

## Síntese e caracterização de inibidores da deadenilase CAF1 (CNOT7) humana

Carolina Terassi\*, Hugo M. Shimo, Thiago A. do Nascimento, Silvana A. Rocco, Celso E. Benedetti.

### Resumo

A proteína CAF1 desempenha função importante no controle da expressão gênica, pois participa do processo de deadenilação da cauda poli(A) de RNA mensageiros (mRNAs), contribuindo assim para a degradação das moléculas de mRNAs. Estudos recentes mostraram uma correlação entre a atividade da proteína CAF1 humana (hCAF1) e a progressão de alguns tumores. Com o objetivo de caracterizar a atividade exonucleásica 3'-5' de hCAF1, hCAF1 foi expressa em bactéria e purificada por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Constatou-se que a atividade exoribonucleásica 3'-5' de hCAF1 requer um íon  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  e que a mesma é específica para sequências de poliadenina. Com o objetivo de identificar compostos orgânicos que possam inibir a atividade de deadenilase de hCAF1, derivados de quinazolininas foram sintetizados e um dos compostos obtidos inibiu a atividade de hCAF1. Com base na estrutura desse composto, novos inibidores estão sendo sintetizados.

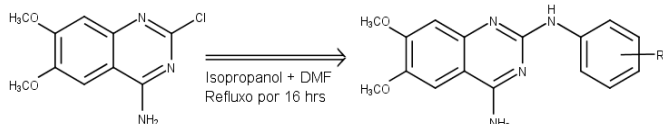
**Palavras-chave:** CAF1; derivados de quinazolininas; inibição enzimática; síntese orgânica.

### Introdução

A proteína CAF1, também conhecida como CNOT7, faz parte do complexo CCR4-NOT que regula a degradação de mRNAs na célula por um processo conhecido como deadenilação da cauda poli(A) do mRNA. Estudos recentes indicam que a atividade enzimática de hCAF1 é requerida para a promoção de metástase. Assim, hCAF1 surge como é um importante alvo terapêutico. Além disso, inibidores de CAF1 com especificidade e potência desejadas ainda não foram descritos para nenhum membro da família CAF1<sup>[1]</sup>. Assim, esse trabalho tem como objetivo principal a identificação de novos inibidores de hCAF1, com ênfase em compostos derivados de anilinoquinazolininas. Análogos de anilinoquinazolininas são amplamente conhecidos por apresentarem diversas propriedades biológicas como anticâncer, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e antidiabética entre outras.<sup>[2]</sup>

### Resultados e Discussão

Derivados de 2-anilinoquinazolinina foram sintetizados pela reação da 4-amino-2-cloro-6,7-dimetoxiquinazolinina com a anilina correspondente sob as condições descritas na figura 1. Os compostos foram caracterizados através das análises de seus espectros de RMN e de medidas de ponto de fusão.

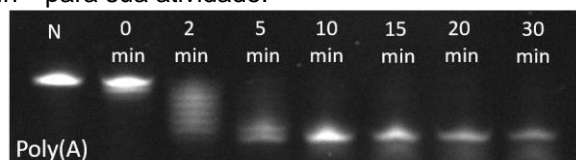


**Figura 1.** Etapa para a síntese de derivados de 2-anilinoquinazolininas (R= F, Cl, Br, I, benzilóxi, OCH<sub>3</sub> e outros).

A proteína hCAF1 recombinante foi expressa em *E. coli* e purificada por cromatografias de afinidade e gel filtração. Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão HEPES 20mM, pH 7.4 contendo 150 mM NaCl, 2 mM do íon metálico, 1 mM de DTT, 0.4  $\mu$ M de CAF1 e 2  $\mu$ M da sonda de RNA marcada com fluoresceína na porção 5'.

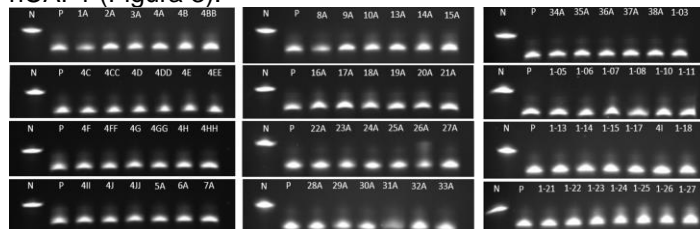
A atividade exoribonucleásica 3'-5' de hCAF1 sobre diferentes sondas de RNA contendo uma cauda poli(A), poli(G), poli(C) ou poli(U) foi avaliada em gel de sequenciamento de DNA. Verificou-se que hCAF1

apresenta atividade exoribonucleásica 3'-5' sobre RNA poli(A) (Figura 2), sendo portanto uma deadenilase. Além disso, verificou-se que hCAF1 requer o íon metálico  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  para sua atividade.



**Figura 2.** Atividade de hCAF1 sobre RNA poli(A). Nota-se que em 10 min a enzima degrada a cauda poli(A).

Ensaio de deadenilação foram realizados na presença de anilinoquinazolininas na concentração de 80  $\mu$ M, e um dos compostos, 26A, inibiu a atividade de hCAF1 (Figura 3).



**Figura 3.** Ensaio de atividade na presença de possíveis inibidores. O ensaio de atividade foi feito controle negativo (sem hCAF1), controle positivo (com hCAF1) e na presença de inibidor em concentração de 80  $\mu$ M.

### Conclusões

A hCAF1 é uma deadenilase dependente de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . O composto 26A inibiu a atividade de deadenilase de hCAF1 e sua estrutura será utilizada como base para síntese de novas moléculas. Tais moléculas serão testadas quanto as suas propriedades biológicas.

### Agradecimentos

Ao Laboratório Nacional de Bociências do CNPEM e à FAPESP pelo suporte financeiro (2017/07641-2).

<sup>1</sup> Faraji F, Hu Y, Yang HH, Lee MP, Winkler GS, Hafner M, Hunter KW. (2016) Post-transcriptional Control of Tumor Cell Autonomous Metastatic Potential by CCR4-NOT Deadenylation CNOT7. *PLoS Genet.* 12, e1005820.

<sup>2</sup> Rewcastle, G. W.; Denny, W. A.; Showalter, H. D. H. (2000) Synthesis of 4-(Phenylamino)pyrimidine Derivatives as ATP-Competitive Protein Kinase Inhibitors with Potential for Cancer Chemotherapy. *Curr. Org. Chem.* 4, 679-706.