrila + 1% (v/v) TFA, em coluna preparativa C18.	56
Figura 31: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) da amostra bruta contendo o peptídeo GMIPw2 ($[M+H]^+ = 2150,365$ Da). No canto superior direito da imagem trata-se da ampliação da região de m/z 2148 a 2157 destacando a presença do íon de interesse.	58
Figura 32: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo GMIPw2. O íon de m/z 521,33 corresponde ao macrociclo formado entre os resíduos S ₅ -A-L-S-S ₅ .	59

Figura 33: Sequência de aminoácidos determinada para o GMIPw2 bem como os íons da série b encontrados no espectro. 60

Figura 34: Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos nativos, GMIP1 (em vermelho) e GMIP-NH₂ (em preto), e para o peptídeo stapled, GMIPw2 (em azul)..... 62

1. Introdução

1.1. Cromatina e Nucleossomo

A cromatina é um complexo macromolecular formado por unidades repetitivas básicas de nucleossomos. Estes, por sua vez, são compostos por cerca de 147 pares de bases de DNA que enovelam, com 1,7 voltas, um complexo proteico designado octâmero de histonas (dois dímeros de H2A e H2B e um tetrâmero de H3 e H4) (Figura 1). As histonas, proteínas de carga líquida positiva, interagem com o DNA, de carga negativa, constituindo uma estratégia ideal para o empacotamento do código genético dentro da célula (RICHMOND et al., 2003).

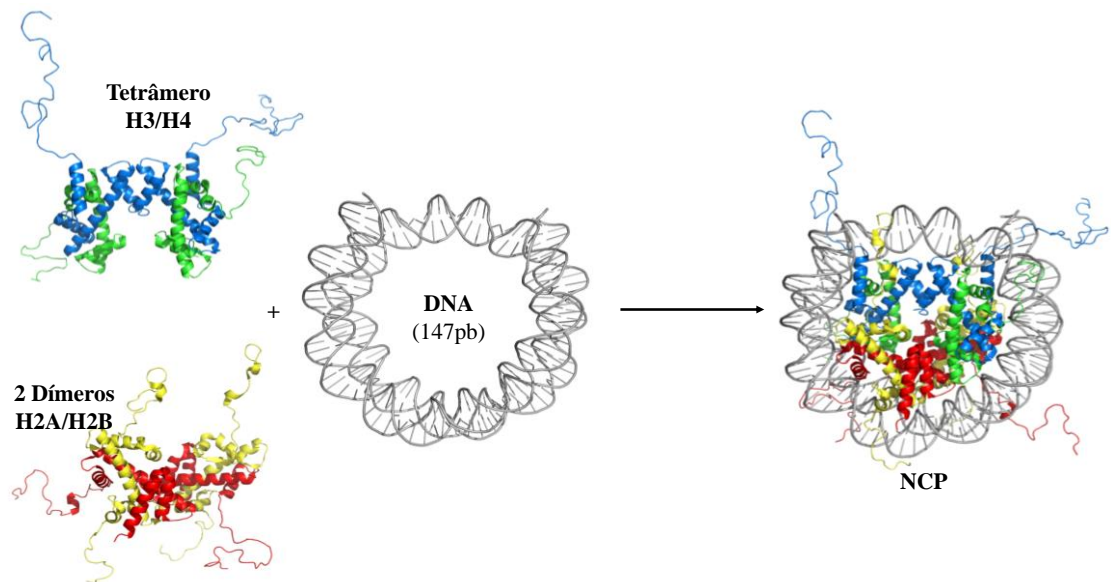


Figura 1: Partícula Fundamental do Nucleossomo (NCP) (PDB: 1KX5).

Na superfície do nucleossomo, existe uma região bem definida de carga negativa, conhecida como “*patch ácido*” formada pela presença de oito aminoácidos com cadeias laterais ácidas, seis pertencentes a H2A (E56, E61, E64, D90, E91 e E92) e dois a H2B (E102 e E110), além de um bolsão hidrofóbico com os resíduos Y50, V54 e Y57 pertencentes a H2A (Figura 2) (KALASHNIKOVA et al., 2013). O *patch ácido* é alvo de ligação de diversas proteínas com função remodeladora da cromatina, ainda com cauda da H4 de nucleossomos adjacentes (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015)

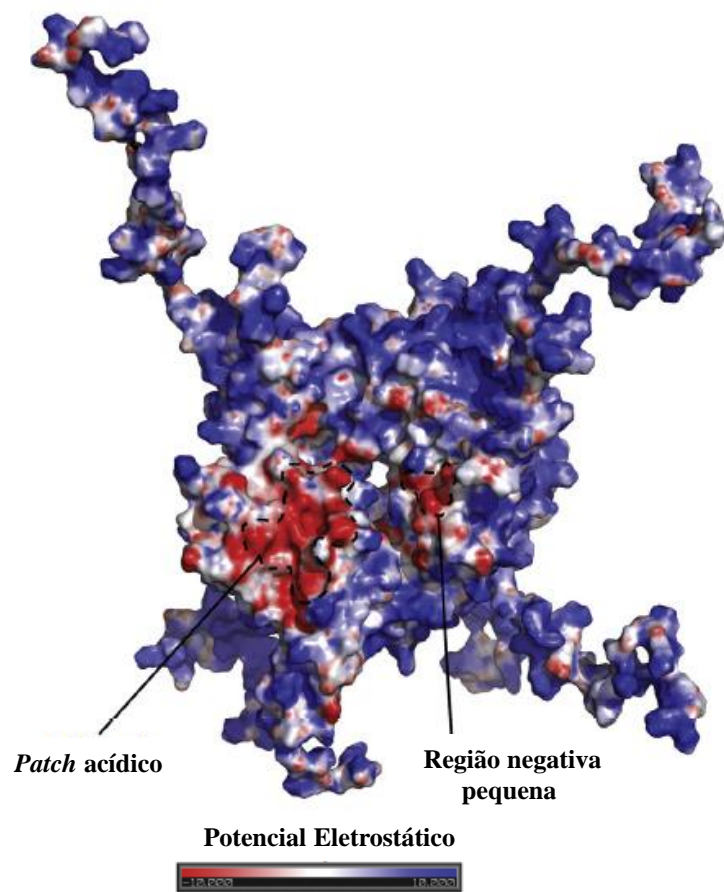


Figura 2: Octâmero de histonas por superfície eletrostática (vermelho, regiões negativas; azul, regiões positivas) mostrando a região mais negativa referente ao *patch ácido* (Adaptado de (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015)).

A cromatina é altamente dinâmica, apresentando profundas mudanças em sua arquitetura, dependendo do contexto celular. O estado relaxado da cromatina é geralmente observado quando há alta atividade transcricional ou durante a manutenção do genoma. Já o silenciamento gênico se dá no seu estado mais condensado (VOSS; HAGER, 2014). Dessa forma, é fato que a dinâmica de abertura e fechamento da estrutura da cromatina fornece uma estratégia para controlar o acesso de proteínas ao DNA. Com isso, é possível regular a expressão do gene e a manutenção do genoma. Isto é, mudanças na arquitetura da cromatina podem “ligar” ou “desligar” os genes envolvidos no crescimento, na diferenciação e na sobrevivência celular que, por sua vez, modulam processos de sinalização celular. No entanto, esta é uma visão simplista, visto que a estrutura da cromatina por si só não é suficiente para gerar modelos de expressão de genes preditivos (BARTMAN; BLOBEL, 2015).

O conhecimento acumulado como resultado dos estudos da cromatina deu origem ao desenvolvimento de drogas focadas nas enzimas que ditam alterações epigenéticas nas caudas das histonas, e que possuem grande impacto na estrutura da cromatina e na expressão gênica,

e, portanto, podem resultar em desordens celulares (IVANOV; BARRAGAN; INGELMAN-SUNDBERG, 2014). Esse conceito de modulação da arquitetura da cromatina para prevenir desordens celulares provou ser terapeuticamente eficaz (ARGUELLES et al., 2016). Em consequência, ao saber que as drogas que regulam indiretamente a dinâmica da cromatina podem orquestrar muitas vias de sinalização, é possível que moléculas que visam os nucleossomos tenham um profundo impacto sobre os resultados fenotípicos clínicos.

Dervan, Luger e Davey abriram o caminho para o desenvolvimento de pequenas moléculas focadas no nucleossomo como alvo terapêutico. Inicialmente, pequenos ligantes tiveram suas estruturas baseadas e desenhadas para alcançar unicamente sítios específicos de ligação característicos do DNA no nucleossomo (EDAYATHUMANGALAM et al., 2004). Posteriormente, demonstrou-se que compostos alquilantes intercalantes reconhecem sítios específicos de DNA quando ele está enrolado em torno das histonas (WU; DRÖGE; DAVEY, 2008). Será discutida, neste trabalho, a síntese de macromoléculas que tem como estratégia alcançar a superfície nucleossomal em sítios identificados pelas interações já descritas das proteínas ligantes de nucleossomo (*Nucleosome Binding Proteins* - NBPs) para modular a dinâmica da cromatina com uma proposta terapêutica. Crucialmente, nós focalizamos o desenvolvimento de moléculas mais complexas, peptídeos miméticos, que possuem potencial de se ligar à superfície nucleossomal.

1.2. Moduladores da arquitetura da Cromatina

Diversos fatores determinam o estado final da estrutura da cromatina. Entre esses fatores, interações da cromatina com íons Mg^{+2} , *linker* histonas (H1/H5), cauda *N*-terminal da histona H4 e proteínas ligantes de nucleossomos (NBPs) têm sido extensivamente investigados. Além disso, as modificações pós-traducionais (PTMs) das histonas também têm sido estudadas e têm papel fundamental na compactação da cromatina (NG; CHEUNG, 2015).

1.2.1. Íons de metais divalentes

Observações em experimentos *in vitro* têm demonstrado que o íon Mg^{+2} é essencial para o dobramento da cromatina (FINCH; KLUG, 1976). Juntamente com substâncias fisiológicas adicionais, como o cloreto de sódio (NaCl), o Mg^{+2} contribui para conduzir a cromatina para estruturas mais compactadas, como a fibra de cromatina de 30 nm. Esse efeito pode ser explicado pela neutralização da carga residual do DNA que facilita a atração entre nucleossomos e DNA-DNA (KOROLEV et al., 2010). Similarmente, os íons Mn^{+2} e Ca^{+2}

também interagem com o DNA nucleossomal, o que sugere alterações na arquitetura da cromatina também são definidos pela cooperação aperfeiçoada e concorrência entre as caudas das histonas e metais divalentes na interação com o DNA (TAN; DAVEY, 2011).

1.2.2. Linker histonas

As *linker* histonas representam a quinta classe de histonas. Elas não pertencem à partícula central do nucleossomo (NCP) e têm papel crucial no silenciamento gênico. Elas se ligam assimetricamente ao nucleossomo e à cromatina, permitindo que esta adote uma estrutura mais condensada, a fibra de cromatina de 30 nm (SONG et al., 2014).

1.2.3. Cauda da H4 e modificações pós-traducionais

O domínio *N*-terminal da histona H4 é bem caracterizado como o principal regulador da compactação da cromatina (DORIGO et al., 2003). Sabe-se que a sua ligação se dá por meio da interação com o *patch ácido*. Resultados de simulação dinâmica molecular e *docking* da cauda da H4 sobre o nucleossomo sugerem que os aminoácidos de 1 a 13 do seu domínio *N*-terminal não possuem forma definida, mas há a formação de estrutura de α -hélice para os resíduos 16 a 22 que se ligam à região acídica (YANG; ARYA, 2011).

Quando desacetilado, o resíduo de lisina H4K16 interage com o *patch* na superfície do nucleossomo adjacente, aproximando-os, o que favorece a compactação da fibra de cromatina. Em contraste, a acetilação desse resíduo confere carga negativa à cauda impedindo que o domínio se ligue às regiões acídicas na superfície nucleossomal (ROBINSON et al., 2008).

Portanto, as modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas também são fatores que podem interferir na modulação da arquitetura da cromatina e, conseqüentemente, na ligação de proteínas regulatórias (PRADEEPA et al., 2016).

1.2.4. Proteínas Ligantes de Nucleossomo (NBPs)

Sabe-se que a dinâmica da cromatina pode ser afetada pela presença de proteínas que se ligam ao nucleossomo, conhecidas como NBPs (*Nucleosome Binding Proteins*) (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015). As ações destas proteínas não são dependentes apenas do seu impacto sobre a superfície do nucleossomal, mas também na sua habilidade de recrutar proteínas com atividades enzimáticas, que por sua vez, podem ser capazes de modular a arquitetura da cromatina e regular a expressão gênica.

Atualmente, onze estruturas de complexos nucleossomo:NBP foram descritas: LANA (BARBERA et al., 2006), Interleucina- 33 (IL-33) (ROUSSEL et al., 2008), RCC1 (MAKDE et al., 2010), HMGN2 (KATO et al., 2011), Sir3 (ARMACHE et al., 2011)(ARMACHE et al., 2011), CENP-C (KATO et al., 2013a), PRC1 (MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014), SAGA (MORGAN et al., 2016), IE1 (QIANG LIN FANG, PING CHEN, MINGZHU WANG, JUNNAN FANG, NA YANG, GUOHONG LI, 2016), Snf 2 (LI et al., 2017) e a GAG (LESBATS et al., 2017). Na Figura 3, é possível observar as principais regiões de interação de cinco dessas estruturas com a superfície nucleossomal.

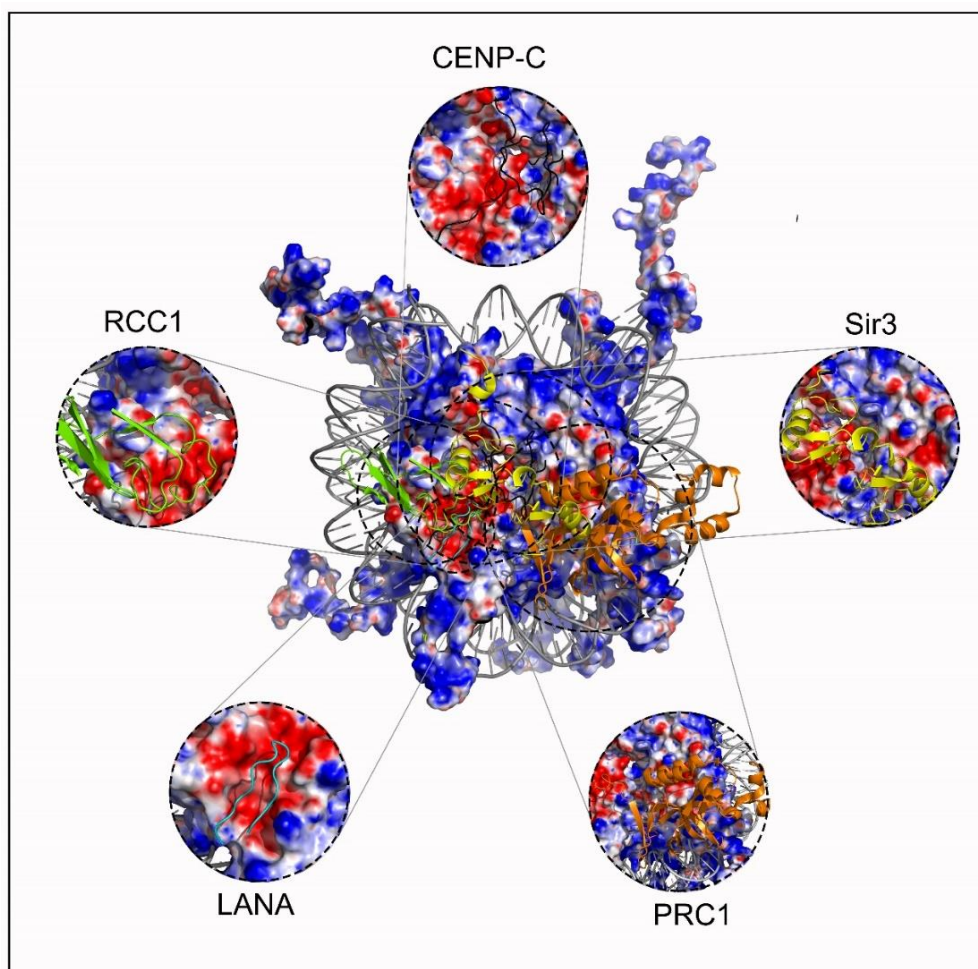


Figura 3: A superfície de carga do nucleossomo. As regiões em vermelho têm densidade negativa e as em azul, positiva, mostrando as porções de interação entre as proteínas ligantes de nucleossomo (NBPs) com a superfície nucleossomal. Na figura, estão representadas as proteínas: LANA (PDB - 1ZLA); RCC1 (PDB - 3MVD); PRC1 (PDB - 4R8P); CENP-C (PDB - 4X23) e Sir3 (PDB - 3TU4) (Extraído de CABRAL; MACHADO; SANTOS, 2016).

a) LANA:

Barbera e colaboradores (2006) obtiveram a estrutura cristalográfica dos 23 primeiros aminoácidos do domínio *N*-terminal do LANA (peptídeo do antígeno nuclear associado à

latência do Herpes vírus associado ao Sarcoma de Kaposi- KSHV) que se ligam ao nucleossomo. O LANA tem função essencial para a sobrevivência do Herpes vírus pois sua porção *N*-terminal se liga diretamente ao *patch* ácido e permite que os episossomos de KSHV se liguem aos cromossomos mitóticos (NICOLAS; PIOLOT; TRAMIER, 2001). O peptídeo caracterizado compreende os resíduos de aminoácidos de 1 a 23 e possui um formato de “grampo” com alta especificidade com a região ácida do nucleossomo (Fig. 4.a). Sua estrutura primária está descrita na Figura 4.b, destacando os resíduos descritos por suas interações com as histonas da NCP: os resíduos M6 e L8 que interagem no bolso hidrofóbico, R9 que forma tanto pontes salinas quanto ligações de hidrogênio com os resíduos E61, D90 e E92 de H2A e o resíduo S10 faz ligação de hidrogênio com o resíduo E64 de H2A e R7 que forma uma ponte salina com o resíduo E110 de H2B (KALASHNIKOVA et al., 2013).

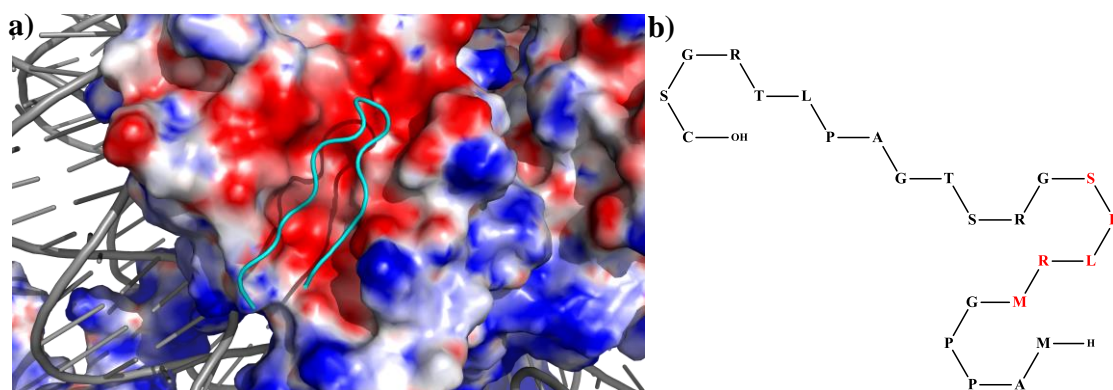


Figura 4: Região de interação do LANA com o *patch* ácido. a) Imagem ampliada da Figura 2 (página 5) demonstrando apenas o peptídeo LANA (azul turquesa) ligado à região ácida (em vermelho) do NCP. b) Sequência primária do LANA (resíduos de aminoácidos 1-23) com destaque em vermelho para os resíduos descritos como sítios importantes de ligação.

b) RCC1:

Makde e colaboradores (2010) obtiveram a estrutura cristalográfica da Proteína Reguladora de Condensação Cromossômica (RCC1) de drosófila ligada à partícula central do nucleossomo. A proteína RCC1 possui uma região denominada “*switchback loop*” que se liga à H2A/H2B e outra que se liga ao DNA nucleossomal, “*DNA-binding loop*”. A região “*switchback loop*” contém dois resíduos de arginina, R216 e R223, que são pontos de ancoramento essenciais para a ligação com o nucleossomo e podem ser comparadas com o resíduo de arginina, R9 do LANA descrito anteriormente, além dos resíduos de serina, S214 e S217, que fazem ligação de hidrogênio com os resíduos V45 e E64 da H2A (MCGINTY; TAN, 2015).

c) Sir3:

A estrutura atômica do domínio BAH (*Bromo-Associated Domain*) da região *N*-terminal da Proteína Silenciadora da Expressão Gênica Sir3 foi resolvida por Armache e colaboradores (ARMACHE et al., 2011). A interface entre nucleossomo e o domínio BAH é extensa, contendo 28 resíduos de aminoácidos envolvidos nessa interação. Esse domínio interage com diversas áreas do nucleossomo: caudas da H4, resíduos de H3 e H4 bem como com o *patch* ácido (KALASHNIKOVA et al., 2013). Os resíduos 17 a 37 estão envolvidos na ligação com a região ácida. Apesar de desorganizados, os resíduos R28, R29, R30, R32, K33 e R34 estão mais próximos ao *patch* fazendo ligações de hidrogênio e pontes salinas. O resíduo de arginina R32 de forma análoga à R9 do LANA interage com os resíduos E61, D90 e E92 da H2A.

d) CENP-C:

A ligação de CENP-C (*Centromere protein C*), um componente essencial presente nos centrômeros, foi demonstrada na estrutura cristalográfica do complexo CENP-C: NCP por Kato e colaboradores (2013). Essa proteína se liga a duas regiões do nucleossomo: resíduos da histona H3 e *patch* ácido. A CENP-A é uma variante da cromatina centromérica, no lugar da H3. Essa proteína forma um complexo com outras 16 proteínas em que uma delas é a CENP-C (VERDAASDONK; BLOOM, 2012). Estudos utilizando nucleossomo quimérico, que continha a H3 conectada à cauda C-terminal da CENP-A, confirmaram por RMN que a região dos resíduos 482 a 537 da porção central da CENP-C se dobra ao interagir com o nucleossomo (KATO et al., 2013b). Experimentos com a mutação de alguns resíduos levaram os pesquisadores a concluir que o resíduo R522 da CENP-C possui alta relevância na interação da proteína com os resíduos do *patch* ácido (H2A E61 e E64) (KATO et al., 2013b)

e) PRC1:

A PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*) é um membro da família de complexos do grupo *Polycomb* e desempenha um papel fundamental na repressão transcricional. A estrutura cristalográfica do complexo de proteínas, PRC1, revelou que elas fazem contato com todas as histonas que compõem a NCP, dando destaque ao domínio RING de Ring1B que se ancora por meio do resíduo de arginina (R98) ao *patch* ácido (MCGINTY; HENRICI; TAN, 2014).

Após mapear todas as interações entre cada NBP e a superfície do nucleossomo, o *patch* ácido se destaca como o principal alvo de interação, tornando-se um sítio altamente competitivo para NBPs (KALASHNIKOVA et al., 2013). Além do fato de que todas as estruturas publicadas até o presente momento, PRC-1, LANA, RCC1, Sir3 e CENP-C, apresentam um motivo de ancoramento de arginina que se liga a um bolso ácido composto pelos resíduos E61, D90 e E92 de H2A (MCGINTY; TAN, 2016)

Entretanto, é perceptível a presença de interações com outras regiões no nucleossomo que são utilizadas pelas NBPs para se ancorarem à cromatina, levando a estados específicos. Como observado em mapa publicado recentemente (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS, 2015), também podem ser encontradas regiões em torno do *patch* ácido que podem ser diretamente relacionadas com a condensação da cromatina. Assim, ressaltamos que a competição entre muitas proteínas pelo nucleossomo é específica e dita o resultado da transcrição. Para tanto, devem ser avaliadas a afinidade de ligação e a concentração dessas proteínas a fim de se determinar a estrutura local da cromatina.

Esses resultados ressaltam a importância de se compreender a maneira como essas NBPs se ligam à superfície nucleossomal em nível atômico e, assim, determinar o impacto dessas interações na sua estrutura e estabilidade.

1.3. Moléculas Exógenas ligantes de nucleossomo

Visando a superfície do nucleossomo como alvo, acredita-se no uso de moléculas exógenas ligantes de nucleossomo (*exogenous nucleosome binding molecules* – eNBMs) como um mecanismo valioso do ponto de vista farmacológico e do estudo de várias desordens celulares. Dessa forma, surge como estratégia encontrar novas entidades químicas que possam interagir se ligando às mesmas regiões de interação das NBPs descritas.

Beauchemin e colaboradores (2014) descreveram uma grande biblioteca de pequenas moléculas que se demonstraram decepcionantes em termos de competição pelo *patch* ácido, quando comparadas com o peptídeo LANA (BEAUCHEMIN et al., 2014). Assim, é plausível se considerar a necessidade de escolha de moléculas mais complexas a fim de deslocar o LANA do nucleossomo com maior eficiência. Peptídeos e peptídeos miméticos se destacam como alternativas de eNBMs mais eficazes.

Além do potencial reconhecimento molecular pela superfície nucleossomal como resultado da semelhança estrutural entre os peptídeos e as NBPs, a estratégia do seu uso possui outras vantagens em relação às pequenas moléculas. O uso de peptídeos como drogas terapêuticas tem se mostrado promissor devido a sua alta especificidade e eficácia (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015)

O grupo de pesquisa do Prof. Guilherme Santos, em 2012, desenhou racionalmente, *in silico*, o peptídeo GMIP1 (*Genetic Modified Inducible Peptide 1*). Foram realizados ensaios computacionais utilizando o programa KVFinder (LEITE, 2013) com as interações entre LANA, RCC1 e Sir3 e o nucleossomo.

As interações da proteína RCC1 apresentaram maior adequação à superfície nucleossomal. Dessa forma, o peptídeo GMIP1 foi baseado na estrutura cristalográfica desta proteína disponível no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*).

A RCC1 possui duas regiões distintas que interagem diretamente com o nucleossomo: uma que se liga ao DNA nucleossomal (porção 2 – Fig. 5a) e outra diretamente ao *patch* ácido (porção 1 – Fig. 5a). No GMIP1, essas duas porções foram unidas por um espaçador de 3 alaninas com a finalidade de fornecer certa flexibilidade ao peptídeo (Figura 5).

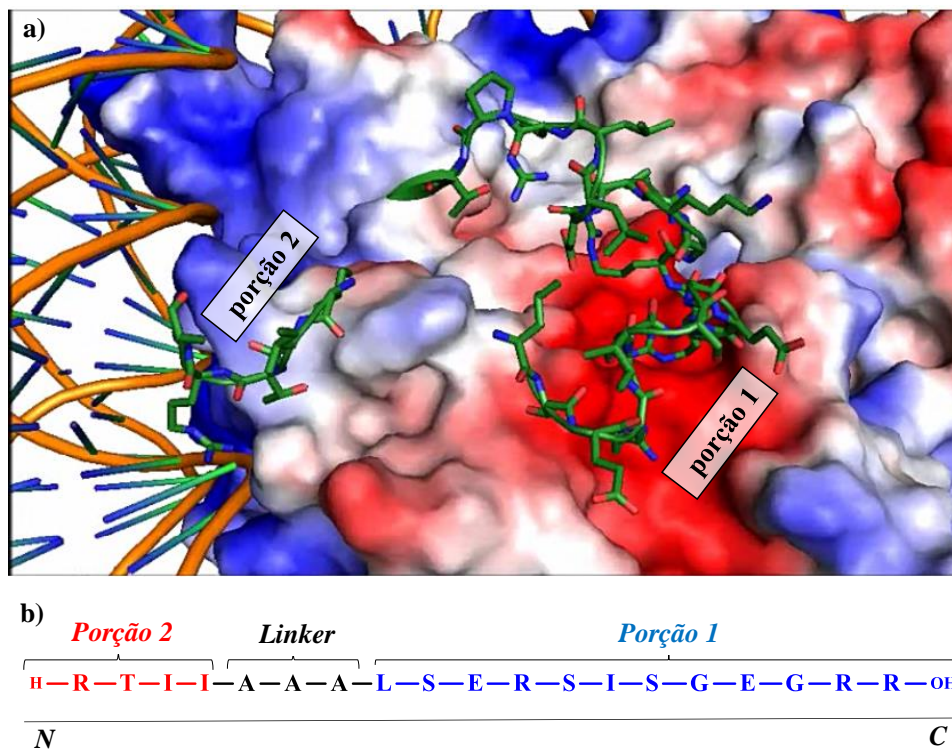


Figura 5: Desenho do peptídeo GMIP1. a) Regiões da superfície nucleossomal que fazem interações com as duas porções de RCC1. As histonas são mostradas por superfície de carga, em que o *patch* ácido se destaca como a região em vermelho mais intenso. A fita dupla de DNA está representada na cor laranja. As duas porções de RCC1 estão representadas na forma de *sticks* (carbonos em verde; oxigênios, vermelho e nitrogênio, azul) b) Estrutura primária do peptídeo GMIP1: A porção 2 (em vermelho) é referente aos resíduos de aminoácidos da proteína RCC1 que fazem interação com DNA nucleossomal e a porção 1 (em azul) àqueles que fazem ligação com o *patch* ácido. As porções foram unidas por 3 alaninas (*linker* – em preto).

O grupo realizou ensaios de ligação entre GMIP1 e mononucleossomos reconstituídos *in vitro*, ensaios de deslocamento térmico (*thermal shift*), Microscopia de Fluorescência Confocal, ensaios de viabilidade celular e a ação desse peptídeo sobre a expressão do gene TNF α (fator de necrose tumoral alfa, envolvido da cascata inflamatória) (SILVA, 2017). Observou-se que o GMIP1 apresentou efeitos significativos sobre as fibras de cromatina e

nucleossomos reconstituídos *in vitro*. Além de que possui forte ação inibitória da expressão de TNF α e na viabilidade celular.

Os desafios encontrados na terapia baseada em peptídeos são: a sua baixa penetrabilidade celular, proteólise e agregação celular. A substituição de alguns aminoácidos do peptídeo proposto por aminoácidos não-naturais ou a inserção de *crosslink*, ou seja, formação de ligações covalentes entre as cadeias laterais aminoácidos próximos; são abordagens que têm sido utilizadas para contornar esses problemas, produzindo moléculas chamadas de peptídeos miméticos (GUARNA; TRABOCCHI, 2014).

1.3.1. Peptídeos miméticos

O uso de peptídeos como agentes terapêuticos é limitado devido à sua baixa estabilidade metabólica no trato gastrointestinal, baixa absorção após a ingestão oral, baixa difusão nos tecidos orgânicos, rápida excreção pelo fígado e rins e efeitos indesejados devido à interação desses peptídeos flexíveis com diversos outros receptores (GUARNA; TRABOCCHI, 2014).

Os peptídeos miméticos são compostos que possuem características estruturais similares ao peptídeo que lhes deu origem, mas que possuem modificações específicas de tal modo que podem aumentar a afinidade com enzimas ou com os respectivos receptores, ou seja, podem aumentar a especificidade e a seletividade quando comparados aos peptídeos nativos.

No desenvolvimento desses compostos, é possível alterar um ou mais aminoácidos, sem afetar a sua atividade biológica, com o intuito de estabilizar a molécula em relação aos processos metabólicos que acontecem *in vivo*. Diante disso, fazem-se modificações tanto na cadeia principal quanto nas cadeias laterais dos aminoácidos, seja pela troca por aminoácidos *D*-variantes, C_{α} -alquilados, C_{β} -alquilados ou N_{α} -alquilados. O desenvolvimento de peptídeos miméticos a partir de peptídeos bioativos tem como objetivo, também, reduzir a flexibilidade conformacional a fim de melhorar a sua seletividade e biodisponibilidade (GUARNA; TRABOCCHI, 2014).

As abordagens para produzir peptídeos miméticos dependem do tipo de aminoácidos não-naturais utilizados durante a síntese do peptídeo. Como, por exemplo, o acoplamento de aminoácidos ou de pequenos peptídeos por reações multicomponentes para se obter peptídeos e depsipeptídeos (HENDRICKSON; CRÉCY-LAGARD; SCHIMMEL, 2004).

As reações multicomponentes mais importantes são as de Passerini e Ugi. A reação de Passerini produz a classe de peptídeos miméticos chamados depsipeptídeos, que possui pelo

menos uma ligação peptídica substituída por uma ligação éster (Fig. 6a). Já no caso da reação de Ugi, há a formação de peptídeos, uma classe de peptídeos miméticos em que pelo menos um aminoácido natural é substituído por um isômero que tem a cadeia lateral reposicionada do $C\alpha$ para o $N\alpha$ (Fig. 6b) (DÖMLING; WANG; WANG, 2012).

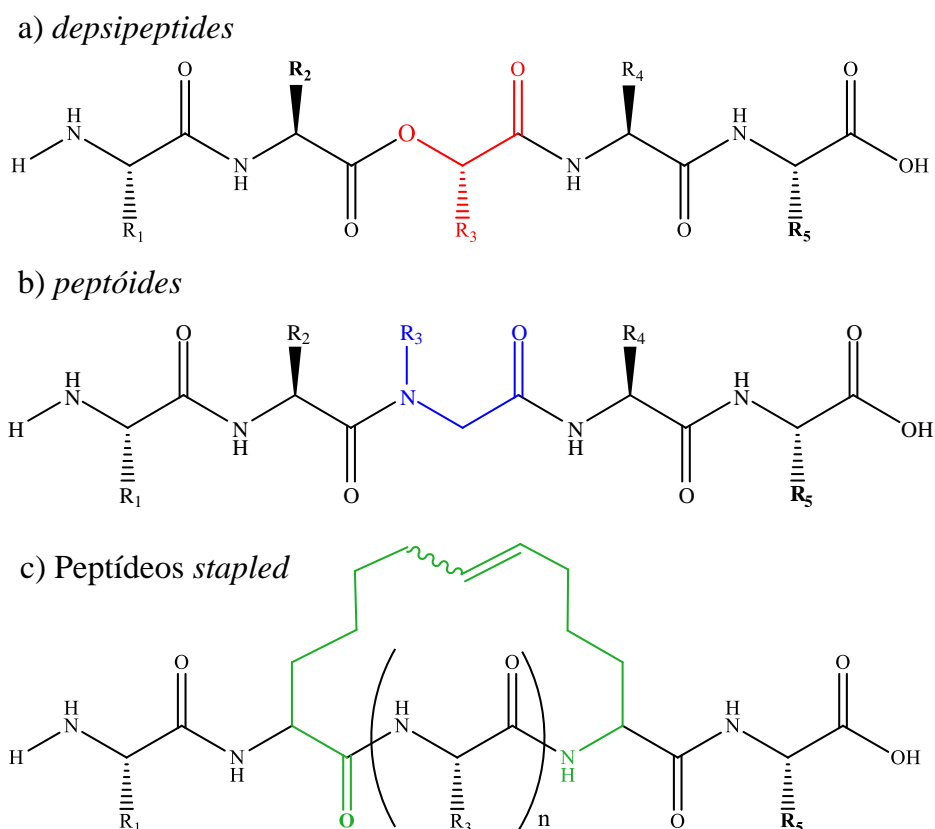


Figura 6: Peptídeos miméticos. a) peptídes - a troca da ligação peptídica por ligações de éster (vermelho); b) depsipeptídeo - o reposicionamento da cadeia lateral do aminoácido do $C\alpha$ para o $N\alpha$ (azul); c) peptídeo *stapled* - ou a formação de um *crosslink* entre aminoácidos por meio de ligações covalentes (verde).

Diversas abordagens podem ser utilizadas para se estabilizar ou mimetizar estruturas secundárias de proteínas, principalmente a α -hélice. A inserção de um *crosslink* (Fig. 6c) entre aminoácidos espacialmente próximos também é uma estratégia importante que evita a ação das peptidases e das proteases, que atuam na quebra das estruturas secundárias e terciárias de peptídeos.

A volta de uma α -hélice apresenta cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos. As estratégias clássicas de estabilização da conformação de α -hélices em peptídeos inserem ligações covalentes entre as cadeias laterais dos resíduos localizados nas posições i , $i+4$ e $i+7$. Diversos são os tipos de *links* utilizados, incluindo as lactamas (MONTALBETTI et al., 2005), lactonas

(PARENTY; MOREAU; CAMPAGNE, 2006), pontes de dissulfeto (DIDERICH et al., 2016) e cadeia de hidrocarbonetos (SCHAFMEISTER; PO; VERDINE, 2000).

Os *crosslinks* formados por hidrocarbonetos têm sido mais utilizados pelo fato de serem considerados mais estáveis e fornecer maior restrição quando comparados com as amidas ou pontes dissulfeto. De fato, as hélices estabilizadas por um “grampo” formado por carbono e hidrogênio tem se mostrado mais efetivas no aumento da penetrabilidade celular (HENCHEY; JOCHIM; ARORA, 2008)

1.3.2. Peptídeos *Stapled*

Com o interesse terapêutico em moléculas que apresentem o mesmo reconhecimento molecular que proteínas e a alta penetrabilidade de pequenas moléculas, o uso de peptídeos *stapled* (*hydrocarbon-stapled α -helical peptides*) é visto com uma das melhores estratégias utilizadas até o momento. Esses peptídeos constituem uma nova classe de moléculas sintéticas em que as estruturas secundárias de peptídeos são estabilizadas pela formação de um anel de hidrocarbonetos (*crosslink*).

A maioria dos problemas encontrados no uso de peptídeos é justificada pela sua instabilidade conformacional, que expõe as ligações peptídicas à ação das peptidases e diminui sua penetrabilidade celular (BIRD et al., 2016).

Em 1998, Grubbs e colaboradores demonstraram a estabilização da estrutura secundária de peptídeos sintéticos a partir da formação de um *crosslink* entre resíduos de *O*-alilserina por meio da reação de metátese de olefina para fechamento de anel catalisada por rutênio (*ruthenium-catalyzed ring-closing metathesis* – RCM) (BLACKWELL; GRUBBS, 1998; BLACKWELL et al., 2001).

Seguindo esses estudos, Verdine e colaboradores (2000) publicaram o primeiro peptídeo sintético com a sua α -hélice estabilizada por um *crosslink* composto apenas por carbono e hidrogênio. O grupo utilizou uma série de aminoácidos não naturais α,α -dissubstituídos com cadeias de olefinas com tamanhos e estereoquímica diferentes a fim de verificar qual a melhor metodologia para fechamento do anéis com uma ou duas α -hélices por meio de RCM (SCHAFMEISTER; PO; VERDINE, 2000). Essa estrutura formada por um *link* de ligação covalente entre duas entidades diferentes foi intitulada como “*stapled peptides*” devido à comparação da formação de uma espécie de “grampo” na molécula de peptídeo.

Korsmeyer, Verdine e Walensky sintetizaram os peptídeos *stapled* chamados de “*stabilized alpha-helix of BLC-2 domains*” (SAHBs) baseados no segmento de α -hélice do

domínio anfipático BH3, presente na família das proteínas BCL-2 e responsáveis pela regulação da apoptose celular (WALENSKY et al., 2004). Com isso, demonstraram o aumento da helicidade, resistência proteolítica e permeabilidade celular.

Recentemente (2013), a Aileron Therapeutics, Inc., publicou os detalhes do primeiro teste da fase I de triagem clínica com um peptídeo *stapled*, o ALRN-5281, um hormônio de liberação de hormônio de crescimento de ação prolongada (GHRH) agonista para o tratamento de doenças endócrinas órfãs. A empresa também publicou os dados pré-clínicos de outro peptídeo *stapled*, o ATSP-7041,173 que se iniciou em 2014. ATSP-7041,173 é o mais potente e seletivo dos inibidores de MDM2 e MDMX (CHANG et al., 2013).

1.3.3. Desenho de Peptídeos Stapled

Nessa estratégia de estabilização por RCM, devem ser considerados diversos fatores como: a estrutura primária do peptídeo nativo, se possui ou não a tendência de formação de α -hélice; a distância e a estereoisomeria (R, S) entre os $C\alpha$ dos aminoácidos modificados integrantes da “ponte de hidrocarbonetos”; o tamanho de suas cadeias laterais e, conseqüentemente, o tamanho do macrociclo formado (JACOBSEN; KLAVENESS; RONGVED, 2010).

A inserção dos crosslink pode ser feita em qualquer posição no peptídeo. Os componentes principais são os aminoácidos α -metilados com cadeias laterais olefínicas de diferentes tamanhos e estereoquímica, R ou S (Fig. 4.a). Esses aminoácidos modificados podem ser incorporados aos peptídeos, um na posição i e o outro a uma distância $i+3$, $i+4$ ou $i+7$ com a posterior reação de RCM para a estabilização de uma e duas voltas de α -hélice, respectivamente (Fig. 4.b).

A nomenclatura $R_{i,i+4}S(8)$ se refere a um peptídeo com um aminoácido modificado do tipo R e outro S posicionados em “ i ” e “ $i+4$ ”, respectivamente, e um *crosslink* formado por 8 átomos de carbonos (SCHAFMEISTER; PO; VERDINE, 2000; KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011).

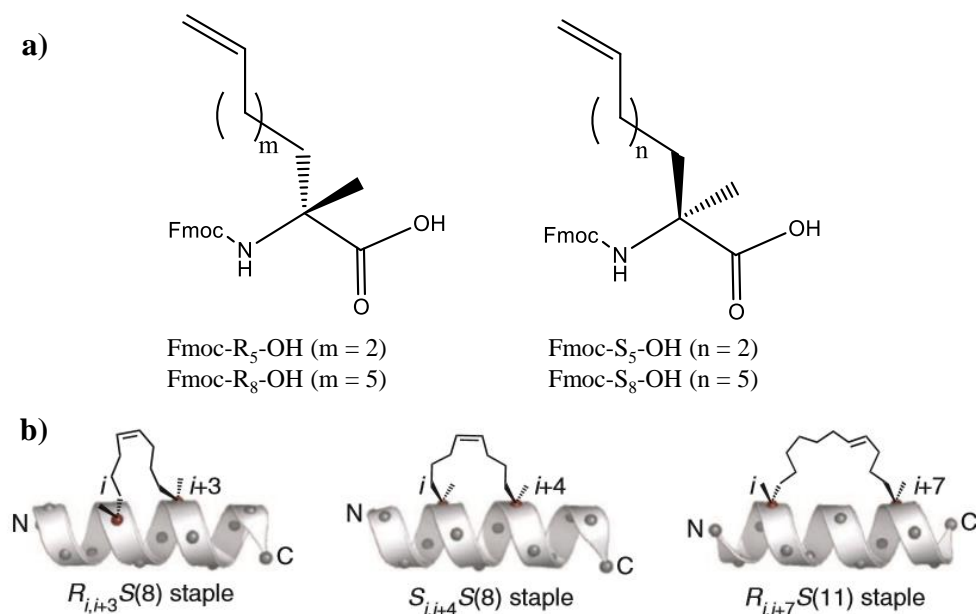


Figura 7: Desenho de Peptídeos Stapled. a) Aminoácidos modificados com cadeias laterais olefínicas utilizados na síntese de peptídeos *stapled*. b) Representação dos três tipos mais comuns de Peptídeos *stapled*. (Adaptado de KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011).

Verdine e colaboradores demonstraram que para a formação de um *crosslink* com 8 átomos de carbono os dois aminoácidos modificados do tipo S_5 (*(S)*- α -metil, α -pentenilglicina) devem estar nas posições $i, i+4$ (SCHAFMEISTER; PO; VERDINE, 2000). Este sistema tem se demonstrado mais eficiente em termos de formação do anel e estabilidade da hélice quando comparado aos demais (PHAM; YOO; KIM, 2013).

Quando o peptídeo é pequeno, um *crosslink* é suficiente para estabelecer uma restrição em toda a estrutura. Até o presente momento, foram descritas duas estratégias de inserção de dois *crosslinks* na mesma molécula: por meio dos *stapleds* (“grampos”) (BIRD et al., 2010) ou utilizando a técnica dos peptídeos *stitched* (“costurados”) (HILINSKI et al., 2014).

1.4. Síntese em fase sólida dos Peptídeos “Stapled”

A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) foi descrita pela primeira vez por Merrifield em 1963. O método é utilizado até hoje para reproduzir peptídeos e proteínas sintéticos em laboratório, bem como na síntese de peptídeos miméticos, devido ao fato de a SPFS permitir a incorporação de aminoácidos não naturais e também a realização de modificações na cadeia principal e nas cadeias laterais de peptídeos.

A SPFS é realizada utilizando um suporte sólido polimérico insolúvel, tanto em solventes orgânicos, quanto em solução aquosa, que serve de base para a construção das cadeias

peptídicas com a vantagem da separação de intermediários de reação e retirada de solventes por filtração simples.

A síntese, representada na Figura 8, é caracterizada por ciclos de desproteção do grupo amino e acoplamentos (formação de ligações peptídicas).

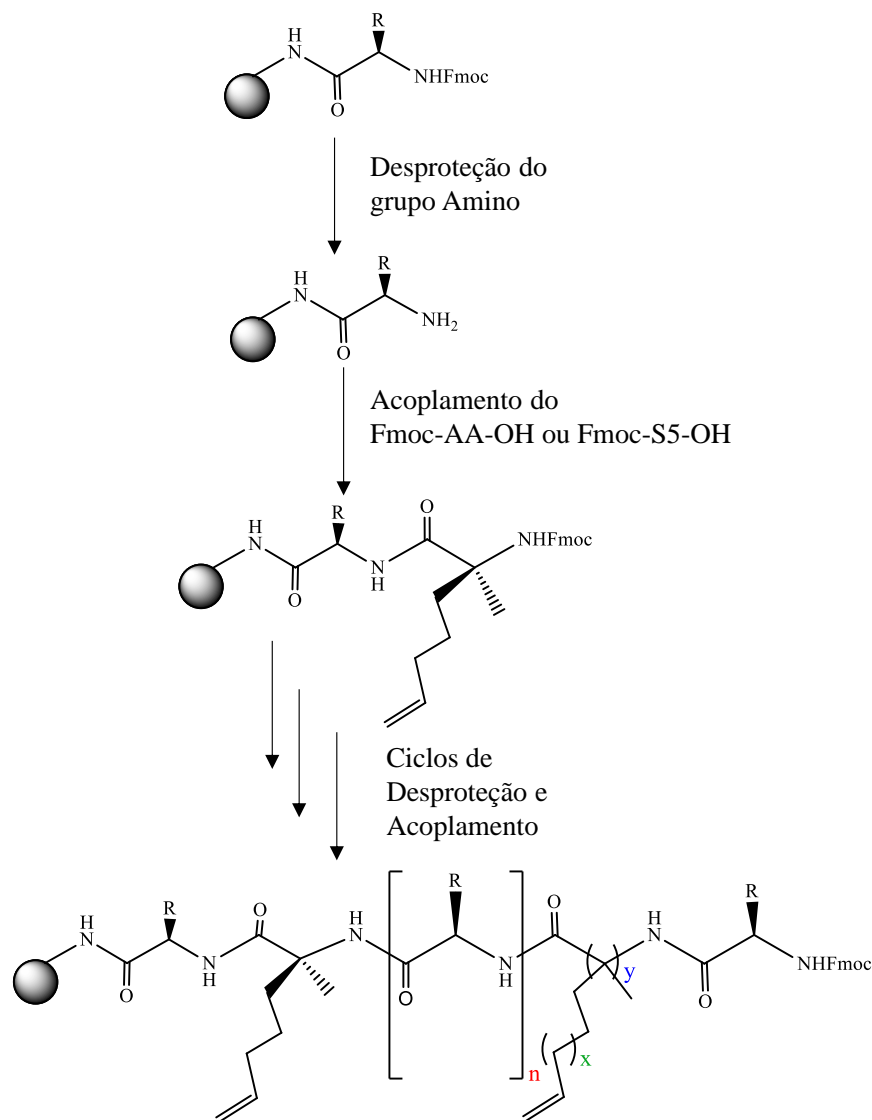


Figura 8: Síntese de Peptídeos Stapled em fase sólida usando a estratégia Fmoc. Na imagem, y equivale ao tipo de estereoisomeria do carbono α , R ou S; para hélices formadas entre os aminoácidos nas posições $i, i+3$ temos a combinação $n=2$, $x=1$ e $y=R$; para aminoácidos modificados nas posições $i, i+4$ a melhor combinação seria $n=3$, $x=1$ e $y=S$; já para $i, i+7$ temos combinação de $n=6$, $x=4$ e $y=R$. Podem ser feitos acoplamentos de aminoácidos naturais (Fmoc-AA-OH) ou aminoácidos modificados (Fmoc-S₅-OH), no caso, foi representado o aminoácido modificado com uma cadeia lateral olefínica de 5 carbonos e estereoisomeria S. (Adaptado de VERDINE; HILINSKI, 2012).

O primeiro aminoácido é acoplado e, então, desprotegido, gerando um novo grupo amino N terminal livre que será alvo de acoplamento para o próximo aminoácido. Todos os

aminoácidos empregados na síntese que possuem cadeias laterais reativas são protegidas garantindo o sentido correto de formação da cadeia polipeptídica. Os acoplamentos e as desproteções do grupo amino são repetidos, alternadamente, até que a obtenção do peptídeo completo. O peptídeo é ligado à fase sólida por meio do seu grupo carboxi e permanece covalentemente ligado ao suporte polimérico durante toda a síntese. (CHAN; WHITE, 2000).

É importante ressaltar que existem diversas complicações durante a síntese dos peptídeos *stapled* que podem acarretar num baixo rendimento na obtenção da sua estrutura primária completa. Para os grupos amino dos aminoácidos não-naturais bastante impedidos, são necessários tempos maiores de reação de desproteção e de acoplamento, bem como, a repetição dos acoplamentos com novas soluções de reagentes. Especialmente, quando esses aminoácidos são acoplados após resíduos com cadeias laterais volumosas como a arginina, valina, isoleucina e treonina (WALENSKY; BIRD, 2014).

A agregação da cadeia polipeptídica sobre a resina diminui a acessibilidade aos grupos *N*-terminais. Isso geralmente acontece com peptídeos que têm a tendência de formar estrutura de folha- β , devido a interações hidrofóbicas entre grupos protetores de cadeias laterais diferentes (WALENSKY; BIRD, 2014). Existem diversas maneiras de diminuir a agregação: utilizar uma resina com menor grau de substituição, diminuir a solvatação das moléculas, incorporar aminoácidos geradores de α -hélice em posições estratégicas ou substituir a pseudoserina (dipeptídeo de Ser e Thr) por X-Ser e X-Thr para produzir uma torção que impede a formação de folhas- β (BENOITON, 2006).

Com a sequência completa, é então realizada a reação de metátese de olefina para fechamento do anel (RCM) e estabilização da estrutura secundária do peptídeo. Na etapa final, o peptídeo *stapled* é liberado de seu suporte sólido, e os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos. Geralmente, a resina e os grupos protetores das cadeias laterais são escolhidos de forma que ambos sejam removidos sob as mesmas condições de clivagem.

1.5. Fechamento de anel por metátese de olefina (RCM)

A metátese de olefina consiste na reação de duas olefinas terminais que reagem na presença de um catalisador para formar uma nova olefina interna com a liberação de gás etileno, conforme Figura 9.

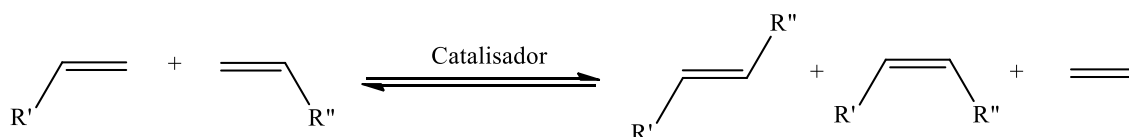


Figura 9: Equilíbrio típico de uma reação de metátese de olefina. (Adaptado de GRUBBS, 2004).

A metátese de olefina é considerada uma das mais importantes reações de formação de ligações carbono-carbono na síntese orgânica e é catalisada por um complexo de metal de transição ligado a um carbeno. A síntese possui alta atividade, estabilidade térmica, reversibilidade e excelente compatibilidade do grupo funcional dos catalisadores utilizados. Essa reação é controlada termodinamicamente pela diminuição da tensão do anel formado com liberação de uma molécula volátil como produto (etileno) (GRUBBS, 2004b).

Chauvin e colaboradores propuseram um mecanismo da RCM que envolve a formação da espécie metal-carbeno (Fig. 5-III) o intermediário principal, com a posterior cicloadição intramolecular [2+2] do composto III com a olefina distal, formando o intermediário metalociclobutano (Fig. 5-IV). E então, a reação retro [2+2] para formação do produto final ciclizado. Este mecanismo foi posteriormente comprovado experimentalmente.

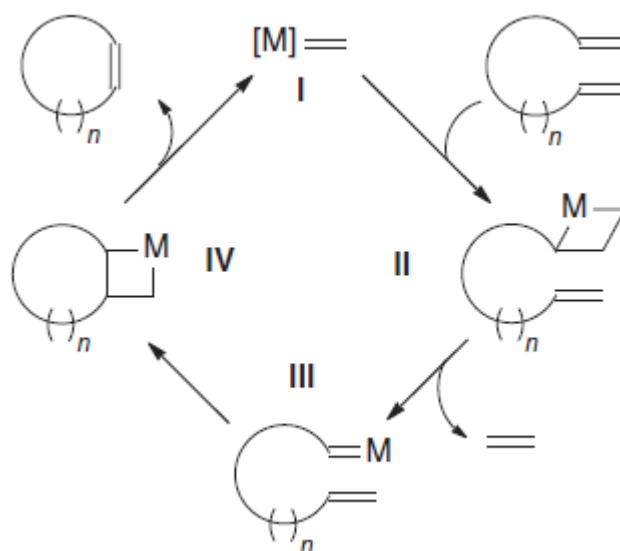


Figura 10: Ciclo catalítico de Chauvin (extraído de GRUBBS, 2004)

Os catalisadores normalmente utilizados para a metátese são do tipo $L_2X_2Ru=CHR$ e podem ser divididos em duas classes, dependendo da natureza do ligante doador de elétrons—L. No catalisador de Grubbs 1ª geração, um dos ligantes é um grupo fosfina; para os catalisadores de Grubbs 2ª geração, um dos ligantes é um carbeno *N*-heterocíclico.

Os catalisadores mais utilizados em metátese de olefina em peptídeos estão representados na Figura 11. O primeiro catalisador utilizado por Grubbs (1994) em metátese de olefina em peptídeos modificados foi o (difenilalidieno)bis(triciclohexilfosfina)-diclororutênio (Fig. 11a). Depois que os catalisadores de Grubbs de 1ª (Fig. 11b) e de 2ª geração (Fig. 11c) passaram a ser utilizados, este entrou em desuso. O catalisador Hoveyda-Grubbs 2ª geração (Fig. 11d) apresenta ótimos rendimentos na ciclização de β3-peptídeos 3₁₄-helical (BERGMAN et al., 2009).

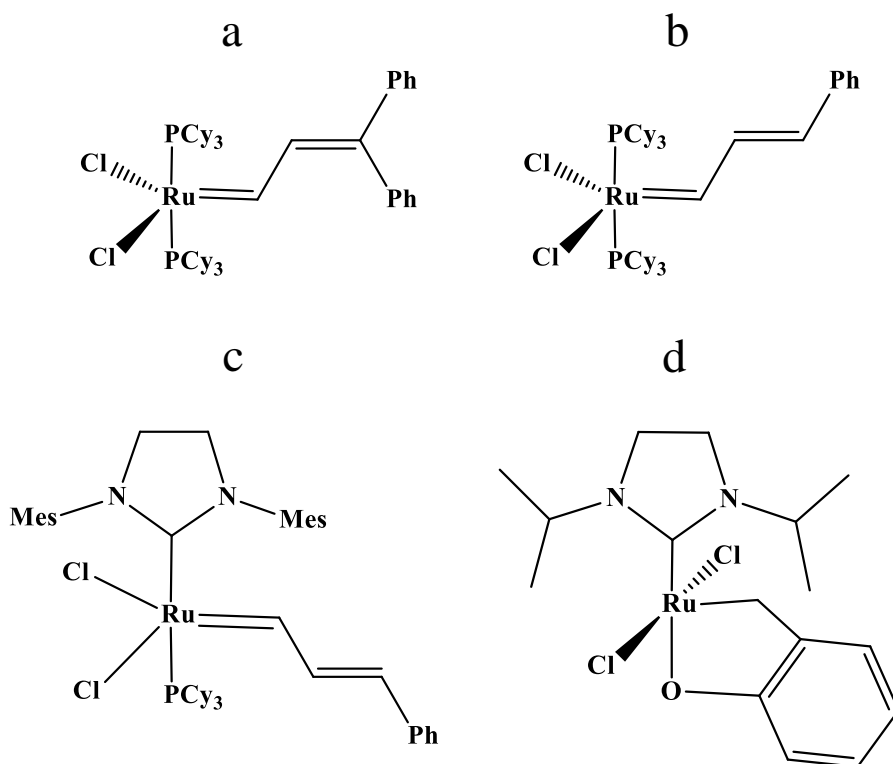


Figura 11: Catalisadores mais utilizados em RCM de peptídeos. a) (difenilalidieno)bis(triciclohexilfosfina)-diclororutênio; b) Grubbs 1ª Geração (GB-1); c) Grubbs 2ª Geração (GB-2); d) Hoveyda-Grubbs 1ª Geração (HG-1).

Inicialmente, as reações de RCM eram realizadas com o peptídeo em solução (MILLER; GRUBBS, 1995). Mais recentemente, a reação passou a ser realizada com o peptídeo em fase sólida, ou seja, antes de clivá-lo da resina. A RCM em fase sólida permite a obtenção do peptídeo bruto com menores impurezas devido à facilidade de se retirar os subprodutos e solventes da reação. Na Figura 12, está representado um esquema da reação de metátese de olefina realizada em peptídeos ainda ligados ao suporte sólido (resina).

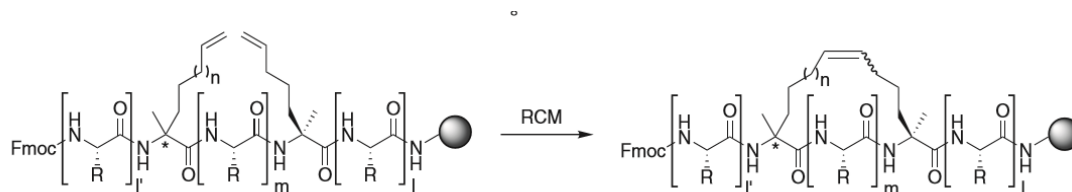


Figura 12: Esquema da RCM para formação de *crosslink* em peptídeos em que m e n variam conforme o tipo de peptídeos gerado por $i, i+3$; $i, i+4$ ou $i, i+7$ (Extraído de KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011).

Uma das dificuldades encontradas no uso de catalisadores de Grubbs é a contaminação dos peptídeos sintetizados com pequenas quantidades de rutênio, mesmo após a purificação. A presença do metal interfere em estudos biológicos destas moléculas. Dessa forma, uma alternativa é lavar a resina-peptídeo com 50 equivalentes de DMSO, após a reação de RCM, para diminuir ao máximo a quantidade de rutênio que permanece ligado ao peptídeo (STYMIEST et al., 2003).

1.6. Dicroísmo Circular:

A partir da análise de dicroísmo circular (DC), é possível verificar as preferências conformais de macromoléculas. A espectroscopia de DC se baseia na formação de luz plano polarizada, resultado do somatório de duas componentes circularmente polarizadas de mesma magnitude, formando um plano de luz que gira em sentidos opostos, horário (E_R) e anti-horário (E_L). Se essas duas componentes, ao atravessarem a amostra, são absorvidas com a mesma intensidade, a radiação linearmente é regenerada à original. Caso E_R e E_L sejam absorvidas em extensões diferentes, a luz passa a apresentar entre as amplitudes de suas componentes circulares, uma diferença de fase, resultando em uma luz elipticamente polarizada (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Os espectrômetros de dicroísmo circular medem as diferenças de absorção dos componentes circulares da luz polarizada linearmente por grupos opticamente ativos em função da variação do comprimento de onda. Nos peptídeos, os grupos cromóforos são caracterizados pela ligação peptídica e quando há a presença de resíduos de aminoácidos com anéis aromáticos. Como nos peptídeos esse efeito de DC é pequeno, se faz necessária a padronização da concentração da amostra de forma que se obtenha resultados significativos.

Cada tipo de estrutura secundária, α -hélice, folha β e randômica, tem um padrão bem definido e pode ser visualizado na Figura 13. A ligação peptídica de peptídeos e proteínas absorve na região próximo a 240 nm. Nessa região, existem duas transições notáveis: a primeira

transição é fraca e ampla ($n \rightarrow \pi^*$) com o máximo de absorção em torno de 220 nm, já a segunda transição é mais intensa ($\pi \rightarrow \pi^*$) com máximo de absorção em torno de 190 nm.

Uma estrutura randômica geralmente apresenta um sinal de CD quase horizontal acima de 210 nm e um com um valor mínimo entre 190 nm a 200 nm. As α -hélices mostram valores mínimos em 222 nm e 208 nm e um máximo próximo de 190 nm e as folhas β possuem um valor mínimo de cerca de 215 nm e um máximo entre 190 nm a 200 nm.

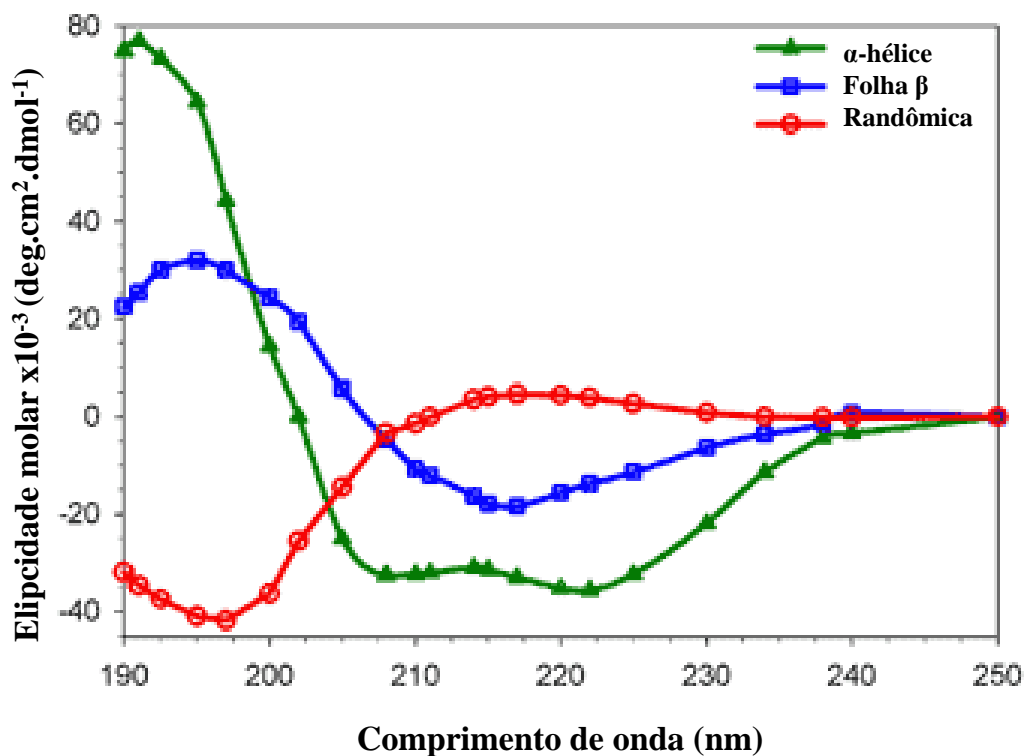


Figura 13: Espectro de dicroísmo circular obtido para peptídeos estruturados. Espectro característico para estrutura randômica; espectro característico para folha β ; espectro característico para α -hélice.

2. Objetivo Geral:

O objetivo geral desse trabalho é desenhar e sintetizar peptídeos miméticos ligantes da superfície nucleossomal.

Objetivos Específicos:

- Desenho racional dos peptídeos e peptídeos miméticos;
- Estabelecer a metodologia de síntese de peptídeos e peptídeos *stapled* no Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas;
- Sintetizar peptídeos miméticos ligantes de nucleossomo, que possibilitem a modulação da estrutura da cromatina;
- Caracterizar por Espectrometria de Massas e Dicroísmo circular os peptídeos sintetizados e purificados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho dos Peptídeos *Stapled*:

No ensaio de dinâmica molecular do GMIP1, com 10 ns, observou-se uma conformação preferencial de alfa-hélice na porção 1 (Figura 5, p.22). Em contrapartida, a porção 2 apresentou menor estabilidade conformacional. Por essa razão, e também devido à presença de sítios de ligação relevantes na porção 1 para a interação do GMIP1 com o nucleossomo, a porção 2, foi alvo do desenho racional de peptídeos miméticos descritos nesta dissertação. O *linker* formado pelos três resíduos de alanina foi escolhido para a inserção dos aminoácidos modificados por não pertencerem à proteína RCC1 e com o intuito de aumentar a estabilidade conformacional da porção 2. Nesse desenho dos peptídeos miméticos, os resíduos de aminoácidos caracterizados com maior relevância de interação com o nucleossomo foram mantidos em suas posições de origem, as argininas – R11 e R18.

Para buscar a estabilidade pretendida para a porção 2 de GMIP1, foi adotada a estratégia de peptídeo *stapled* para o desenho racional do peptídeo mimético GMIPw (Figura 14). Essa se baseou na substituição da alanina 5 (denominado aminoácido *i* na estratégia do peptídeo *stapled* e da alanina 7 (aminoácido *i+2*), ambos compreendidos no espaçador de alaninas do GMIP1, por aminoácidos modificados contendo cadeias laterais alquenílicas. Esses aminoácidos permitem a formação de peptídeos miméticos macrocíclicos insaturados por meio da reação de metátese de olefinas para o fechamento de anéis (RCM). Como discutido na introdução desta dissertação, esse macrociclo diminui graus de liberdade conformacional e tem o potencial de maximizar interações supramoleculares pretendidas entre o peptídeo e o receptor biológico, neste caso, o nucleossomo.

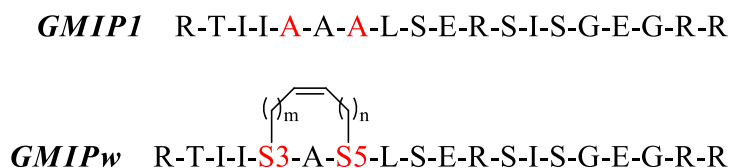


Figura 14: Estrutura primária do peptídeo nativo GMIP1 e do peptídeo *stapled* GMIPw.

Verdine, no trabalho em que introduz a estratégia do peptídeo *stapled* a partir de RCM, demonstra que o espaçamento *i* e *i+4* entre aminoácidos modificados favorece a formação de alfa-hélice. Isso levou ao desenho de um análogo de GMIP1 denominado GMIPw2 (Figura 15) em que: 1) a alanina 5 foi igualmente substituída por um aminoácido modificado com cadeia lateral alquenílica; 2) a alanina 7 foi removida da sequência original do GMIP1; 3) o segundo aminoácido modificado foi introduzido entre a serina 9 e o ácido glutâmico 10 da sequência

original do GMIP1. Também foi desenhado o peptídeo GMIPw0 em que os aminoácidos modificados de GMIPw2 foram substituídos por alaninas. Este último foi desenhado para verificar se a diferença entre a sequência do GMIP1 e do GMIPw0 traz modificações significativas nas propriedades observadas para GMIP1.

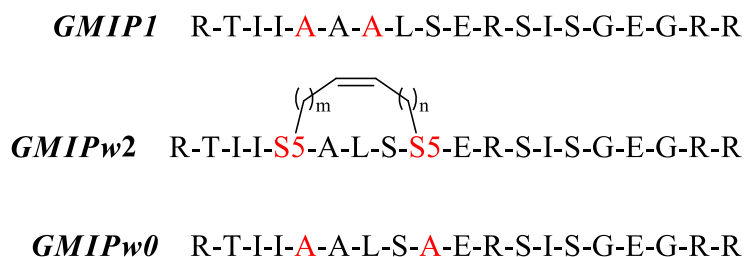


Figura 15: Estrutura primária dos peptídeos GMIP1, GMIPw2 e GMIPw0.

3.2. Síntese dos Peptídeos *Stapled*:

Com o intuito de estabelecer a rotina de síntese manual em fase sólida em nosso laboratório, realizou-se a síntese dos peptídeos GMIP1 e GMIPw2. Cabe ressaltar que esta é a primeira experiência de síntese de peptídeos em fase sólida de nosso laboratório. Por isso, começar com procedimentos estabelecidos para aminoácidos não modificados, no nosso entender, trouxe mais segurança na implementação desta rotina, já que há relatos de que a introdução dos aminoácidos modificados necessários à síntese do GMIPw apresenta maiores insucessos, quando comparada à introdução de aminoácidos não modificados. Outro fator que levou à escolha de iniciar pela síntese de GMIP1 é que o laboratório tem uma amostra comercial deste peptídeo. Isso permitiu a comparação do material sintetizado em nosso laboratório com essa amostra comercial, facilitando a sua caracterização.

Os peptídeos foram sintetizados manualmente conforme adaptação da metodologia descrita para a síntese de peptídeo em fase sólida, utilizando a estratégia *N*-Fmoc (BIRD; CHRISTIAN CRANNELL; WALENSKY, 2011; KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011). Duas resinas, Wang e Rink amida, foram utilizadas levando à síntese do GMIP1 na sua forma ácida (GMIP1) e na forma amidada (GMIP-NH₂), respectivamente. A resina Wang foi utilizada com grau de substituição 0,4-0,8 mmol.g⁻¹ com o primeiro aminoácido já acoplado (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) (Figura 16a) e a resina Rink Amida MBHA com grau de substituição 0,7 mmol.g⁻¹ (Figura 16b).

Os derivados de aminoácidos utilizados foram: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH. Todos os derivados de aminoácidos foram obtidos da Sigma-Aldrich.

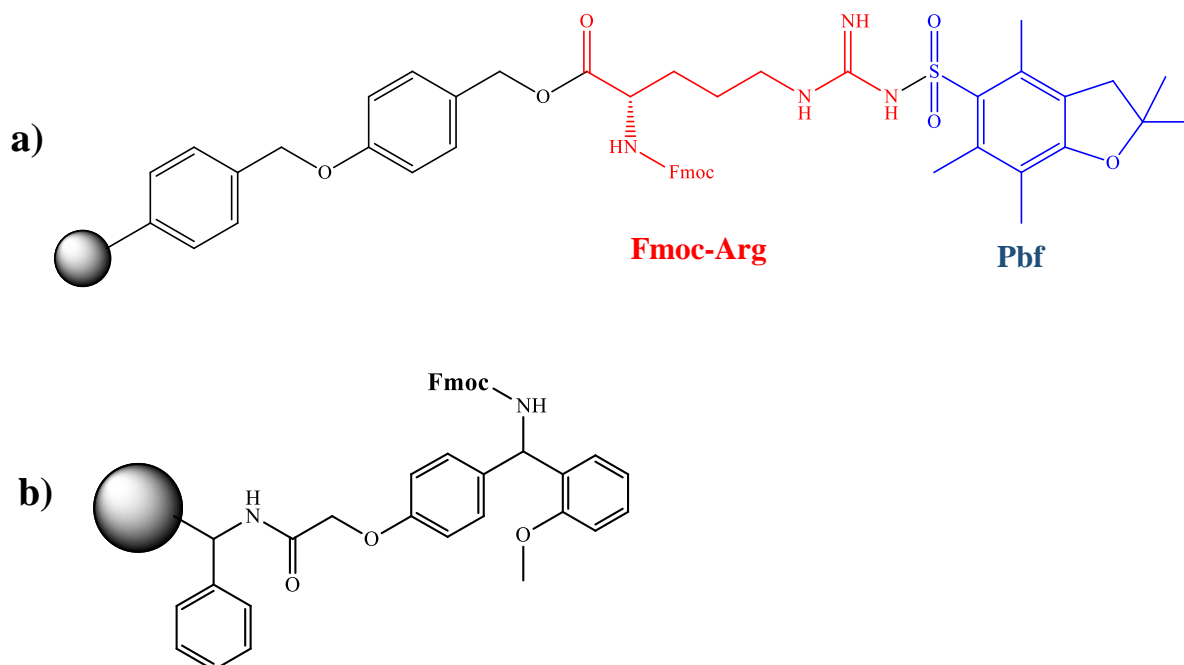


Figura 16: Suportes sólidos utilizados para a síntese dos peptídeos, (a) Resina Wang– Fmoc-Arg(Pbf)-OH e (b) Resina Rink Amida MHBA.

A resina foi lavada após as etapas de acoplamento e de desproteção sequencialmente com diclorometano (DCM) e *N,N*-dimetilformamida (DMF). O diclorometano foi previamente seco com hidreto de cálcio em refluxo e então obtido por destilação simples (45°C).

Os agentes ativadores dos grupos carboxila utilizados foram HCTU (hexafluorofosfato de *O*-(6-clorobenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium), HATU (hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinium3-óxido) e DIC (*N,N'*-Diisopropilcarbodiimida). Foram utilizados DMF e DCM como solventes. Para as etapas de desproteção do grupo amino e remoção do grupo Fmoc foram preparadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (20% v/v).

Para verificar a eficiência de cada etapa das sínteses, seja de desproteção ou de acoplamento, foi utilizado o teste de Kaiser, ou também conhecido como teste de ninhidrina (teste químico qualitativo para detecção de aminas primárias) (KAISER et al., 1970). A ninhidrina reage com o grupo amino *N*-terminal desprotegido do complexo resina-peptídeo produzindo uma cor azul intensa conforme mecanismo descrito na Figura 17. O teste é

composto por três reagentes: reagente A, 1ml de solução aquosa de KCN a 1 mmol L⁻¹ em 49ml de piridina; Reagente B, 1g de ninhidrina em 20 ml de n-butanol e Reagente C, 40g de fenol dissolvidos em 20 ml de n-butanol (AAPTEC, 2011).

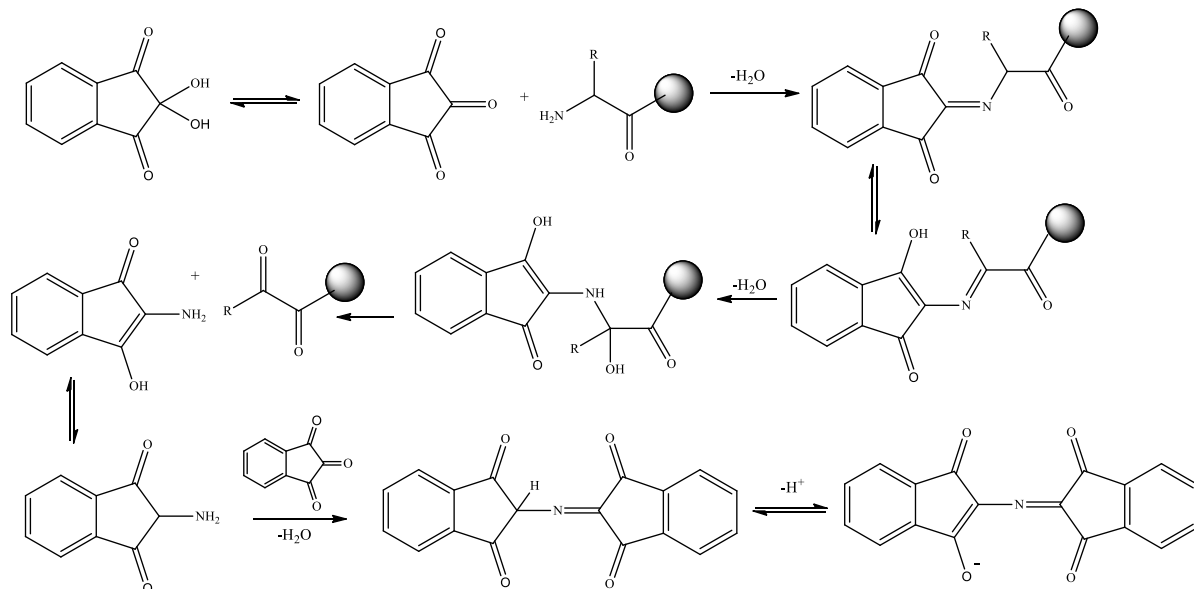


Figura 17: Mecanismo de reação da ninhidrina com o grupo amino livre de aminoácidos (teste de Kaiser).

Uma vez estabelecida a rotina de síntese em fase sólida, preparou-se o peptídeo *stapled* GMIPw2. Para sua síntese, foram utilizados dois dos aminoácidos modificados do tipo S₅ (ácido (S)-2-amino-2-metilpent-6-enóico) com um espaçamento de *i, i+4*.

3.3. Preparação da resina para a SPFS

A escala de síntese escolhida, inicialmente, foi de 30 μmol e, depois, ajustada para 100 μmol, para aumentar o rendimento dos peptídeos modificados. A resina foi previamente preparada com cerca de 2 ml de DMF, com agitação por 10 minutos. O solvente foi retirado com auxílio de filtração à vácuo.

3.4. Etapa de Desproteção:

Após intumescimento da resina em DMF, foram adicionados cerca de 2 ml da mistura 4-metilpiperidina/DMF (20% v/v), sob agitação por 15 minutos, para retirada do grupo Fmoc, conforme mecanismo proposto da Figura 18. O procedimento foi repetido duas vezes para desproteção completa. Em seguida, realizou-se lavagem com DCM e DMF (três vezes de 2 mL cada, alternadamente). Para verificar a desproteção da resina, realizou-se o teste de Kaiser,

descrito anteriormente. As reações de acoplamento são realizadas após obtenção de resultado positivo, de cor azul, no teste de Kaiser.

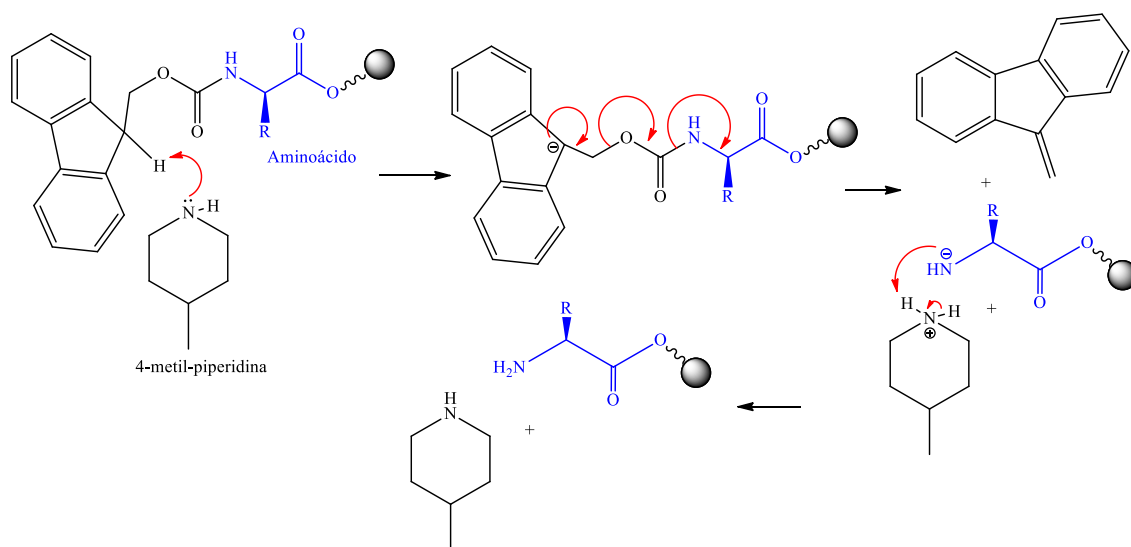


Figura 18: Mecanismo de desproteção (Retirada do grupo protetor Fmoc).

3.5. Etapa de acoplamento:

A etapa de acoplamento consiste na formação de uma ligação peptídica a partir da inserção de um novo resíduo de aminoácido. Dessa forma, um aminoácido protegido com Fmoc pode ser acoplado ao grupo amino livre da resina ou do aminoácido ligado à resina. As etapas de acoplamento envolvem a ativação do aminoácido protegido (Fmoc) usando ativadores. No trabalho foram utilizados dois métodos de acoplamento: as carbodiimidas (DIC/Oxyma) e HCTU ou HATU/ DIPEA.

3.5.1. Síntese utilizando HATU ou HCTU.

Para os acoplamentos utilizando HATU (hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium3-óxido) e HCTU (hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium) como agentes ativadores, é necessário o uso de uma base apropriada como a amina terciária DIPEA (diisopropil-etilamina). A DIPEA retira o próton ácido do aminoácido protegido para formar o íon carboxilato que ataca o íon imínio para a formação do éster O-benzotriazol livre (Obt) Figura 19 intermediário ativado responsável pela formação peptídica (BENOITON, 2006).

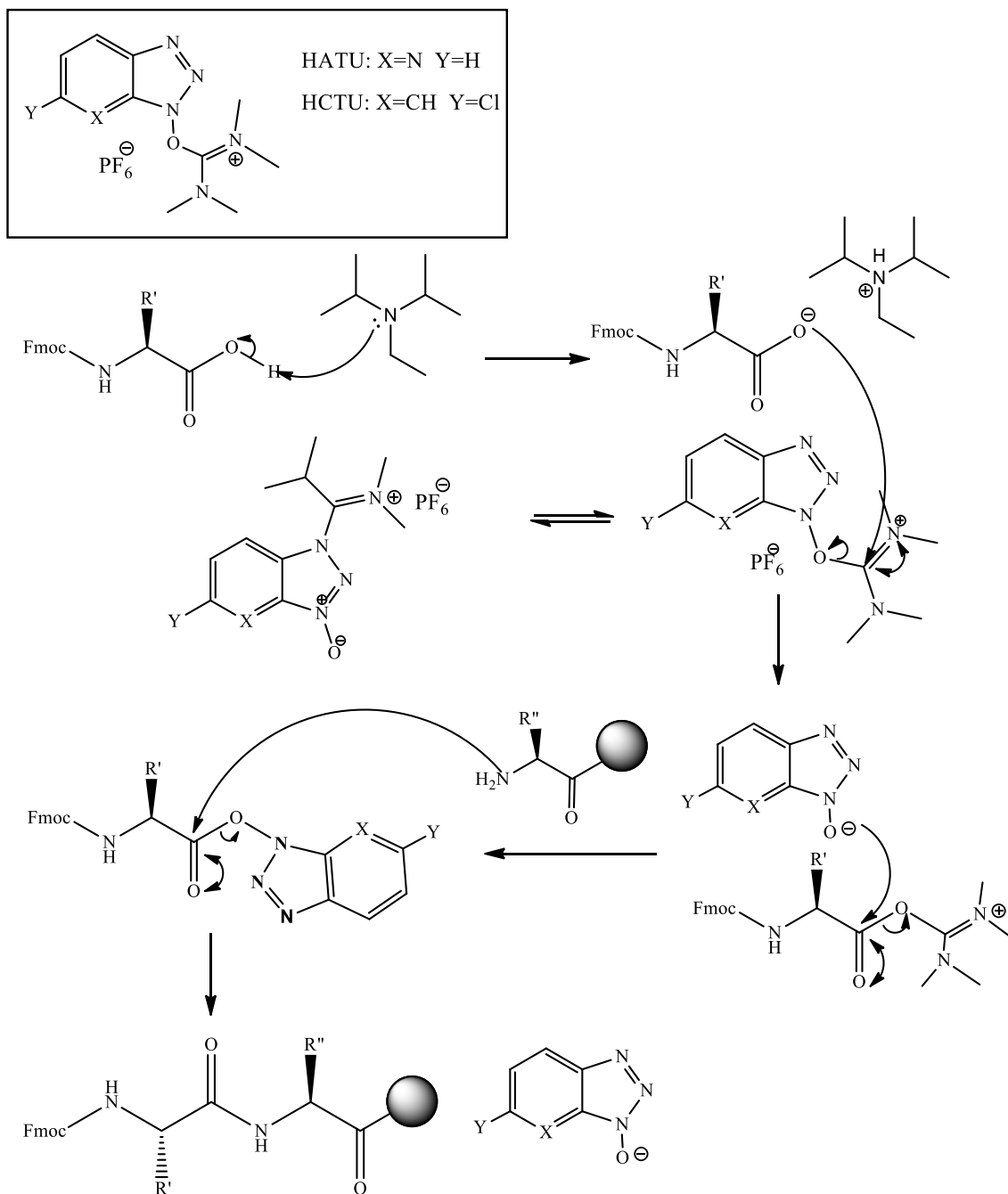


Figura 19: Mecanismo de acoplamento utilizando HATU ou HCTU/DIPEA (Adaptado de BENOITON, 2006).

3.5.2. Síntese utilizando DIC:

Para as carbodiimidas, o par de elétrons livre de átomos de nitrogênio retiram o próton ácido do aminoácido protegido por Fmoc, conforme mecanismo representado na Figura 20. A carga negativa deixada pelo aminoácido protegido ataca o carbono da carbodiimida para formar a O-aciluréia, que, por sua vez, reage com a amina desprotegida de outro aminoácido formando anidrido acético como grupo de saída e a ligação da amida.

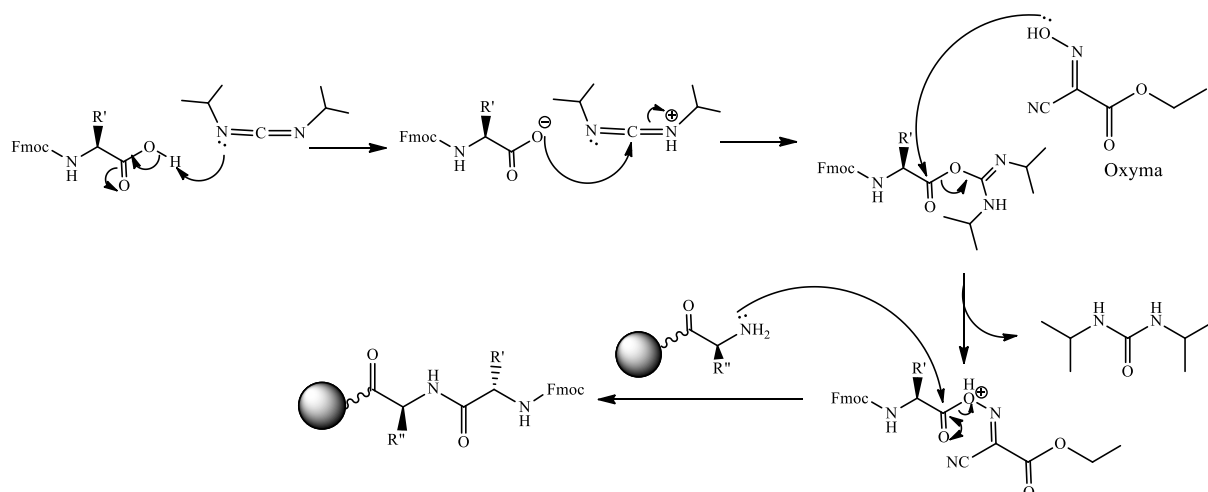


Figura 20: Mecanismo de acoplamento utilizando DIC/Oxyma (Adaptado de BENOITON, 2006).

Os acoplamentos dos aminoácidos 1 a 9 (sentido C terminal \rightarrow N terminal) foram conduzidos com a adição de 5 equivalentes molares (eq.) de HCTU (206,85 mg) e 10 eq. de DIPEA (130 μ L), com tempo de reação de 1 hora, utilizando-se DMF como solvente (2 mL), independente da resina utilizada. Após o 9º resíduo de aminoácido, para Resina Wang, utilizou-se 5 eq. de HATU (190,12 mg) e 10 eq. de DIPEA (130 μ L). Também após o 9º resíduo de aminoácido, para Resina Rink MHBA, foram utilizados 4 eq. de DIC (93 μ L) e 4 eq. de Oxyma (85,3 mg), ambas em DMF (2 mL) em agitação por 2 horas.

Para os acoplamentos dos resíduos de aminoácidos modificados, foram realizados dois ciclos de acoplamento, cada um com 3 horas de reação.

Na Tabela 1, é possível identificar os derivados de aminoácidos utilizados na síntese (3eq. de aminoácidos olefínicos e 5eq. de não olefínicos), a massa utilizada de cada aminoácido e sua massa molecular.

Tabela 1: Massa molecular dos aminoácidos protegidos e a massa utilizada de cada aminoácido durante o acoplamento

Fmoc-Aminoácidos	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Massa utilizada (mg)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	174,2	324,38
Fmoc-Thr(tBu)-OH	119,1	198,74
Fmoc-Ile-OH	131,2	176,71
Fmoc-Ala-OH	89,1	155,67
Fmoc-Leu-OH	131,2	176,71
Fmoc-Ser(tBu)-OH	105,1	191,72
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	147,1	212,74

Fmoc-Gly-OH	75,1	148,66
Fmoc-(S)-2-(2-propenyl)Ala-OH (S ₃)	351,4	105,42
Fmoc-(S)-2-(4-pentenyl)Ala-OH (S ₅)	379,5	113,85

3.6. Reação de metátese de olefina para fechamento do anel

Após a finalização da sequência de aminoácidos do peptídeo desejado GMIPw2, foi feita a reação de metátese de olefina para a introdução do *staple*. Para realizar essa transformação, primeiramente, lavou-se a resina com 2 mL de DCM (3 x 1 min) e então com 2 mL de dicloroetano (DCE, 3 x 1 min) previamente destilado em CaH₂. Então, a resina foi tratada com 5 mL (20 mol% em relação a substituição da resina) de uma solução de 6 mM, em DCE do catalisador de Grubbs 1^a geração (GB-1) por 2 horas. Após filtração, o procedimento foi repetido por mais 2 horas e, então, a resina foi lavada com 50 eq de DMSO por 15 horas. Ao final, todo excedente foi retirado e a resina foi lavada com DCE (3 x 1 min) e DCM (3 x 1 min).

3.7. Clivagem do peptídeo da resina

O ácido trifluoroacético (TFA) é responsável pela remoção simultânea dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e da resina. Adicionou-se, ao recipiente de reação, a solução de clivagem contendo 90% de TFA, 5% de tioanisol, 3% de etanoditiol (EDT) e 2% de anisol (em volume) na proporção de 10 mL da mistura para 1g de resina-peptídeo. Deixou-se reagir por 90 minutos, sob agitação. Após essa reação, o peptídeo foi extraído do meio reacional.

No primeiro deixou-se evaporar o TFA e os demais solventes por borbulhamento de N₂ gasoso. Com o auxílio de uma filtração a vácuo, lavou-se o peptídeo clivado com uma mistura gelada de dietiléter e hexano (50% v/v) para precipitar o peptídeo e retirar os demais reagentes da reação. Em seguida, o peptídeo foi extraído com uma mistura de água:acetonitrila 1:1 (50% v/v). As soluções contendo o peptídeo sintético foram recolhidas, congeladas e liofilizadas.

3.8. Caracterização dos peptídeos

Os peptídeos miméticos sintetizados foram caracterizados por Espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF realizada em equipamento UltraFlex III, BrukerDaltonics,

Germany). As amostras foram misturadas com uma solução matriz (5mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico 50 µL de ácido trifluoroacético, 250 µL de acetonitrila e 200 µL de água ultrapura) na proporção 1:3 (v:v) e aplicadas sobre uma placa de MALDI própria para o equipamento. Foram obtidos espectros de MS (faixa de massa: 700 Da - 3500 Da) e MS/MS, adquiridos em modo refletido e positivo com calibração externa utilizando o kit de calibração padrão I (BrukerDaltonics, Germany). O sequenciamento *de novo* foi realizado por meio da interpretação manual dos espectros MS/MS adquiridos no software FlexAnalysis (versão 3.0, BrukerDaltonics, Alemanha).

3.9. Purificação dos peptídeos:

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, em equipamento HPLC Prominence system (Shimadzu Corporation, Japan) com um detector de espectrofotômetro UV-Vis. As análises foram monitoradas no pela absorção de luz UV de 220 nm, característico para ligação peptídica. O perfil cromatográfico foi obtido por meio da injeção dos peptídeos liofilizados em solução aquosa em coluna preparativa de fase reversa (Vydac, Protein&Peptide C18, 250 mm x 10 mm, 5 µm) com um fluxo de 10mL/min e um gradiente de eluição de acetonitrila variando de 5 a 95% por 60 minutos. As frações foram coletadas manualmente, liofilizadas e analisadas por espectrometria de massa.

3.10. Padronização das amostras de peptídeos

Após a purificação de parte da amostra dos peptídeos GMIP-NH₂ e GMIPw2 as amostras foram diluídas em uma solução estoque de 1mL em que as concentrações dos peptídeos foram calculadas a partir das absorbâncias medidas no Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). Como nenhum dos peptídeos sintetizados continham resíduos de triptofano em suas sequências, empregou-se o método proposto por Murphy e Kies (1960) que consiste na determinação das concentrações das amostras de peptídeos a partir das absorbâncias medidas para os comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (MUPHY; KIES, 1960). As equações utilizadas para o cálculo das concentrações estão representadas abaixo (VERLY, 2010):

$$\frac{(k + T)}{2} = C \quad (Eq. 1)$$

Onde k e T são dados por:

$$(A_{215} - A_{225}). 144 = k \quad (Eq. 2)$$

$$(A_{205}).31 = T \quad (Eq. 3)$$

Temos que A é absorvância da solução da amostra para comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm e C concentração da amostra (mg.L⁻¹).

3.11. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados um utilizando espectropolarímetro JASCO J-815. Os espectros foram obtidos a 25 °C, na faixa de 190 a 300 nm, para os peptídeos em água, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em quatro varreduras consecutivas por amostra. Foi empregada a velocidade de varredura de 50nm.min⁻¹ e tempo de resposta de 4 s. A largura de banda foi de 1 nm e a leitura de elipticidade realizada a cada 0,1 nm.

As preferências conformacionais de todos os peptídeos foram investigadas em água. Para isso, esses foram liofilizados, dissolvidos em 1mL água e suas concentrações foram determinadas por Espectrofotometria. As soluções estoque foram diluídas a 40uM.

Os dados de elipticidade θ (mdeg) obtidos no equipamento foram convertidos em elipticidade molar média $[\theta]$ (deg.cm².dmol⁻¹) pela equação 4, em que l é o caminho ótico, c a concentração molar da amostra e n o número de aminoácidos do peptídeo:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10.l.c.n} \quad (Eq. 4)$$

A porcentagem de helicidade do peptídeo foi estimada utilizando os valores de elipticidade molar referentes a λ iguais a 222 nm. São vários os algoritmos que podem ser utilizados para se determinar a porcentagem de helicidade, neste trabalho o teor de helicidade foi calculado a partir da equação 5 (CHEN; YANG; CHAUS, 1974).

$$\% \alpha - \text{hélice} = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{222}^{\infty} \left[1 - \frac{ik}{n} \right]} \times 100\% \quad (Eq. 6)$$

Em que $[\theta]_{222}$ é a elipticidade observada no comprimento de onda igual 222 nm, i é o número de α -hélices formadas no peptídeo (foi estimada na dinâmica molecular a formação de 1 hélice), k é a constante dependente do comprimento de onda (2,57), n é o número total de resíduos de aminoácidos (19) e $[\theta]_{222}^{\infty}$ é a elipticidade residual máxima para uma hélice de tamanho infinito (-39500 deg.cm².dmol⁻¹)(ROBERTSON, 2016).

4. Resultados e Discussão:

4.1. Síntese do peptídeo GMIP1

Com a finalidade de se estabelecer metodologia de SPFS para este trabalho, o peptídeo GMIP1 foi sintetizado utilizando fases sólidas diferentes: Resina Wang (1) que forma o peptídeo da sua forma ácida; e a Resina Rink (2), que produz o peptídeo na sua forma amidada (Figura 21). Essas sínteses têm como objetivo comparar o uso das duas resinas na obtenção do mesmo peptídeo, bem como identificar a resina mais apropriada para síntese dos peptídeos *stapled* análogos a GMIP1.

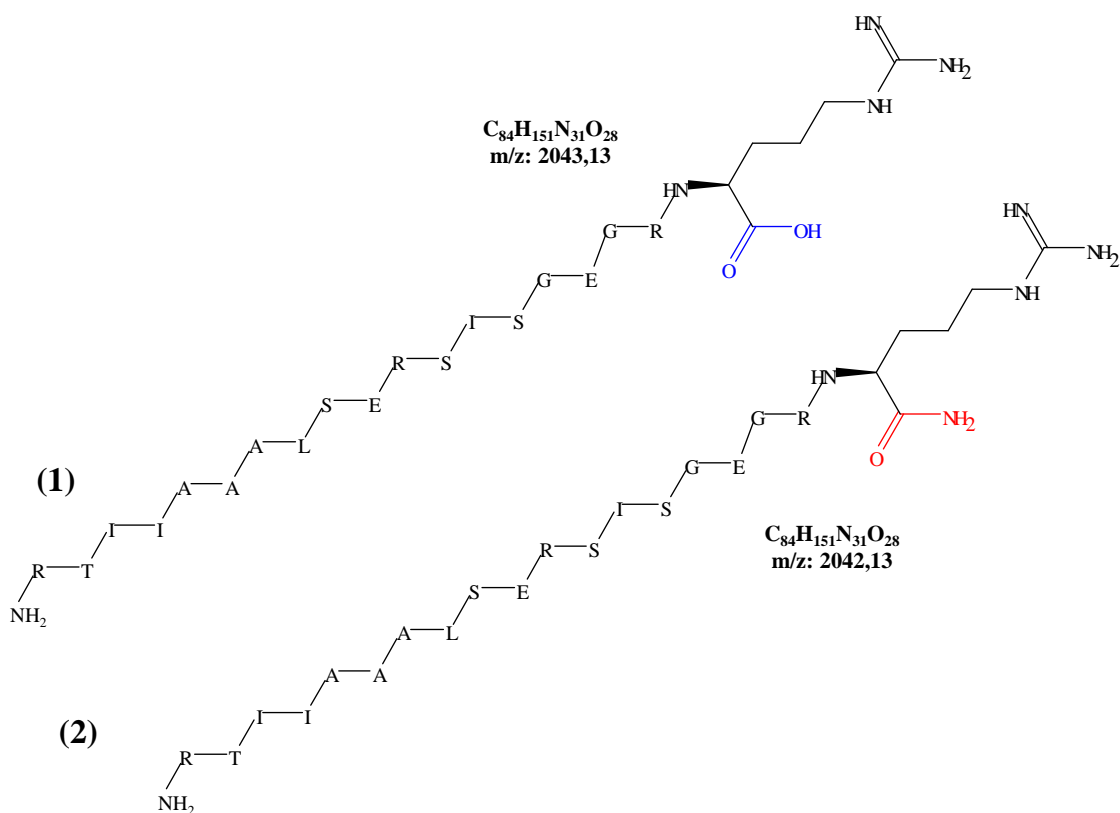


Figura 21: Estrutura do peptídeo GMIP1 (1) na sua forma ácida (azul) e (2) na sua forma amidada (vermelho).

A Tabela 2 apresenta quantos ciclos de acoplamento de um mesmo aminoácido foram realizados para a introdução de cada resíduo de aminoácido na estrutura do peptídeo durante sua síntese. A necessidade de realização de novos ciclos de acoplamento de um dado aminoácido foi avaliada com auxílio do Teste de Kaiser, que permite definir se ainda há peptídeos ligados à resina com a porção *N*-terminal livre para a reação com o aminoácido a ser introduzido na sequência. Foi observado que, para ambas as sínteses, foram necessários novos ciclos de acoplamentos a partir do nono resíduo de aminoácido. Para estes acoplamentos foram

utilizados reagentes de acoplamento mais eficientes que HCTU. Para a síntese com a resina Wang, também foi necessária a utilização do surfactante Triton-X-100.

Tabela 2: Dados de acompanhamento das sínteses do peptídeo GMIP1 e o GMIP1-NH₂.

*Etapas de acoplamento com uso de Triton-X-100

Ordem do Aminoácido	Aminoácido	Resina Rink		Resina Wang	
		Acoplamentos		Acoplamentos	
		Repetições	Reagente	Repetições	Reagente
1	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
2	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
3	G - Fmoc-Gly-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
4	E - Fmoc-Glu(OtBu)-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
5	G - Fmoc-Gly-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
6	S - Fmoc-Ser-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
7	I - Fmoc-Ile-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
8	S - Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	1x	HCTU	1x	HCTU
9	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HCTU	3x	HATU
					HATU
					HATU*
10	E - Fmoc-Glu(OtBu)-OH	4x	HCTU	3x	HCTU
			HCTU		HCTU*
			HCTU		HATU*
			DIC		-----
11	S - Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	3x	HCTU	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
			DIC/oxyma		
12	L - Fmoc-Leu-OH	2x	DIC/oxyma	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
13	A - Fmoc-Ala-OH	2x	HCTU	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
14	A - Fmoc-Ala-OH	1x	DIC/oxyma	1x	HATU*
15	A - Fmoc-Ala-OH	1x	DIC/oxyma	1x	HATU*
16	I - Fmoc-Ile-OH	2x	DIC/oxyma	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
17	I - Fmoc-Ile-OH	3x	DIC/oxyma	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
			DIC/oxyma		
18	I - Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	3x	DIC/oxyma	1x	HATU*
			DIC/oxyma		
			DIC/oxyma		
19	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	DIC/oxyma	1x	HATU*

4.1.1. Síntese e Caracterização Primária do peptídeo GMIP1-NH₂

O peptídeo GMIP1-NH₂ foi sintetizado manualmente em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc, empregando-se HCTU e DIPEA como agente de acoplamento e como base,

respectivamente. A resina utilizada nessa síntese foi a Resina Rink amida MHBA que produz o peptídeo com um grupamento amida na porção C-terminal (Figura 21).

A interação do GMIP1, na sua forma ácida, com a superfície nucleossomal já vem sendo estudada pelo grupo. Optou-se por sintetizar o mesmo peptídeo mudando apenas a sua porção C-terminal a fim de confirmar se as propriedades dos peptídeos (1) e (2), Figura 21, p.45, permanecem semelhantes permitindo a flexibilidade no uso dos dois tipos de resinas (Wang e Rink) durante a síntese dos peptídeos modificados.

As dificuldades observadas nessa síntese (Tabela 2) aconteceram com o acoplamento dos resíduos de ácido glutâmico-10, serina-11, leucina-12, alanina-13, isoleucinas-16 e 17, treonina-18. Nestes casos, as repetições dos ciclos de acoplamento desses derivados de aminoácidos foram realizadas com o agente de acoplamento DIC/oxyma. No espectro obtido por EM-MALDI-ToF desta mesma amostra bruta da síntese, representado na Figura 22, pode-se observar a presença dos íons com m/z 2042,312 e 1886,190, correspondendo aos íons $[M+H]^+$ dos peptídeos GMIP-NH₂ e do seu análogo, com um resíduo de arginina a menos, respectivamente. O íon de m/z 2264,379 é referente ao peptídeo GMIP-NH₂ com o grupo N-terminal protegido por Fmoc, com diferença de massa igual a 222,067 Da.

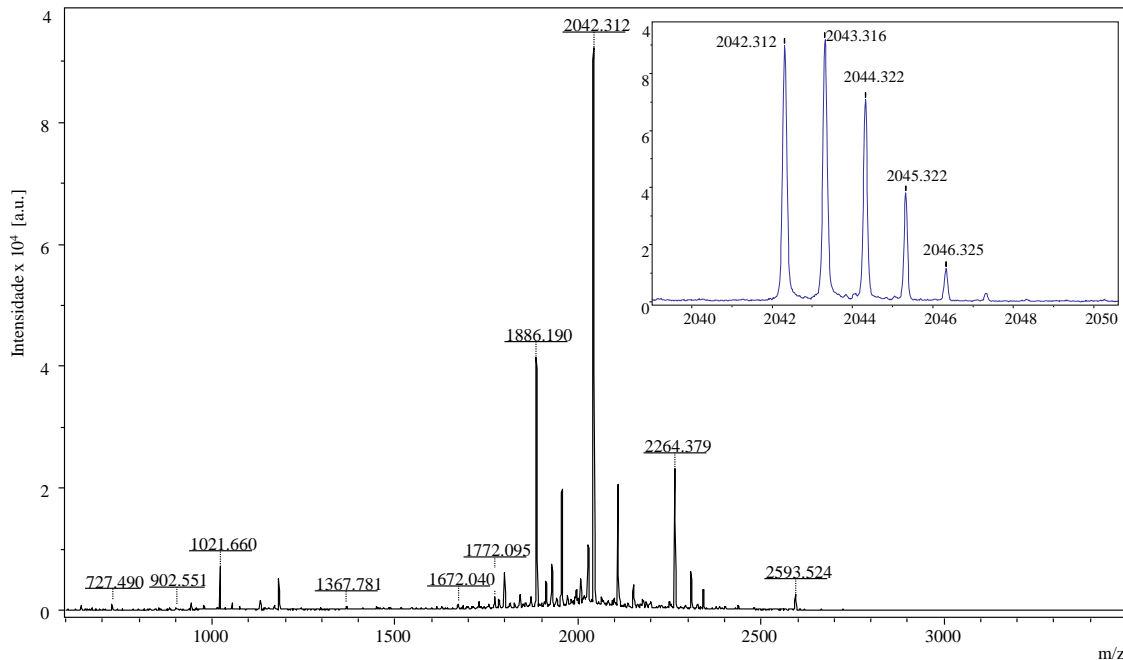


Figura 22: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo GMIP1-NH₂. A imagem à direita no canto superior da figura trata-se da ampliação da região de m/z 2040 a 2050, destacando a presença do íon de interesse ($[M+H]^+ = 2042,312$ Da).

Após a confirmação da presença do íon de m/z que caracteriza o peptídeo desejado, esse foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por

UV (HPLC-UV). No cromatograma do peptídeo bruto (48Figura 23), é possível observar um pico proeminente com tempo de retenção (t_r) de 30,02 min.

As frações com tempos de retenção iguais a 30,02 min (Fração 1), 30,80 min (Fração 2A e 2B) e 32,23 min (Fração 3) foram coletadas manualmente e analisadas por EM. O peptídeo de interesse (m/z 2042) foi encontrado em todas as 4 frações. Para as frações 2B e 3 foi encontrada uma mistura dos peptídeos GMIP1-NH₂ e seu análogo. Dessa forma, será necessária a realização de uma purificação mais cuidadosa para separar esses dois peptídeos, que se diferenciam apenas por um resíduo de arginina.

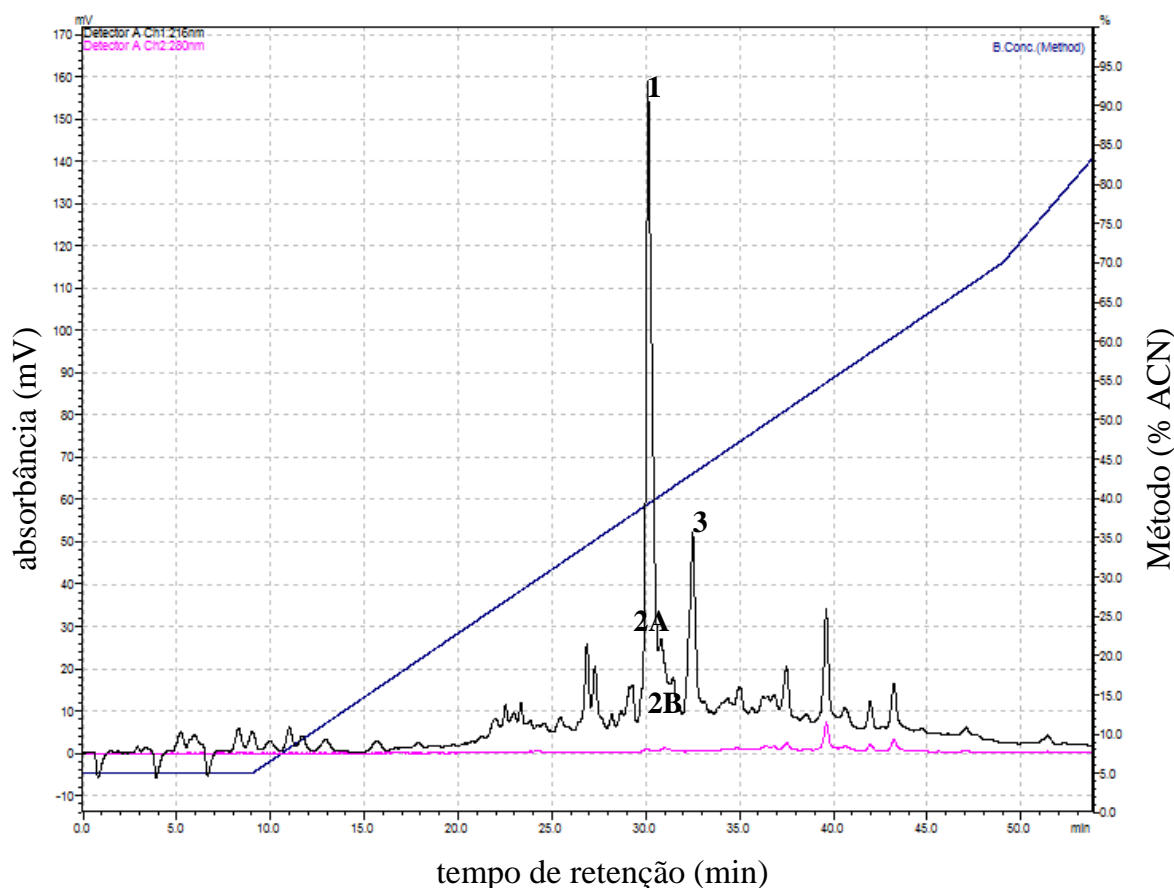


Figura 23: Perfil cromatográfico da amostra bruta contendo o peptídeo GMIP1-NH₂. As Frações recolhidas e analisadas estão indicadas no cromatograma. O Peptídeo foi eluído em gradiente de acetonitrila + 1% (v/v) TFA, em coluna preparativa C18.

Para obter informação sobre a estrutura primária do peptídeo, foi feita a seleção e fragmentação do íon correspondente através da colisão desse peptídeo ionizado com as moléculas de um gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio) que promove a dissociação induzida por colisão (CID) do íon selecionado. Conforme a nomenclatura sugerida por Roepstorff e colaboradores, nesta fragmentação, são gerados dois íons-fragmentos: os que retêm a carga residual (próton) na parte *N*-terminal (chamados de fragmentos *-a*, *-b* e *-c*, dependendo da

ligação que é fragmentada) e os que íons retêm a carga residual (próton) na porção *C*-terminal (fragmentos *-x*, *-y* e *-z*). Os pares de íons *a/x*, *b/y* e *c/z* serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si, conforme indicado na Figura 24. Da quebra das ligações peptídicas, obtêm-se o par de íons *-b* e *-y* que são interpretados mais facilmente, de forma que a diferença dos valores de *m/z* desses dois íons nos permite identificar o resíduo de aminoácido de interesse. Os íons *-a* são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons *-b*, ou seja, equivale a uma diferença de 27,9949 u em relação ao íon *-b* correspondente.

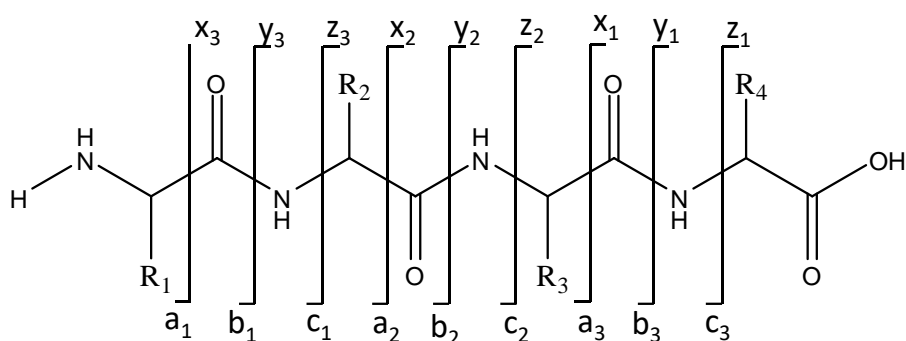


Figura 24: Os três pontos possíveis de clivagem na cadeia principal do peptídeo: *-a*, *-b* e *-c* quando a carga é mantida na porção *N*-terminal e *-x*, *-y* e *-z* quando a carga é mantida na parte *C*-terminal (Adaptado de ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984).

A identidade do peptídeo sintetizado foi confirmada por meio da fragmentação do íon precursor *m/z* 2042,344 em um Espectrômetro de Massa MALDI-TOF/TOF. No sequenciamento, Figura 25, foi possível verificar a estrutura primária do peptídeo GMIP1-NH₂ através da interpretação da série *y* e da série *b*.

Para identificar qual resíduo de arginina não foi acoplado corretamente, o íon *m/z* 1886,19 foi selecionado na fração 3 e fragmentado por MS/MS (Figura 26). O sequenciamento desse peptídeo forneceu informação de que o acoplamento do resíduo de arginina-19 (*N*-terminal) não foi eficiente, apesar de apresentar Teste de Kaiser negativo para grupo amino livre (resina incolor).

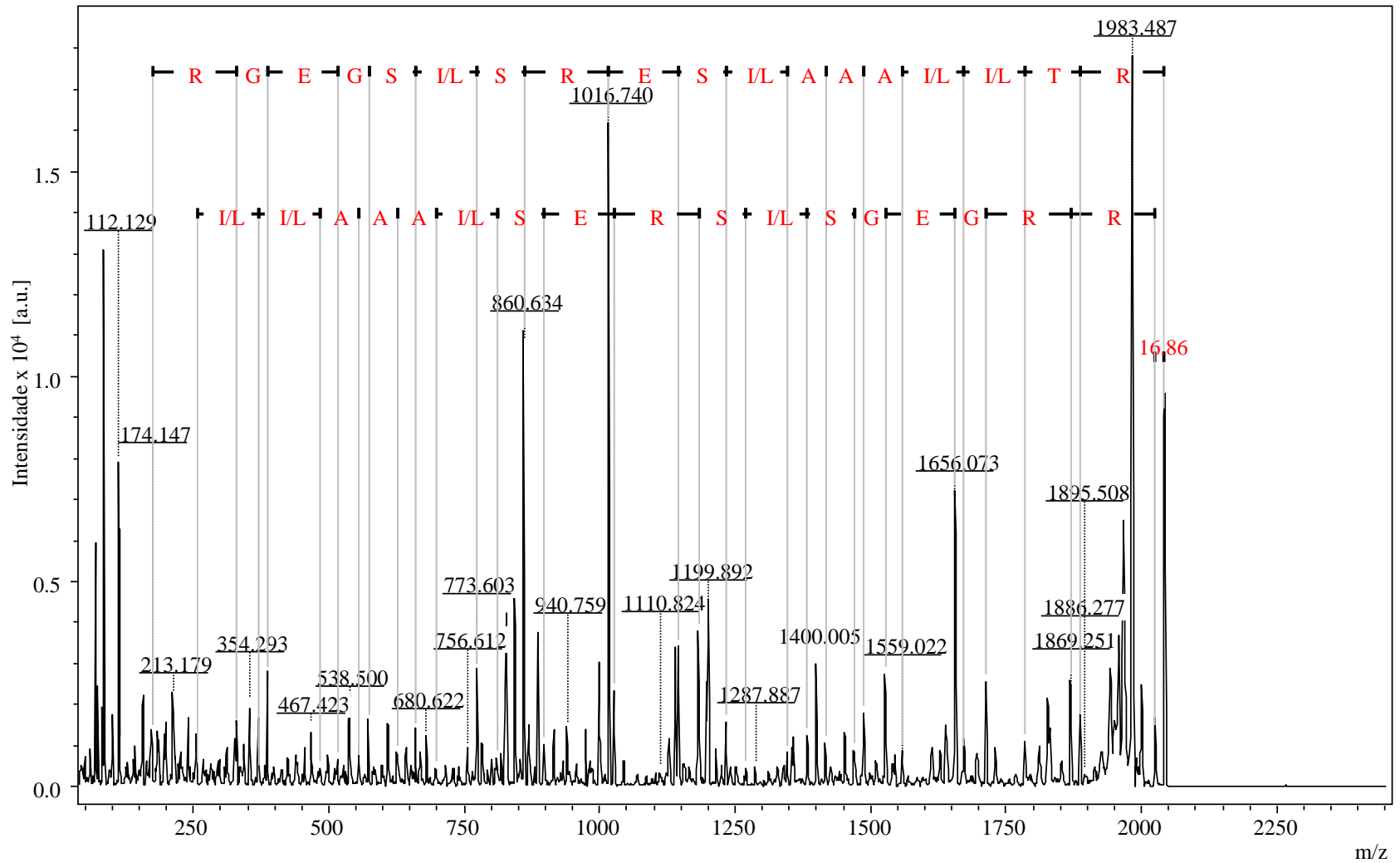


Figura 25: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor ($[M+H]^+ = 2042,344\text{Da}$) do peptídeo GMIP1-NH₂.

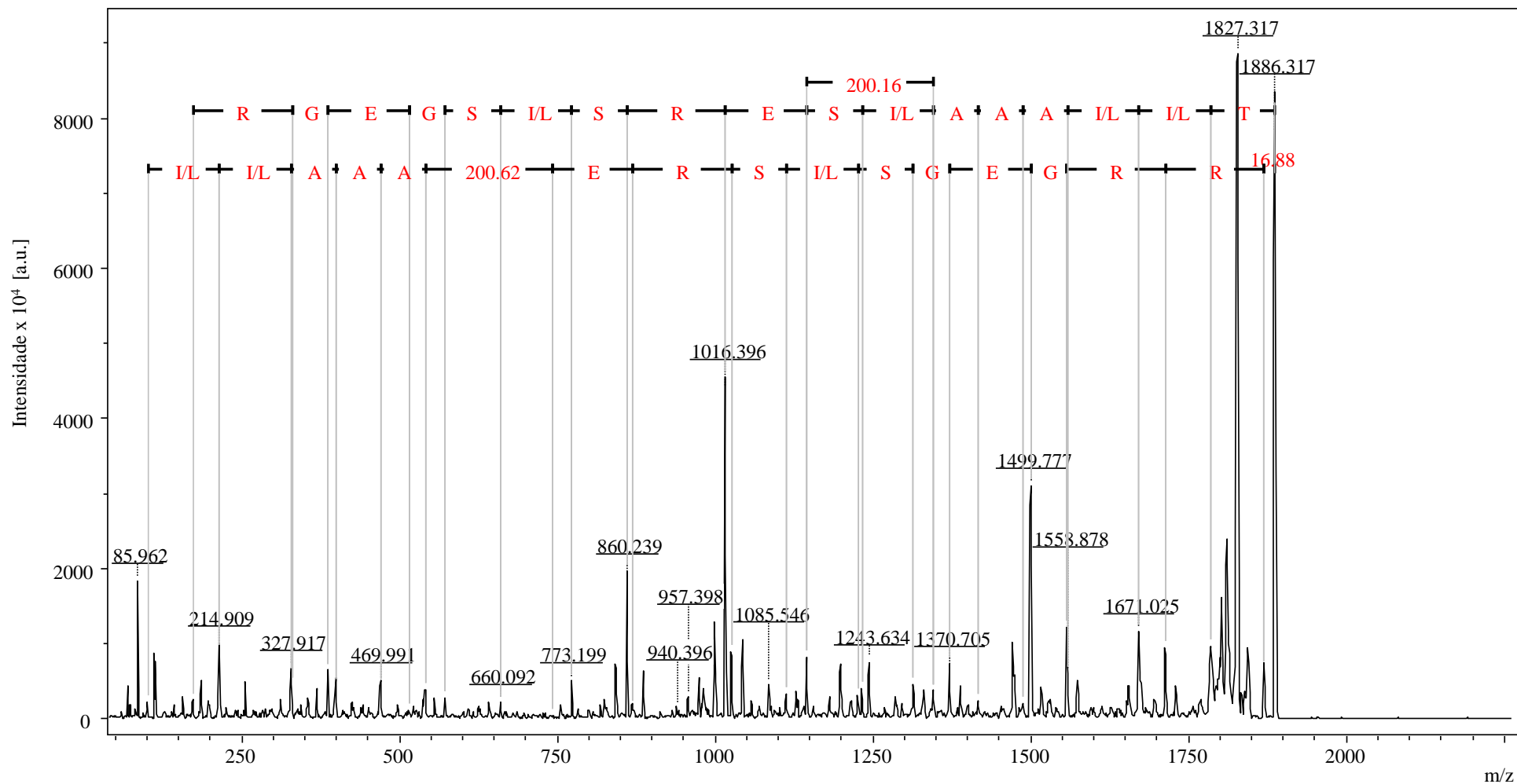


Figura 26: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor ($[M+H]^+ = 1886,19\text{Da}$) do peptídeo análogo ao GMIP1-NH₂ sem o resíduo de arginina N-terminal.

4.1.2. Síntese e Caracterização da estrutura primária do peptídeo GMIP1 utilizando a Resina Wang:

A síntese do peptídeo GMIP1 (1) foi realizada manualmente em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc, empregando-se HCTU e DIPEA como agente de acoplamento e base, respectivamente. A resina utilizada nessa síntese foi a Wang que, após a clivagem, produz o peptídeo com a porção C-terminal ácida (Figura 21, p.45)

Nas etapas dos acoplamentos dos resíduos de aginina-9, ácido glutâmico-10 e arginina-19, os derivados de aminoácidos desses resíduos foram submetidos a reacoplamentos, substituindo o agente de acoplamento para HATU, com a adição de cerca de 10 μ L de Triton-X-100, detergente aniônico, e aumento do tempo de reação para 2 horas. A adição do detergente aniônico vem como alternativa para evitar a agregação da resina, potencial causa da dificuldade de acoplamento observada a partir do 9º resíduo de aminoácido.

Após a adição do último resíduo de aminoácido da síntese, o peptídeo foi clivado e separado do suporte sólido. O espectro obtido por EM-MALDI-ToF da amostra bruta está apresentado na Figura 27, onde é possível observar a presença de picos com m/z 2043,259 e 1877,143 atribuídos aos íons $[M+H]^+$ do peptídeo GMIP1 e um análogo de GMIP1 com um resíduo de arginina a menos, respectivamente.

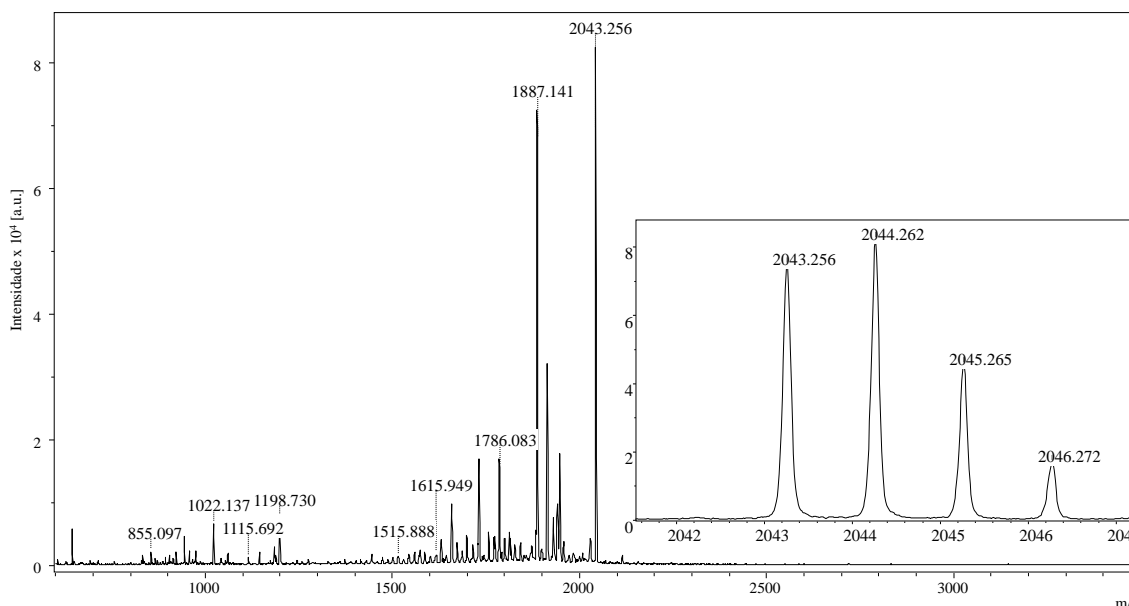


Figura 27: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo GMIP1-OH. A imagem à direita da figura trata-se da ampliação da região de m/z 2042 a 2047 destacando a presença do íon de interesse ($[M+H]^+=2043,256$).

Devido ao prazo, a amostra bruta contendo o peptídeo GMIP1 ainda precisa ser purificada. Desta forma as análises comparativas iniciais de Dicroísmo Circular foram realizadas utilizando a amostra comercial de GMIP1 descrita na metodologia.

4.2. Síntese dos peptídeos *stapled*

As sínteses dos peptídeos *stapled* foram realizadas em duas etapas. Primeiramente, foram sintetizadas manualmente as cadeias monoméricas, por SPFS, segundo a estratégia Fmoc. Em seguida, os peptídeos, ainda ligados à resina, foram submetidos à reação de metátese de olefina para fechamento de anel (RCM).

Os diagramas das voltas helicoidais (*Helical Wheel Projections*) para os peptídeos *stapled*, GMIPw e GMIPw2 estão representados na Figura 28. Nesses diagramas, estão representadas as posições dos grampos que serão inseridos na estrutura, permitindo a visualização da melhor localização dos aminoácidos modificados para a estabilização da estrutura secundária dos peptídeos.

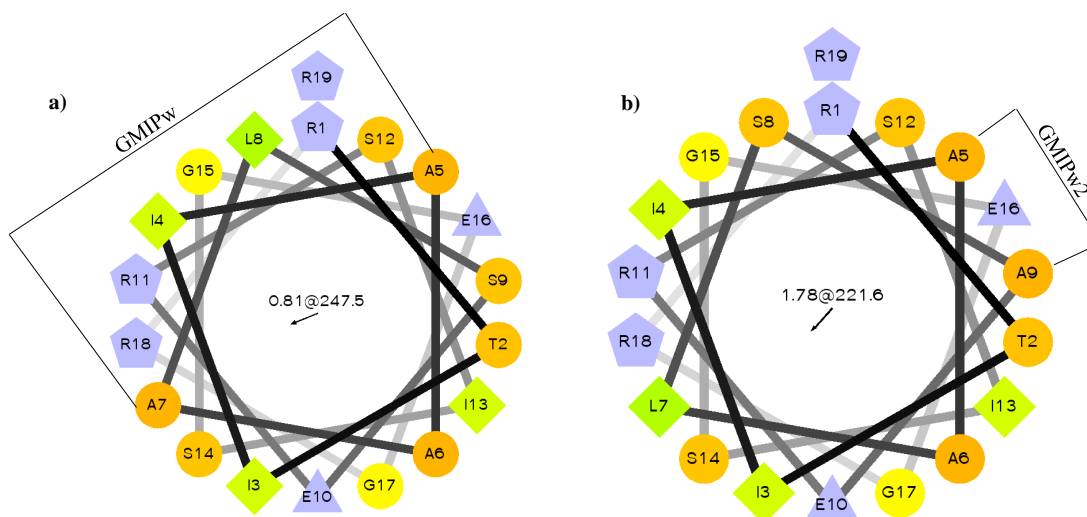


Figura 28: Análise estrutural das hélices dos peptídeos *stapled*: a) GMIPw e b) GMIPw2. Projeções das estruturas de wheels helicoidais de peptídeos simuladas pelo programa RZ lab (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>)

Na Figura 28.a é possível observar que, para o peptídeo GMIPw, os aminoácidos modificados nas posições 5 e 7 estão muito distantes para formação de estrutura de α -hélice. Esse fato poderia dificultar a realização da reação de metátese de olefina.

Com o objetivo de favorecer a reação de fechamento de anel, visto que esta é uma das conformações mais estáveis para formação do *crosslink* (SCHAFMEISTER; PO;

VERDINE, 2000) optou-se por iniciar a síntese dos peptídeos *stapled* pelo GMIPw2. As posições dos resíduos de aminoácidos descritos como importantes para interação com a superfície nucleossomal foram mantidas com a inserção nos aminoácidos olefínicos nas posições 5 e 9.

4.2.1. Síntese e Caracterização da estrutura primária do Peptídeo GMIPw2

Grubbs e colaboradores (2014) publicaram um estudo da seletividade de dois tipos catalisadores para a reação de metátese de olefina de fechamento de anel utilizando as resinas Wang, TentaGel e MBHA. Concluíram que o tipo de resina influencia na atividade desses catalisadores. A Resina Rink MBHA apresentou maior conversão do produto de RCM desejado, quando comparado com a resina Wang (MANGOLD; LEARY; GRUBBS, 2014). Desta forma, escolhemos realizar a síntese do GMIPw2 utilizando como suporte sólido a Resina Rink MBHA.

Utilizamos como agente de acoplamento o HATU, por termos obtido melhores resultados com este agente na síntese de GMIP1 e devido à sua eficiência em relação à DIC/Oxyma Pure (CHAN; WHITE, 2000).

Tabela 3: Dados de acompanhamento das sínteses do peptídeo GMIPw2.

Ordem do Aminoácido	Aminoácido	Resina Rink	
		Acoplamentos	
		Repetições	Reagente
1	R- Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HATU
2	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HATU
3	G - Fmoc-Gly-OH	1x	HATU
4	E - Fmoc-Glu(OtBu)-OH	1x	HATU
5	G- Fmoc-Gly-OH	1x	HATU
6	S- Fmoc-Ser-OH	1x	HATU
7	I - Fmoc-Ile-OH	1x	HATU
8	S - Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	1x	HATU
9	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	2x	HATU
			HATU*
10	E - Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2x	DIC/oxyme*
			HATU*
11	S ₅ - (2)-(4-pentenil)Ala-OH	2x	DIC/oxyme*
			HATU*
12	S - Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	2x	HATU*
			HATU*
13	L - Fmoc-Leu-OH	1x	HATU*
14	A - Fmoc-Ala-OH	1x	HATU*
15	S ₅ - (2)-(4-pentenil)Ala-OH	1x	HATU*
16	I - Fmoc-Ile-OH	2x	HATU*
			HATU*

17	I - Fmoc-Ile-OH	1x	HATU*
18	I - Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	1x	HATU*
19	R - Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1x	HATU*

*todos os acoplamentos realizados com a adição de Triton-X-100.

O peptídeo *stapled* GMIPw2 possui o posicionamento $S_{i,i+4}S(8)$ para os aminoácidos olefínicos. Nesse arranjo, esses aminoácidos estão a uma distância de 3 aminoácidos ($i, i+4$), e o anel de hidrocarbonetos (*crosslink*) é formado por 8 átomos de carbono conforme mostrado na Figura 29.

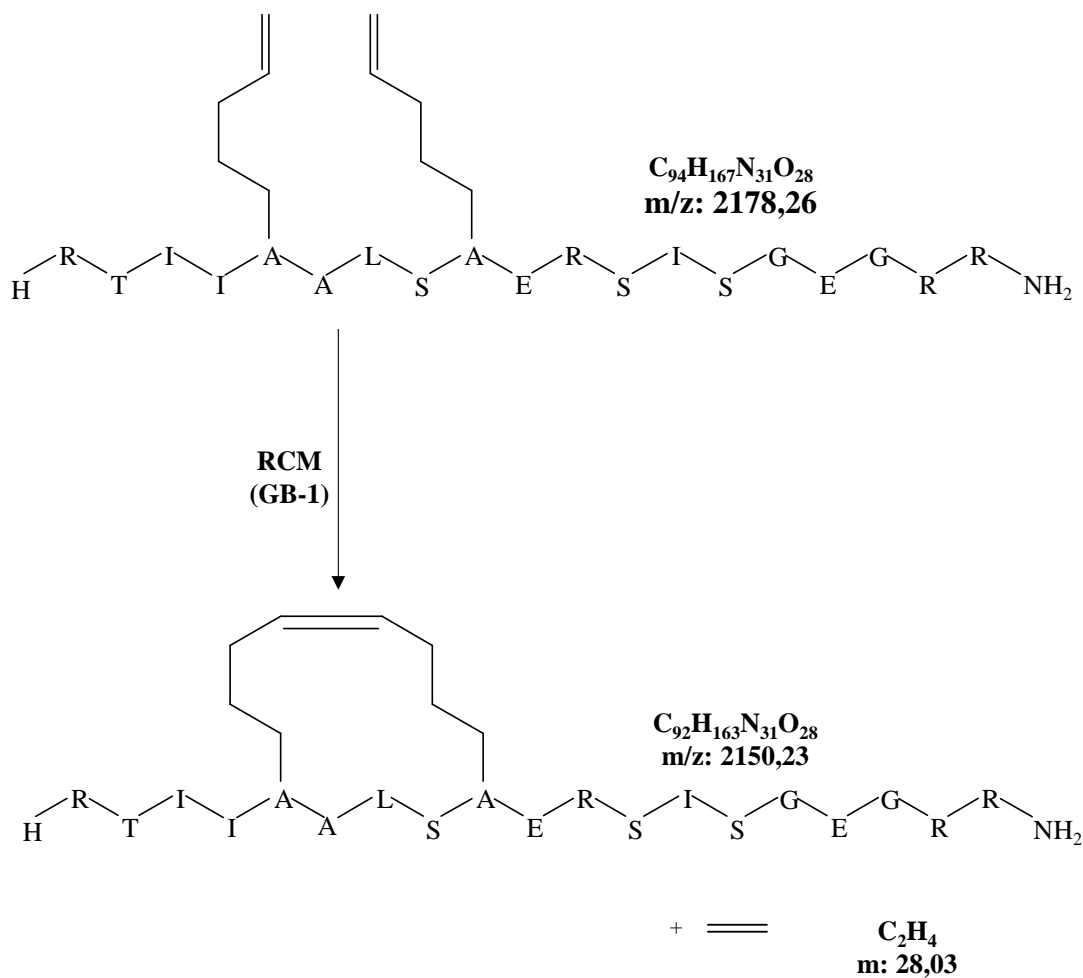


Figura 29: Representação do peptídeo GMIPw2 ciclizado com a liberação de etileno (C_2H_4).

Foram utilizados os aminoácidos modificados com as cadeias olefinicas laterais de 5 carbonos com estereoisomeria do tipo S (S_5). Após o acoplamento de todos os aminoácidos da sequência, foi realizada a reação de metátese para fechamento de anel com o catalisador GB-1, por 2 horas a temperatura ambiente. Após filtração, o procedimento foi repetido por mais 2 horas. A resina então foi lavada com 50 eq. de DMSO por 15 horas para a retirada dos subprodutos organometálicos e facilitar a separação do peptídeo.

Então, a resina foi lavada novamente com DCM, DCE e DMF, três vezes cada. Depois, foi feita a desproteção do grupo amino terminal. O peptídeo *stapled* foi então clivado com o Reagente R e extraído conforme protocolo descrito anteriormente.

A análise de EM-MALDI-ToF da amostra bruta está representada na Figura 31 da página 58. A massa esperada, $[M+H]^+$, para o peptídeo *stapled* GMIPw2 é de 2150,23Da. Pelo espectro, foi possível notar a presença do íon com m/z igual a 2150,365 referente ao íon $[M+H]^+$ do peptídeo, além outros íons com valores de m/z não desejados, gerados durante a síntese ou no processo de clivagem.

Na Figura 30, é apresentado o perfil cromatográfico do peptídeo bruto, obtido após reação de clivagem. A partir da análise por MS das frações, concluímos que o peptídeo de interesse não se encontra na fração majoritária e sai com tempo de retenção de 25,28 min, indicado no cromatograma. Foi possível observar também a presença de peptídeos menores com m/z iguais a 1284,799 e 1695,048, correspondentes às sequências, RRGEGSISRES₅ e RRGEGSISRES₅SLAS₅, respectivamente. A presença desses íons é justificada pela dificuldade dos acoplamentos realizados após os aminoácidos modificados.

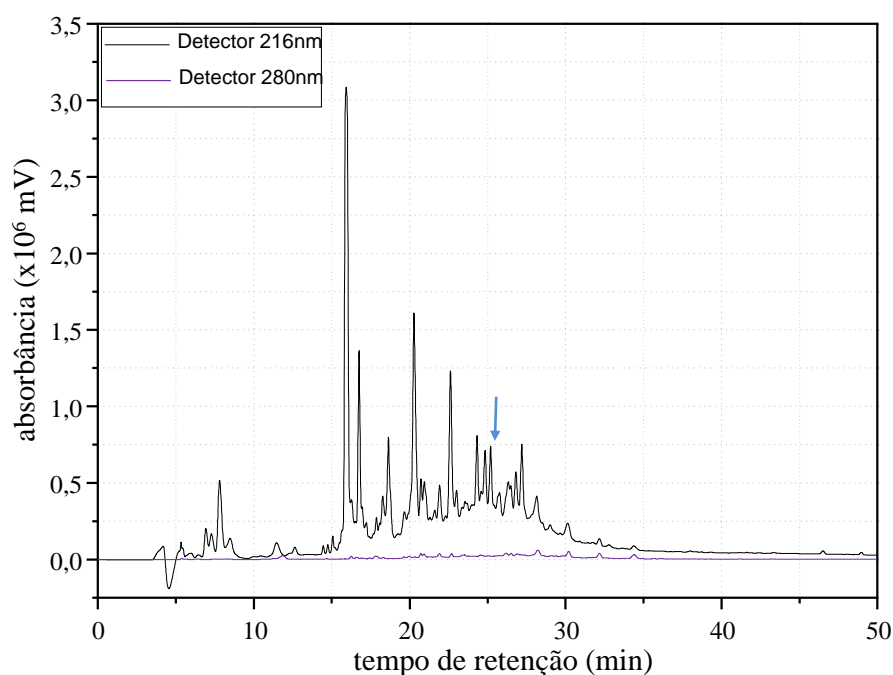


Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra bruta contendo o peptídeo GMIPw2. A seta azul indica a fração que continha apenas o peptídeo de interesse. O Peptídeo foi eluído em gradiente de 5 a 95% de acetonitrila + 1% (v/v) TFA, em coluna preparativa C18.

Para confirmar a sequência primária do peptídeo, o íon observado (m/z 2150,365) foi submetido a fragmentação. O espectro de MS/MS está representado na Figura 32.

Confirmado pelos íons y e b. Os íons b descritos na Figura 33, Página 60, confirmam a relação m/z do macrociclo gerado por S₅-ASL-S₅ com m/z igual a 521,32.

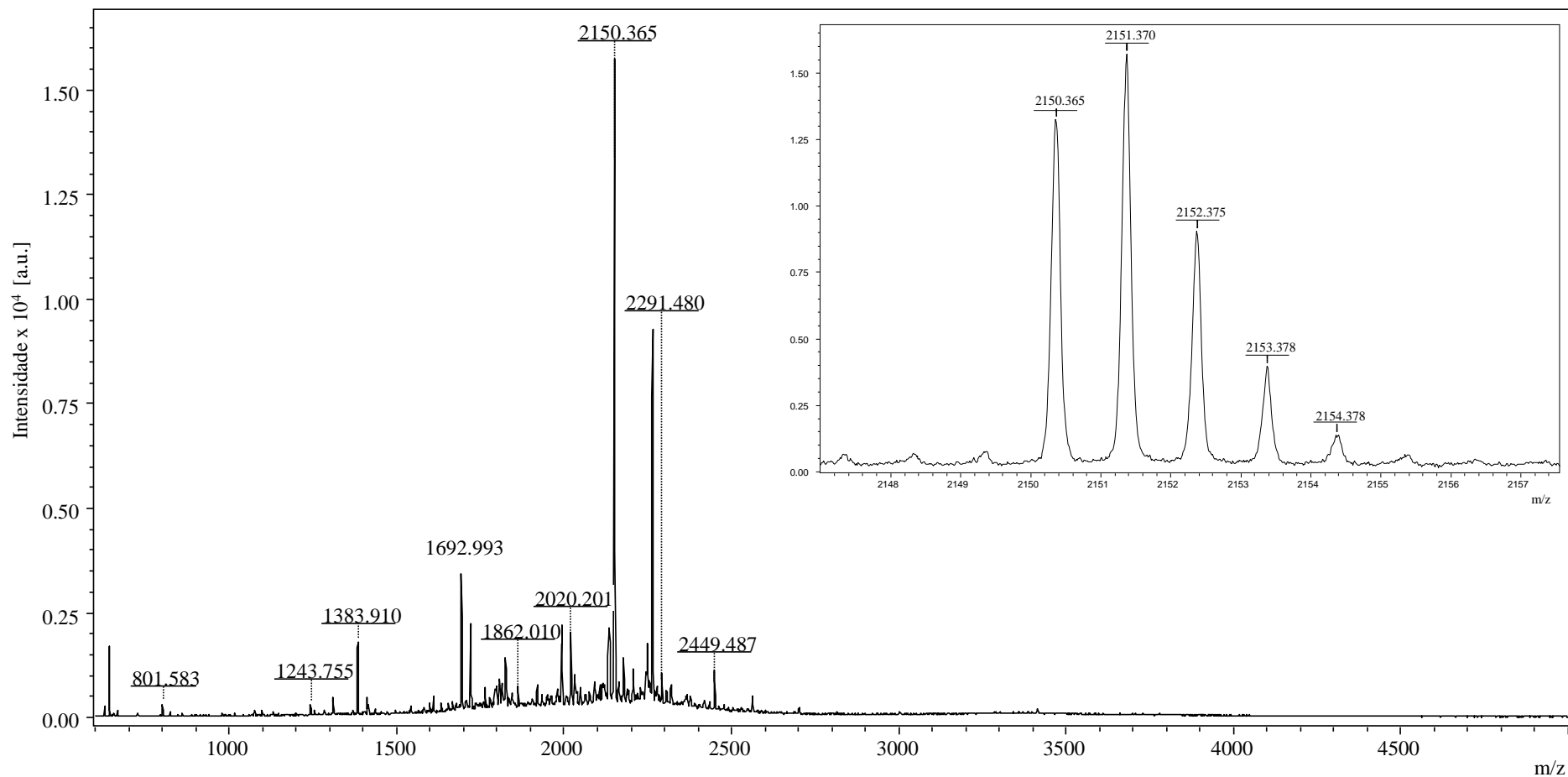


Figura 31: Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) da amostra bruta contendo o peptídeo GMIPw2 ($[M+H]^+ = 2150,365\text{Da}$). No canto superior direito da imagem trata-se da ampliação da região de m/z 2148 a 2157 destacando a presença do íon de interesse.

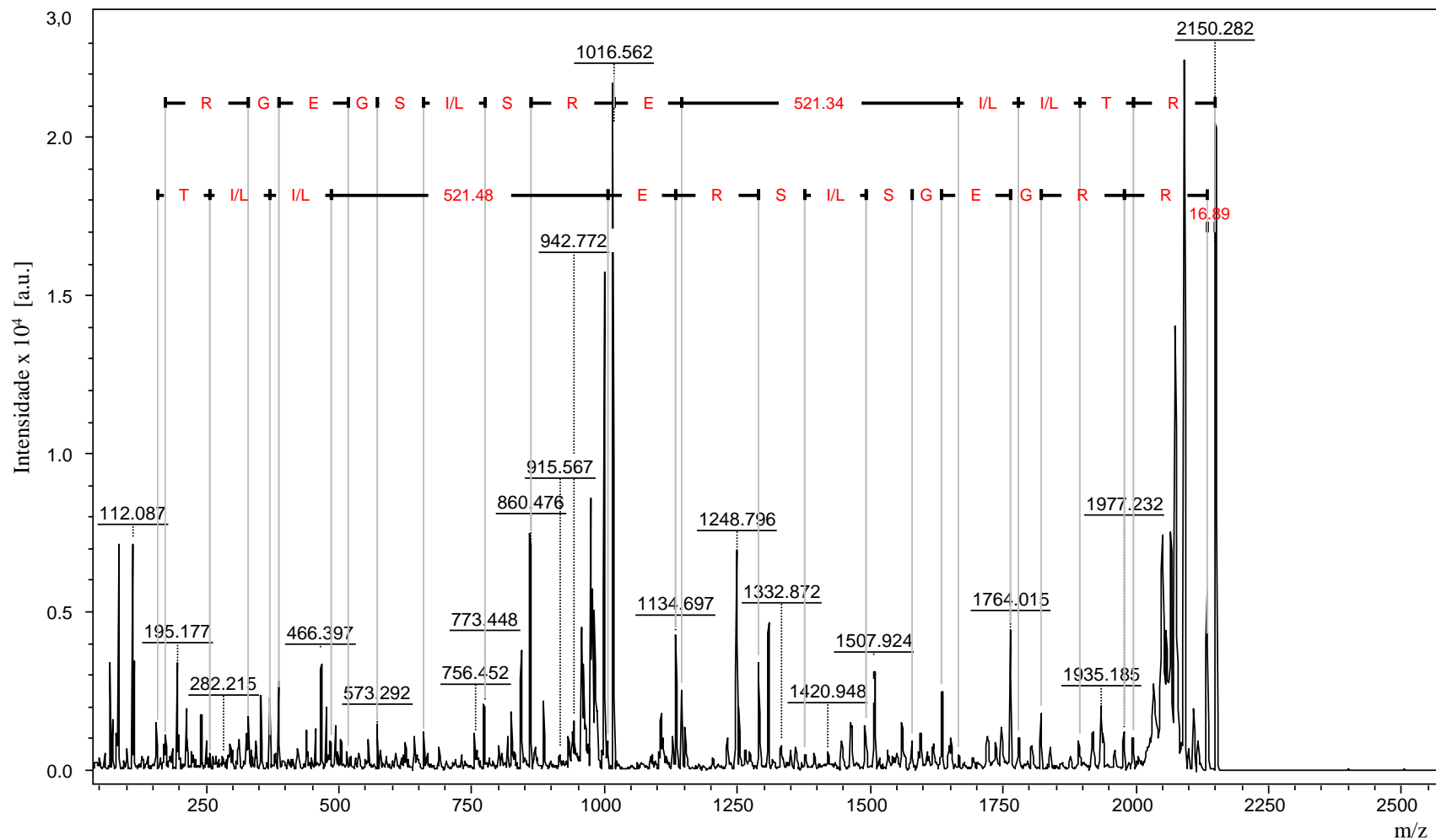


Figura 32: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo GMIPw2. O íon de m/z 521,33 corresponde ao macrociclo formado entre os resíduos S₅-A-L-S₅.

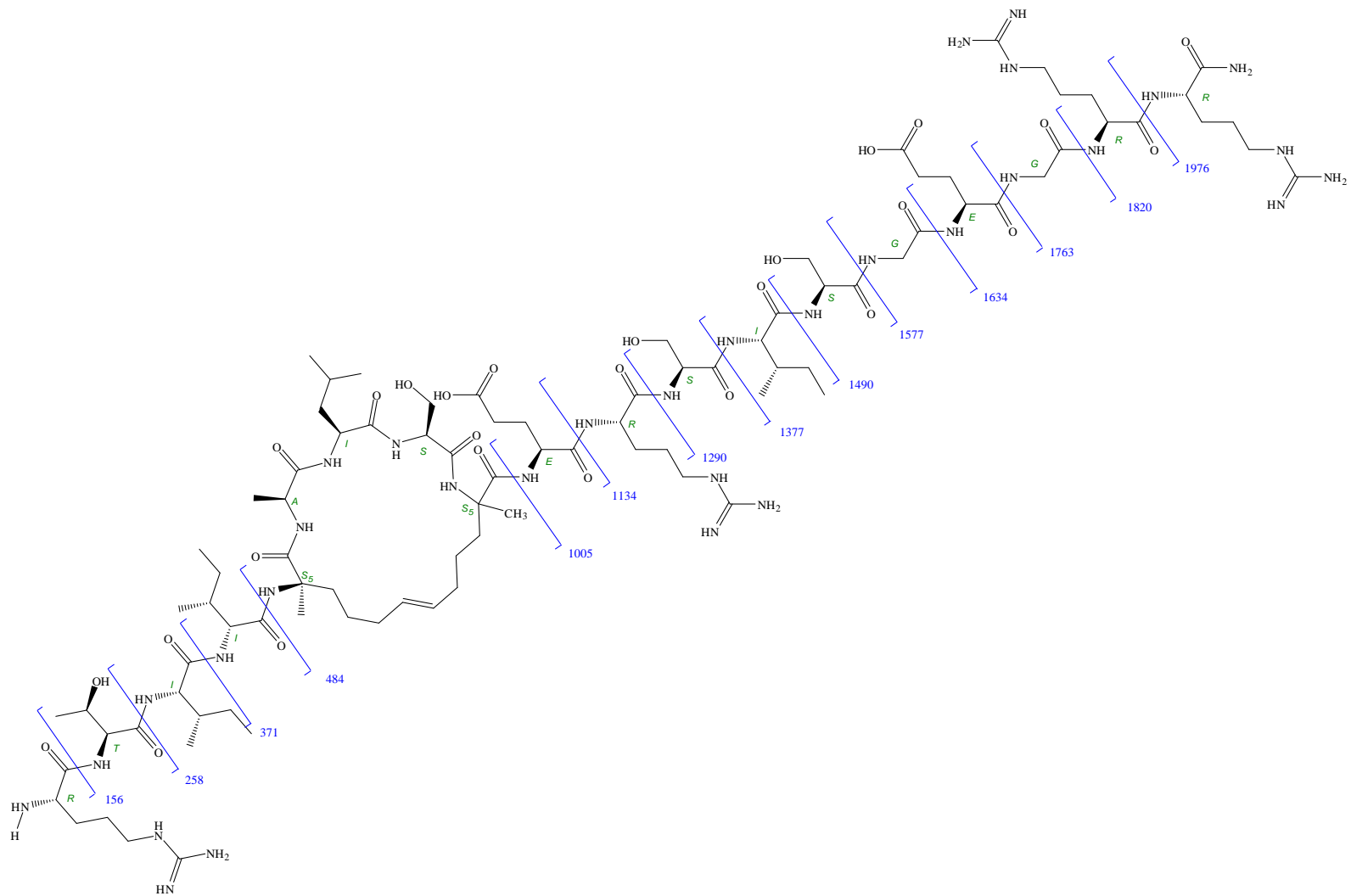


Figura 33: Sequência de aminoácidos determinada para o peptídeo GMIPw2 bem como os íons teóricos para a série b.

A síntese do peptídeo stapled GMIPw2 com a resina Wang foi realizada com o auxílio de um sintetizador automático Prelude (Protein Technologies, inc.) com a escala de 100µmol. Foram utilizados 4eq. de HBTU (agente de acoplamento), 7,6eq. da base *N*-metilmorfolina (NMM) e DMF como solvente. Todos os ciclos de acoplamentos de um novo resíduo de aminoácido foram realizados em duplicata, com tempo de 10 minutos. No caso dos aminoácidos modificados, o tempo de cada acoplamento foi de 20 minutos. Na análise EM-MALDI-TOF da amostra do peptídeo bruto, não foi identificada a presença do íon com *m/z* esperado para sequência primária do peptídeo desejado.

4.3. Caracterização das estruturas secundárias dos peptídeos

4.3.1. Análise estrutural por Dicroísmo Circular (DC)

Para um estudo inicial da conformação estrutural dos peptídeos, foram feitas análises de dicroísmo circular com dois dos peptídeos sintetizados e purificados, GMIP-NH₂ e GMIPw2, e para o peptídeo GMIP1 foi utilizada a amostra comercial.

As soluções estoque dos peptídeos foram diluídas e analisadas no espectrofotômetro com λ 205, 215 e 225 nm. Os valores de absorbâncias nesses comprimentos de onda, os fatores de diluição e as concentrações calculadas a partir das equações 1, 2 e 3 estão descritos na Tabela 4. A partir das soluções estoque foram preparadas amostras com concentrações iguais a 40µM.

Tabela 4: Dados para padronização das concentrações dos peptídeos GMIP1, GMIP-NH₂ e GMIPw2: as absorbâncias medidas para os λ 205, 215 e 225 nm, os resultados k, T e C das equações 1, 2 e 3 e a concentração final que consiste na multiplicação de C pelo fator de diluição.

	GMIP1	GMIP-NH₂	GMIPw2
A₂₀₅	0,975	0,47	1,177
A₂₁₅	0,302	0,232	0,413
A₂₂₅	0,121	0,15	0,21
Fator de Diluição	2	40	4
Concentração (mg.L⁻¹)	56,289	527,56	131,438
k (eq. 2)	26,064	11,808	29,232
T (eq. 3)	30,225	14,57	36,487
C (eq. 1)	28,1445	13,189	32,8595

Os espectros obtidos por dicroísmo circular (DC) para os 3 peptídeos sintetizados (GMIP1, GMIPNH2 e GMIPw2) estão representados na Figura 34.

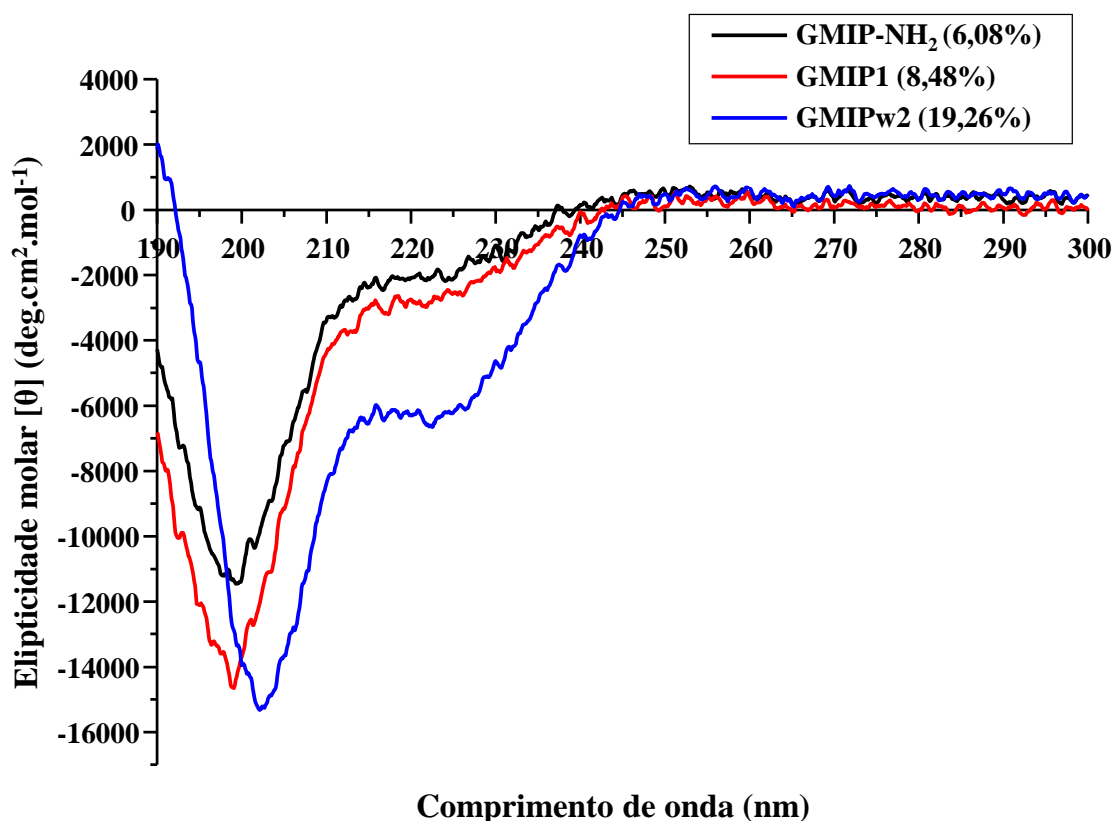


Figura 34: Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos nativos, GMIP1 (em vermelho) e GMIP-NH₂ (em preto), e para o peptídeo stapled, GMIPw2 (em azul).

Em água, os espectros de DC dos três peptídeos apresentaram um pequeno grau de estruturação; entretanto, possuem uma estrutura randômica que é caracterizada pela presença de valores negativos de elipticidades molares em comprimentos de onda inferiores a 192 nm com um valor mínimo de $[\theta]$ a 200 nm.

Os valores de porcentagem de α -hélice (Tabela 5) obtidos por cálculos de deconvolução das elipcidades molares em 222nm, $[\theta]_{222}$, confirmam a pouca tendência de formação de estrutura α -helicoidal.

Tabela 5: Dados cálculo de porcentagem de α -helicidade ($\% \alpha$) dos peptídeos analisados

	GMIP1	GMIP-NH ₂	GMIPw2
$[\theta]_{222}$	-2899,3697	-2078,2118	-6577,94868
$\% \alpha$	8,48	6,08	19,26

O peptídeo *stapled* possui maior grau de estruturação em α -hélice quando comparado com os peptídeos sem modificações (19,26%, Figura 34, linha azul). Entretanto, é descrito na literatura valores maiores de helicidade para peptídeos *stapled* quando comparados aos nativos, ou seja, dependendo da posição do *crosslink* na estrutura do peptídeo é possível alcançar maiores porcentagens de α -helicidade. Desta forma, é necessário testar todas as diferentes posições possíveis para a inserção do *crosslink* no peptídeo GMIP1, a fim de verificar qual a configuração que fornece um maior aumento na estruturação do peptídeo.

Entre os peptídeos GMIP1 e GMIP-NH₂ não foi possível identificar uma diferença significativa entre os seus teores de helicidade.

Não foi possível realizar experimentos de DC com variação de temperatura e de pH para avaliar a diferença de estabilidade dos peptídeos.

5. Conclusões e perspectivas

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer a melhor metodologia da síntese manual de peptídeos e peptídeos *stapled* em fase sólida. De fato, foram realizadas 11 tentativas de síntese que permitiram o aperfeiçoamento da estratégia e a obtenção dos três peptídeos GMIP1, GMIP-NH₂ e GMIPw2.

As sínteses dos peptídeos GMIP1 e GMIP-NH₂ apresentaram dificuldades nos acoplamentos a partir do nono resíduo de aminoácido justificadas pela agregação do peptídeo na resina. A adição de Triton-X-100, detergente aniônico, diminuiu a agregação e permitiu a finalização da síntese. Os estudos da síntese mostraram que HATU apresentou melhores resultados de acoplamentos.

Os resultados mostraram que a posição dos aminoácidos modificados (com espaçamento $i, i+4$), o tamanho do *crosslink* formado (com oito átomos de carbono) e a estereoisomeria do carbono- α (S₅) permitiram a síntese do peptídeo *stapled* GMIPw2 e a realização da RCM. Apesar dos diversos subprodutos encontrados na amostra bruta, foi possível purificar e caracterizar o peptídeo de interesse. A análise de MS/MS permitiu a confirmação da presença e a posição do macrociclo. A partir dos dados de cromatografia, não foram encontradas quantidades significativas do íon de m/z 2179,23, referente ao peptídeo GMIPw2 aberto, em nenhuma das frações.

A inserção de um *crosslink* no peptídeo GMIP1 teve como objetivo estabilizar a porção 1 (*N*-terminal), região sem estrutura definida nos ensaios de dinâmica molecular. Os espectros de dicroísmo circular confirmaram a estrutura randômica para os três peptídeos, mas um maior grau de estruturação foi observado para o peptídeo *stapled*.

Para verificar se o aumento na helicidade foi resultado da restrição presente no *stapled*, deverão ser realizadas as análises comparativas de estruturas entre os peptídeos análogos, GMIPw2 e GMIPw0, sendo que o último possui alaninas no lugar dos resíduos de aminoácidos olefínicos; e entre os peptídeos GMIPw2 e GMIPw2 sem a RCM, a fim de verificar se a simples adição dos aminoácidos α, α -dissubstituídos aumentaria o teor de helicidade.

Sabe-se que as atividades biológicas e estabilidade desses peptídeos não estão relacionadas apenas com teores de helicidades ótimas. Vários outros fatores também contribuem para penetrabilidade celular, como a sequência dos peptídeos, sua carga positiva, sua interação com a membrana e a posição e composição do *crosslink* (BIRD et al., 2016). Portanto, devem ser realizados mais testes para verificar a estabilidade

conformacional do peptídeo *stapled* e sua penetrabilidade celular comparado aos seus análogos.

Após a finalização das purificações, serão realizados ensaios com nucleossomos *in vitro*, bem como ensaios de deslocamento térmico a fim de verificar se a amida na porção C-terminal modifica as interações já descritas do peptídeo GMIP1. E, também, se a presença do *staple* na estrutura do peptídeo interfere nesses mesmos ensaios.

Com o foco no desenvolvimento da química sintética orientada para maximização das afinidades de ligação em regiões específicas da superfície nucleossomal, faz-se necessário um estudo mais amplo do ponto de vista estrutural desses peptídeos.

6. Referências:

- ARGUELLES, A. O.; MERUVU, S.; BOWMAN, J. D.; CHOUDHURY, M. Are epigenetic drugs for diabetes and obesity at our door step? **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 3, p. 499–509, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644615004535>>.
- ARMACHE, K.-J.; GARLICK, J. D.; CANZIO, D.; NARLIKAR, G. J.; KINGSTON, R. E. Structural Basis of Silencing: Sir3 BAH Domain in Complex with a Nucleosome at 3.0 Å Resolution. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 977–982, 2011.
- BARBERA, A.; CHODAPARAMBIL, J.; KELLEY-CLARKE, B.; JOUKOV, V.; WALTER, J.; LUGER, K.; KAYE, K. The Nucleosomal Surface as a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. February, p. 856–862, 2006.
- BARTMAN, C. R.; BLOBEL, G. B. Perturbing Chromatin Structure to Understand Mechanisms of Gene Expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. LXXX, 2015.
- BEAUCHEMIN, C.; MOERKE, N. J.; FALON, P.; KAYE, K. M. Assay Development and High-Throughput Screening for Inhibitors of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus N-Terminal Latency-Associated Nuclear Antigen Binding to Nucleosomes. **Journal of biomolecular screening**, v. 19, n. 6, p. 947–958, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518064>>.
- BENOITON, N. L. **Chemistry of peptide synthesis**. Canada: CRC Press, 2006.
- BERGMAN, Y. E.; BORGO, M. P. Del; GOPALAN, R. D.; JALAL, S.; UNABIA, E.; CIAMPINI, M.; CLAYTON, D. J.; FLETCHER, J. M.; MULDER, J.; WILCE, J. A.; AGUILAR, M.; PERLMUTTER, P. Synthesis of Stapled β 3 -Peptides through Ring-Closing Metathesis. **Organic Letters**, v. 11, n. 19, p. 4438–4440, 2009.
- BIRD, G. H.; CHRISTIAN CRANNELL, W.; WALENSKY, L. D. Chemical Synthesis of Hydrocarbon-Stapled Peptides for Protein Interaction Research and Therapeutic Targeting. **Current Protocols in Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 99–117, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23801563>%5Cn<http://doi.wiley.com/10.1002/9780470559277.ch110042>>.

BIRD, G. H.; MADANI, N.; PERRY, A. F.; PRINCIOTTO, A. M.; SUPKO, J. G.; HE, X. Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14093–14098, 2010.

BIRD, G. H.; MAZZOLA, E.; OPOKU-NSIAH, K.; LAMMERT, M. a; GODES, M.; NEUBERG, D. S.; WALENSKY, L. D. Biophysical determinants for cellular uptake of hydrocarbon-stapled peptide helices. **Nature chemical biology**, n. August, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547919>>.

BLACKWELL, H. E.; GRUBBS, R. H. Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 37, n. 23, p. 3281–3284, 1998.

BLACKWELL, H. E.; SADOWSKY, J. D.; HOWARD, R. J.; SAMPSON, J. N.; CHAO, J. A.; STEINMETZ, W. E.; O'LEARY, D. J.; GRUBBS, R. H. Ring-closing metathesis of olefinic peptides: Design, synthesis, and structural characterization of macrocyclic helical peptides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 16, p. 5291–5302, 2001.

CABRAL, W. F.; MACHADO, A. H. L.; SANTOS, G. M. Exogenous nucleosome-binding molecules: A potential new class of therapeutic drugs. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 707–711, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.017>>.

CHAN, W.; WHITE, P. **Fmoc solid phase peptide synthesis a practical approach**. [s.l: s.n.]

CHANG, Y. S.; GRAVES, B.; GUERLAVAIS, V.; TOVAR, C.; PACKMAN, K.; TO, K.-H.; OLSON, K. a; KESAVAN, K.; GANGURDE, P.; MUKHERJEE, A.; BAKER, T.; DARLAK, K.; ELKIN, C.; FILIPOVIC, Z.; QURESHI, F. Z.; CAI, H.; BERRY, P.; FEYFANT, E.; SHI, X. E.; HORSTICK, J.; ANNIS, D. A.; MANNING, A. M.; FOTOUHI, N.; NASH, H.; VASSILEV, L. T.; SAWYER, T. K. Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 36, p. E3445-54, 3 set. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3767549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

DIDERICH, P.; BERTOLDO, D.; DESSEN, P.; KHAN, M. M.; PIZZITOLA, I.; HELD, W.; HUELSKEN, J.; HEINIS, C. Phage selection of chemically stabilized α -helical peptide ligands Phage selection of chemically stabilized α -helical peptide ligands Institute of Chemical Sciences and Engineering , Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne , Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), Ecole Polytechnique Fédérale de Ludwig Center for Cancer Research , Department of Oncology , University of Lausanne , CH-. 2016.

DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3083–3135, 13 jun. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/cr100233r>>.

DORIGO, B.; SCHALCH, T.; BYSTRICKY, K.; RICHMOND, T. J. Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 1, p. 85–96, mar. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603000251>>. Acesso em: 9 jun. 2013.

EDAYATHUMANGALAM, R. S.; WEYERMANN, P.; GOTTESFELD, J. M.; DERVAN, P. B.; LUGER, K. Molecular recognition of the nucleosomal “supergroove”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 6864–6869, 2004.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=430414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644614003997>>.

GRUBBS, R. . **Handbook of metathesis**. [s.l: s.n.]

GRUBBS, R. H. Olefin metathesis. v. 60, n. December 1974, p. 7117–7140, 2004b.

GUARNA, A.; TRABOCCHI, A. **Peptidomimetics in organic and medicinal chemistry**. West Sussex: Wiley, 2014.

- HENCHEY, L. K.; JOCHIM, A. L.; ARORA, P. S. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the α -helical conformation. p. 22–26, 2008.
- HENDRICKSON, T. L.; CRÉCY-LAGARD, V. de; SCHIMMEL, P. Incorporation of nonnatural amino acids into proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 147–176, 2004. Disponível em:
<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.73.012803.092429%5Cnpapers2://publication/doi/10.1146/annurev.biochem.73.012803.092429>>.
- HILINSKI, G. J.; KIM, Y. W.; HONG, J.; KUTCHUKIAN, P. S.; CRENSHAW, C. M.; BERKOVITCH, S. S.; CHANG, A.; HAM, S.; VERDINE, G. L. Stitched α -helical peptides via bis ring-closing metathesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 35, p. 12314–12322, 2014.
- IVANOV, M.; BARRAGAN, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 8, p. 384–396, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.05.004>>.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.
- KALASHNIKOVA, A. A.; PORTER-GOFF, M. E.; MUTHURAJAN, U. M.; LUGER, K.; JEFFREY, C.; HANSEN, J. C. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 20121022, p. 1–9, 2013.
- KATO, H.; INGEN, H. van; ZHOU, B.-R.; FENG, H.; BUSTIN, M.; KAY, L. E.; BAI, Y. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 30, p. 12283–12288, 2011. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/content/108/30/12283%5Cnhttp://www.pnas.org/content/108/30/12283.full.pdf>>.
- KATO, H.; JIANG, J.; ZHOU, B.-R.; ROZENDAAL, M.; FENG, H.; GHIRLANDO, R.; XIAO, T. S.; STRAIGHT, A. F.; BAI, Y. A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6136, p. 1110–3, 2013a. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3763809&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KATO, H.; JIANG, J.; ZHOU, B.-R.; ROZENDAAL, M.; FENG, H.; GHIRLANDO, R.; XIAO, T. S.; STRAIGHT, A. F.; BAI, Y. A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6136, p. 1110–1113, 31 maio 2013b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763809/>>.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. v. 1751, p. 119–139, 2005.

KIM, Y.-W.; GROSSMANN, T. N.; VERDINE, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. **Nat. Protoc.**, v. 6, n. 6, p. 761–71, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.324>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637196>>.

KOROLEV, N.; ALLAHVERDI, A.; YANG, Y.; FAN, Y.; LYUBARTSEV, A. P.; NORDENSKIÖLD, L. Electrostatic origin of salt-induced nucleosome array compaction. **Biophysical journal**, v. 99, n. 6, p. 1896–905, 22 set. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jun. 2013.

LEITE, M. S. B. ESTRUTURA DA CROMATINA : AÇÃO DE DETERGENTES E BUSCA POR PEPTÍDEO IDEAL. **Dissertação**, 2013.

LESBATS, P.; SERRAO, E.; MASKELL, D. P.; PYE, V. E.; REILLY, N. O.; LINDEMANN, D. Structural basis for spumavirus GAG tethering to chromatin. **PNAS**, p. 2–7, 2017.

LI, M.; XIA, X.; LI, X.; LIU, X.; CHEN, Z. Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure. **Nature**, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22036>>.

MAKDE, R. D.; ENGLAND, J. R.; YENNAWAR, H. P.; TAN, S. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 562–566, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09321>>.

MANGOLD, S. L.; LEARY, D. J. O.; GRUBBS, R. H. Z - Selective Olefin Metathesis on Peptides: Investigation of Side- Chain Influence, Preorganization, and Guidelines in Substrate Selection. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 12469–12478, 2014.

MCGINTY, R. K.; HENRICI, R. C.; TAN, S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 591–6, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4215650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Nucleosome Structure and Function. **Chem. Rev.**, v. 115, p. 2255–2273, 2015.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Recognition of the nucleosome by chromatin factors and enzymes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 37, p. 54–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2015.11.014>>.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V.; PARK, M.; OX, A. Amide bond formation and peptide coupling. v. 61, n. 740, p. 10852, 2005.

MORGAN, M. T.; HAJ-YAHYA, M.; RINGEL, A. E.; BANDI, P.; BRIK, A.; WOLBERGER, C. Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. **Science**, v. 351, n. 6274, p. 725 LP-728, 11 fev. 2016. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/351/6274/725.abstract>>.

NG, M. K.; CHEUNG, P. A brief histone in time: understanding the combinatorial functions of histone PTMs in the nucleosome context. **Biochemistry and Cell Biology**, p. 1–10, 3 jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/bcb-2015-0031>>.

NICOLAS, J.; PIOLOT, T.; TRAMIER, M. Close but Distinct Regions of Human Herpesvirus 8 Latency- Associated Nuclear Antigen 1 Are Responsible for Nuclear Targeting and Binding to Human Mitotic Chromosomes. **Journal of virology**, v. 75, n. 8, p. 3948–3959, 2001.

PARENTY, A.; MOREAU, X.; CAMPAGNE, J. Macrolactonizations in the Total Synthesis of Natural Products. 2006.

PHAM, T. K.; YOO, J.; KIM, Y. W. Comparison of oct-2-enyl and oct-4-enyl staples for their formation and ??-helix stabilizing effects. **Bulletin of the Korean Chemical**

Society, v. 34, n. 9, p. 2640–2644, 2013.

PRADEEPA, M. M.; GRIMES, G. R.; KUMAR, Y.; OLLEY, G.; TAYLOR, G. C. A.; SCHNEIDER, R.; BICKMORE, W. A. Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. **Nature genetics**, v. 48, n. April, p. 681–686, 2016.

Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.3550>>
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27089178>>.

QIANG LIN FANG, PING CHEN, MINGZHU WANG, JUNNAN FANG, NA YANG, GUOHONG LI, R.-M. X. Human cytomegalovirus IE1 protein alters the higher - order chromatin structure by targeting the acidic patch of the nucleosome National Laboratory of Biomacromolecules , Institute of Biophysics , Chinese Academy of Sciences , Beijing , 100101 , China ; 2. n. January, p. 1–11, 2016.

RICHMOND, T. J.; RICHMOND, T. J.; DAVEY, C. a; DAVEY, C. a. The structure of DNA in the nucleosome core. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 145–50, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789217>>.

ROBERTSON, N. **Chemical biology tools to explore the activities and mechanisms of class i hdac corepressor complexes**. 2016. University of Leicester, 2016.

ROBINSON, P. J. J.; AN, W.; ROUTH, A.; MARTINO, F.; CHAPMAN, L.; ROEDER, R. G.; RHODES, D. 30 nm Chromatin Fibre Decompaction Requires both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, n. 4, p. 816–825, 2008.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. **Biomed. Mass Spectrom**, v. 11, n. 11, p. 1984, 1984.

ROUSSEL, L.; ERARD, M.; CAYROL, C.; GIRARD, J.-P. 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, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2572127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SCHAFMEISTER, C. E.; PO, J.; VERDINE, G. L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides [8]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 24, p. 5891–5892, 2000.

SILVA, I. T. G. Da. **Caracterização e desenvolvimento de moléculas ligantes de nucleossomo : impacto do colesterol e de peptídeos desenhados in silico sobre a cromatina**. 2017. Universidade de Brasília, 2017.

SILVA, I. T. G. Da; OLIVEIRA, P. S. L. De; SANTOS, G. M. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 263–269, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000401>>.

SONG, F.; CHEN, P.; SUN, D.; WANG, M.; DONG, L.; LIANG, D.; XU, R. M.; ZHU, P.; LI, G. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. **Science**, v. 344, n. 6182, p. 376–380, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24763583>>.

STYMIEST, J. L.; MITCHELL, B. F.; WONG, S.; VEDERAS, J. C. Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis. **Organic Letters**, v. 5, n. 1, p. 47–49, 2003.

TAN, S.; DAVEY, C. a. Nucleosome structural studies. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 1, p. 128–136, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jun. 2013.

VERDAASDONK, J. S.; BLOOM, K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 320–332, 2012.

VERDINE, G. L.; HILINSKI, G. J. **Stapled peptides for intracellular drug targets**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 503

VERLY, R. M. Peptídeos Antimicrobianos : Síntese, Ensaio Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos. p. 182, 2010.

VOSS, T. C.; HAGER, G. L. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 2, p. 69–81, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24342920>>.

WALENSKY, L. D.; BIRD, G. H. **Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress**. 2014.

WALENSKY, L. D.; KUNG, A. L.; ESCHER, I.; MALIA, T. J.; BARBUTO, S.;

WRIGHT, R. D.; WAGNER, G.; VERDINE, G. L.; KORSMEYER, S. J. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5689, p. 1466–70, 2004. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1360987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WU, B.; DRÖGE, P.; DAVEY, C. a. Site selectivity of platinum anticancer therapeutics. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 2, p. 110–112, 2008.

YANG, D.; ARYA, G. Structure and binding of the H4 histone tail and the effects of lysine 16 acetylation. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 7, p. 2911–2921, 2011.

ANEXO A



ELSEVIER

feature

Exogenous nucleosome-binding molecules: a potential new class of therapeutic drugs

Q1 Wanessa F. Cabral, Angelo H.L. Machado and Guilherme M. Santos, gsantos@unb.br

Constant changes in the structure of chromatin regulate gene expression. Molecules that bind to the nucleosome, the complex of DNA and histone proteins, are key modulators of chromatin structure. Conceptually, the nucleosome was first identified as a therapeutic target 14 years ago, when small molecules started to be designed for nucleosomal DNA binding. Concomitantly, emergent drugs that target enzymes that affect chromatin structure have been developed to treat myriad diseases, such as cancer and XXXX. Here, we discuss the development of more complex molecules, such as peptides and peptidomimetics, to directly target the nucleosome surface to modulate chromatin structure. This new strategy presents great challenges that need to be overcome to develop the exogenous nucleosome-binding molecules (eNBMs) as therapeutic agents.

Chromatin and nucleosome

Q4 In essence, chromatin is a macromolecular complex comprising distinct molecules. Precise stoichiometric interactions of proteins and DNA form the nucleosome, the repetitive basic unit of the chromatin. The positively charged histone proteins interact accurately with the DNA, which is highly negatively charged, providing an optimal strategy to functionally pack the genetic code inside the cell [1]. This simple process marks chromatin as an extraordinary example of molecular recognition, which, as stated by Linus Pauling seven decades ago, is the 'secret of life'.

Chromatin is highly dynamic, showing great changes in its architecture in different cellular environments. A relaxed state of local chromatin is observed when high transcriptional activities occur in the nucleus or when the genome

requires maintenance. By contrast, gene silencing is observed when chromatin is in a condensed state [2]. Indeed, the dynamics of the open (relaxed) and the closed (condensed) states provides a strategy to finely control both spatially and temporally the access of proteins to DNA and, in this way, to regulate gene expression and genome maintenance. Changes in chromatin architecture can ultimately turn genes on and off that are involved in cell growth, differentiation, and survival, which in turn modulates intracellular signaling processes.

However, this is a simplistic view, given that chromatin structure alone is not sufficient to generate predictive gene expression models [3].

The knowledge accumulated as a result of chromatin research has led to drug development focused on enzymes that dictate epige-

netic changes at histone tails, which have great impact on chromatin structure and gene expression, and, hence, can result in cellular disorders [4]. This concept of modulating chromatin architecture to prevent cellular disorders has proved to be therapeutically effective [5].

Given that drugs that indirectly regulate the dynamic of chromatin can orchestrate many signaling pathways, it is possible that molecules that directly target nucleosomes can have a profound impact on clinical phenotypic outcomes.

The view of the nucleosome as a therapeutic target has been around for more than a decade. Dervan, Luger, and Davey paved the way for the development of small molecules focused on the nucleosome. Initially, small ligands were structure based and designed to target unique

features of site-specific DNA binding in the nucleosomes [6]. Later, it was shown that intercalating alkylative compounds recognize specific sites of DNA when it is wrapped around the histones [7]. Furthermore, heavy metals cations, such as platinum, were suggested as another class of nucleosome-binding small molecules with therapeutic potential [8].

Here, we discuss the strategy of targeting the nucleosome surface at identified sites of nucleosome-binding protein (NBP) interactions with DNA and histones, to modulate chromatin dynamics with a therapeutic purpose. Importantly, we focus on the development of more complex molecules, such as peptides and peptidomimetics, that bind to the nucleosomal surface, histones, and DNA.

Modulators of chromatin architecture

It has been known for decades that chromatin dynamics is affected by NBPs, several of which have already been identified [9] (Fig. 1). In addition to NBPs, the nuclear environment comprises many compounds with recognizably

different natures that can directly bind to chromatin, such as Mg^{2+} [10] and lipids [11]. Conceivably, all these molecules can have a considerable impact on chromatin architecture. Lipids, carbohydrates, nucleic acids, and proteins perhaps represent the most interesting candidate molecules for NBMs.

Several factors determine the final chromatin structure state. Among these factors, chromatin interactions with Mg^{2+} , linker histones (H1/H5), the H4 tail, and NBPs have been extensively investigated. In addition, the post-translational modifications (PTMs) of histones have been extensively studied and have a major role in chromatin compaction [12].

Metal divalent ions

Observations from *in vitro* experiments have shown that Mg^{2+} is essential for chromatin folding [13]. Together with additional physiological molecules, such as NaCl, Mg^{2+} contributes to guiding chromatin toward more compacted structures, such as the 30-nm chromatin fiber. Similarly, Mn^{2+} and Ca^{2+} also interact

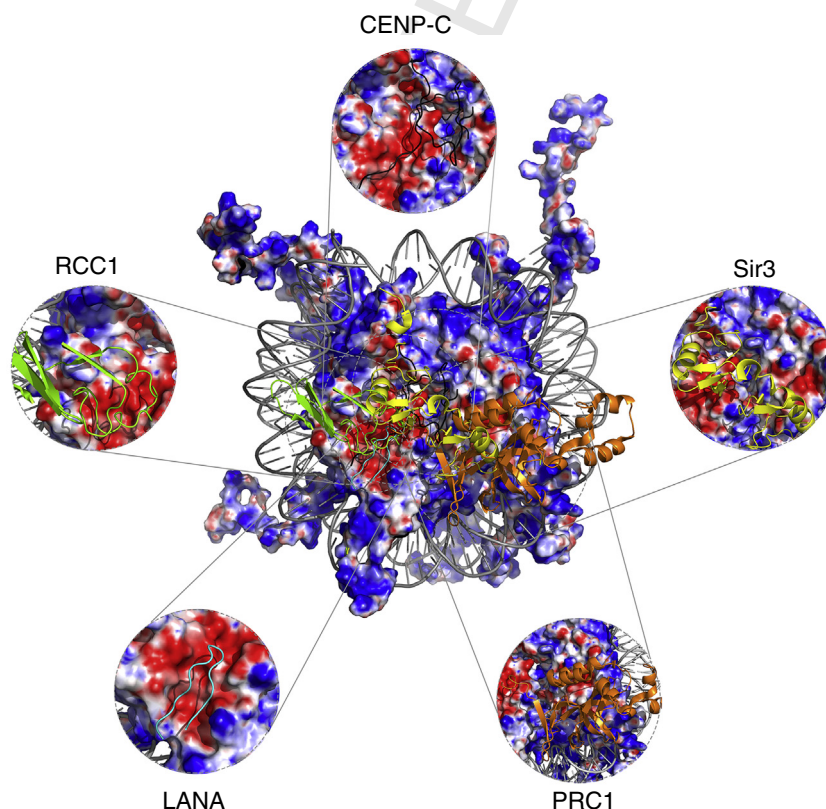
with nucleosomal DNA, suggesting that chromatin architectural changes are also defined by the fine-tuned cooperation and competition between histone tails and divalent metals in interacting with DNA [10].

Linker histones

Linker histones represent a 5th histone class that does not belong to the nucleosome core particle (NCP) and has a crucial role in gene silencing. Linker histones bind asymmetrically to the nucleosome and chromatin, enabling the chromatin to adopt a condensed structure known as the 30-nm chromatin fiber [14].

H4 tail and PTM

The N terminus domain of H4 is well characterized as a principal regulator of chromatin compaction. When deacetylated, the H4K16 residue interacts with a specific region on the surface of an adjacent nucleosome. In turn, it can bring the nucleosomes closer together, leading to gene silencing. By contrast, acetylated K16 presents a negative charge that prevents its



Drug Discovery Today

FIGURE 1

The charged surface of a nucleosome. The regions in red with a negative charge density and in blue with a positive charge density show the interaction of the nucleosome-binding proteins (NBPs) with the nucleosome surface. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen (LANA) [Protein Data Bank (PDB) 1ZLA]; Regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) (PDB 3MVD); Polycomb repressive complex 1 (PRC1) (PDB 4R8P); Centromere protein (CENP-C) (PDB 4X23); and Domain silent information regulator (Sir3) (PDB 3TU4). The charged nucleosome surface was generated using APBS tools 2.1 in PyMOL with structures from PDB converted in PQR (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_1.9.0/).

domain from binding to acid regions on the nucleosome surface [15].

Understanding NBPs for designing eNBMs

How do NBPs work? Their actions are dependent not only on the impact on the nucleosome surface, but also on their ability to recruit proteins with enzymatic activities, which in turn must be able to modulate chromatin architecture and regulate gene expression. Currently, seven atomic structures of nucleosome–NBP complexes have been revealed [16–22]. After mapping all the interactions between NBP and the nucleosome surface, it is noticeable that the acidic patch is the main target, becoming a highly competitive site for NBPs [23]. It is also noticeable that other regions on the nucleosome

are used by NBPs to anchor chromatin, leading to specific chromatin states (Fig. 1).

Thus, we can hypothesize that competition among many proteins for the nucleosome is specific and dictates the transcriptional outcome. Ultimately, the concentration and binding affinities of NBPs will be important to consider when evaluating local chromatin structure.

As mentioned above, the acidic patch is an important region for protein interaction; however, it is not the only site where NBPs can bind to the nucleosome. As observed in recently published map [XX], regions around the acidic patch can also be found on the nucleosome surface, which can be directly correlated with chromatin condensation.

These results highlight the importance of understanding at the atomic level how NBPs bind to the nucleosome surface and the resulting chromatin state. In addition to the ability of NBPs to recruit chromatin modulators, it would be informative to determine the impact of these interactions on the nucleosome structure: would only a few contacts with the amino acids of an NBP change the nucleosome stability? Is there any region on the nucleosome surface that would render the nucleosome more vulnerable or less stable?

Chemistry of eNBMs: peptides and peptidomimetics

To target the nucleosome surface, the search for new chemical entities that can interact with the

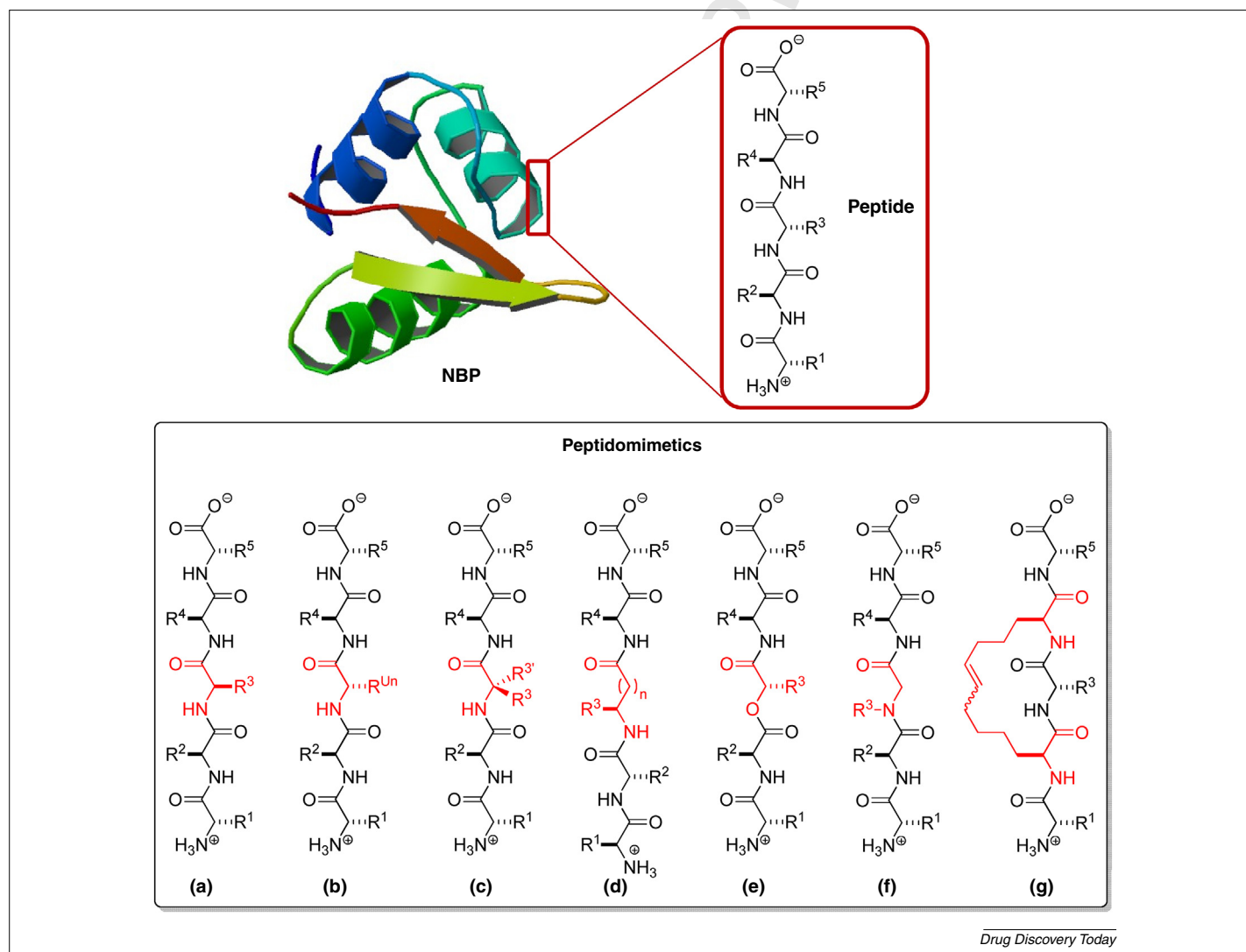


FIGURE 2

Peptides and peptidomimetics based on the structure of a nucleosome-binding protein (NBP) can be used as template to develop new exogenous nucleosome-binding molecules (eNBMs). The peptidomimetics usually differ from the original peptide in terms of the configuration of their stereogenic center (a), chemical nature of the side chains (b), the introduction of a quaternary chiral center at the carbon atom bonded to the amino group (c), the position of the amino group (d), the replacement of an amidic peptide bond by an ester linkage (peptoides) (e), repositioning the amino acid side chain from $C\alpha$ to $N\alpha$ (depsipeptide) (f), or crosslinking spatially close amino acids with covalent bonds (staple peptides) (g).

binding region of an NBP seems to be a reasonable strategy. Given that a large library of small molecules has proven to be disappointing in terms of outcompeting the LANA peptide [24], which binds to the acidic patch, it is reasonable to consider that more complex molecules are needed to act on the nucleosome surface; thus, peptides and peptidomimetics, which are chains of amino-acid monomers, might be more effective eNBMs.

Observations from the nucleosome–NBP crystallographic structures available show that, at the atomic level, the most important amino acids of a NBP make contact with the nucleosome surface to form a supramolecular aggregate. This suggests that these amino acids should be kept in the proposed molecular scaffold when designing eNBMs (Fig. 1).

In addition to the potential molecular recognition by the nucleosome surface as a result of the structural similarity between the peptides and NBPs, the peptide strategy has other advantages compared with nonpeptide small molecules. For example, automated peptide synthesis provides a straightforward preparation method for new chemical members of a desired peptide library and allows high-throughput screening of their affinity to the nucleosome-binding sites [25].

The use of peptides as therapeutic drugs has shown great promises because of their high specificity and efficacy [26]. Nevertheless, peptide-based therapy has important challenges to overcome, such as low cell penetration, and proteolysis and aggregation in the cell. To circumvent these issues, the replacement of some amino acids of the proposed peptide by non-natural ones or the cross-linking of spatially close amino acids by covalent bonds are approaches that have been used to produce peptidomimetic molecules [27].

The approaches to produce peptidomimetic molecules rely on the use of non-natural amino acids directly during automated peptide synthesis and the coupling of amino acids or small peptides by multicomponent reactions to yield peptoides and depsipeptides [28,29]. Non-natural amino acids usually differ from natural amino acids in terms of the configuration of their stereogenic center (Fig. 2a), the chemical nature of their side chains (Fig. 2b), the introduction of a quaternary chiral center at the carbon atom bonded to the amino group (Fig. 2c), or the position of the amino group (Fig. 2d). The most important multicomponent reactions are Passerini and Ugi. The Passerini reaction produces a class of peptidomimetic called ‘depsipeptides’, which have at least one amidic peptide bond

replaced with an ester linkage (Fig. 2e). The Ugi reaction results in the synthesis of peptoides, a class of peptidomimetic molecules in which at least one of the natural amino acids is replaced by an isomer that has the side chain repositioned from $C\alpha$ to $N\alpha$ (Fig. 2f) [30].

The crosslinking of spatially close amino acids by covalent bonds is also an important strategy to avoid the action of peptidases and proteases, which work by disrupting the secondary and tertiary 3D structure of peptides. A hydrocarbon crosslink retains the peptides in an α -helical conformation, a secondary structure found at the interface of a large number of protein–protein interactions. The crosslinked peptides, also called ‘staple peptides’ (Fig. 2g), can preserve their 3D arrangement and stay stable against proteases activities. Another advantage of staple peptides is their higher membrane permeation ability resulting from their spatial arrangement compared with that of non-crosslinked peptides [31,32].

Concluding remarks

Here, we have focused on the nucleosome surface, histone, and DNA as therapeutic targets. Instead of targeting the nucleosomal DNA with small molecules, we have shown that the use of peptides and peptidomimetics, in terms of their binding to the acidic patch and other regions on the nucleosome surface, offers great therapeutic opportunities.

What to expect from eNBMs

First, it is important to predict how chromatin will respond to a molecule that occludes the acidic patch, or other regions on the nucleosome surface, which are main sites for NBP interactions. As hypothesized elsewhere [9], it is possible that chromatin will adopt a condensed state that is more susceptible to changes when the charges of the acidic patch are neutralized by eNBMs, because this will inhibit the repulsion between the adjacent nucleosomes. This would differ from the compacted chromatin that results from NBP action or H4 tail interactions. Given that compacted structures are less susceptible to transcriptional activities, gene silencing is expected to occur at many regions in the genome. Therapeutically, eNBMs have the potential to cause local transcriptional shut down in local genome regions where overexpression is occurring, inhibiting the expression of active genes that could be causing cellular malfunctions.

One of the big challenges ahead is the lack of selectivity, which could lead to complex downstream effects. However, the development of synthetic chemistry focused on different binding

affinities and targeting specific regions on the nucleosome shows promise in terms of overcoming such therapeutic barriers. Moreover, eNBMs that can recognize post-translational marks on the nucleosome and histone variants will be desirable.

Many NBMs with unanticipated impacts on chromatin architecture remain to be identified and their mode of binding to the nucleosome to be characterized. Moreover, fluctuations in the level of NBMs in the nuclear environment and the constant changes in their binding to chromatin are still to be determined. It will be important to understand the nuclear circadian rhythms under a variety of physiological conditions of the compounds involved to enable us to define the range of concentration of NBMs in a cell in a specific state. Such information will be crucial for better understanding the principles governing gene expression and the consequent clinical phenotypic outcomes, which would facilitate the clinical development of eNBMs.

Acknowledgements

The authors are grateful to Carlos Pantoja for critical reading of the manuscript and Isabel Silva for graphical assistance.

References

- Richmond, T.J. *et al.* (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145–150
- Voss, T.C. and Hager, G.L. (2014) Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* 15, 69–81
- Bartman, C.R. and Blobel, G.B. (2015) Perturbing chromatin structure to understand mechanisms of gene expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.2015.80.027359>
- Ivanov, M. *et al.* (2014) Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 384–396
- Arguelles, A.O. *et al.* (2015) Are epigenetic drugs for diabetes and obesity at our door step? *Drug Discov. Today* <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.12.001>
- Edayathumangalam, R.S. *et al.* (2004) Molecular recognition of the nucleosomal ‘super groove’. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6864–6869
- Davey, G.E. *et al.* (2009) DNA stretching in the nucleosome facilitates alkylation by an intercalating antitumour agent. *Nucleic Acids Res.* 38, 2081–2088
- Wu, B. *et al.* (2008) Site selectivity of platinum anticancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 4, 110–112
- da Silva, I.T.G. *et al.* (2015) Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 263–269
- Tan, S. and Davey, C.A. (2011) Nucleosome structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 128–136
- Albi, E. *et al.* (2013) Nuclear lipid microdomain as place of interaction between sphingomyelin and DNA during liver regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6529–6541
- Ng, M.K. and Cheung, P. (2015) A brief histone in time: understanding the combinatorial functions of histone PTMs in the nucleosome context. *Biochem. Cell Biol.* 94, 33–42

- 13 Finch, J.T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1897–1901
- 14 Song, F. *et al.* (2014) Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science* 344, 376–380
- 15 Robinson, P.J.J. *et al.* (2008) 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J. Mol. Biol.* 381, 816–825
- 16 Kato, H. *et al.* (2013) A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science* 340, 1110–1113
- 17 Barbera, A.J. *et al.* (2006) The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856–861
- 18 Armache, K.-J. *et al.* (2011) Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 977–982
- 19 Makde, R.D. *et al.* (2010) Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* 467, 562–566
- 20 Roussel, L. *et al.* (2008) Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 9, 1006–1012
- 21 Kato, H. *et al.* (2011) Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12283–12288
- 22 McGinty, R.K. *et al.* (2014) Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591–596
- 23 Kalashnikova, A.A. *et al.* (2013) The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *J. R. Soc. Interface* 10, 1–9
- 24 Beauchemin, C. *et al.* (2014) Assay development and high-throughput screening for inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus N-terminal latency-associated nuclear antigen binding to nucleosomes. *J. Biomol. Screen.* 19, 947–958
- 25 Li, J. *et al.* (2015) Synthesis of many different types of organic small molecules using one automated process. *Science* 347, 1221–1226
- 26 Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today* 20, 122–128
- 27 Guarna, A. and Trabocchi, A. (2014) *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry*. Wiley
- 28 Hendrickson, T.L. *et al.* (2004) Incorporation of nonnatural amino acids into proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 147–176
- 29 Kwon, I. and Lim, S.I. (2013) Non-natural amino acids for protein engineering and new protein chemistries. *Macromol. Chem. Phys.* 214, 1295–1301
- 30 Dömling, A. *et al.* (2012) Chemistry and biology of multicomponent reactions. *Chem. Rev.* 112, 3083–3135
- 31 Lin, Y.A. *et al.* (2009) Olefin metathesis for site-selective protein modification. *ChemBiochem* 10, 959–969
- 32 Schafmeister, C.E. *et al.* (2000) An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5891–5892

Wanessa F. Cabral
Angelo H.L. Machado
Guilherme M. Santos *

Laboratory of Molecular Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of BrasiliaQ2, Brasilia, Brazil

*Corresponding author:

UNCORRECTED PROOF