



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2010

**Hugo Branco
Cardoso**

**MARCADORES EPIGENÉTICOS EM CÉLULAS HC11
DIFERENCIADAS E NÃO DIFERENCIADAS**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2010

**Hugo Branco
Cardoso**

MARCADORES EPIGENÉTICOS EM CÉLULAS HC11 DIFERENCIADAS E NÃO DIFERENCIADAS

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Bio-moleculares, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Francisco Amado e do Doutor Rui Vitorino do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Carmen de Lurdes Fonseca Jerónimo
professora associada convidada do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
investigador associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor Francisco Amado e Doutor Rui Vitorino, agradeço a disponibilidade prestada e a motivação dada para obter resultados até ao final da tese.

À Professora Doutora Rita Ferreira, agradeço toda a disponibilidade e ajuda prestada, tanto no trabalho laboratorial como na revisão da minha tese.

À Doutora Luísa Helguero pela ajuda e ensinamentos prestados para a cultura de células.

A todo o grupo de espectrometria de massa, pelo ótimo ambiente de trabalho, amizade e entreaajuda.

A todos os meus amigos e amigas que me ajudaram a descontraír e a estar de bom humor, ao longo do ano decorrido.

E por fim, à minha família por me ter permitido chegar até onde estou.

palavras-chave

cancro da mama, proteoma nuclear, histonas, PTMs, espectrometria de massa, electroforese

resumo

Este estudo teve como objectivo caracterizar as alterações do proteoma nuclear da linha celular HC11, um modelo utilizado no estudo do cancro da mama, durante o seu processo de diferenciação. No sentido de avaliar a variação do perfil de modificações pós-traducionais em histonas com o processo de diferenciação, procedeu-se à purificação de núcleos e isolamento de histonas de células HC11 stem-cell like e diferenciadas. O perfil de modificações pós-traducionais em histonas foi analisado com recurso a HPLC-ESI-MS/MS e nanoLC-MALDIMS/MS, após digestão com tripsina e Glu-C, tendo-se identificado um total 36 variantes de histonas e 2659 modificações, 99% das quais com um espectrómetro de massa do tipo trapa linear com fonte de electrospray. A diminuição do grau de acetilação nas classes de histonas H3 e H4, detectada por AUT-PAGE, a diminuição do número de resíduos de aminoácidos acetilados e o aumento dos metilados em H3 e H4, a presença do resíduo trimetilado H3K27 apenas nas células diferenciadas, a identificação da H3K9 acetilada e de H3K4 dimetilada apenas nas células estaminais suportam a noção de que o grau de diferenciação celular traduz-se por uma diminuição da capacidade de expressão génica. No entanto, o número mais elevado de PTMs diferentes observado no N-terminal da H4 sugere uma importante, e ainda desconhecida, contribuição desta classe de histonas na regulação epigenética. O proteoma nuclear foi analisado por electroforese bidimensional e identificaram-se, usando um MALDI-TOF/TOF, 100 proteínas distintas, 48% das quais referentes à classe da “biossíntese de DNA/RNA/Proteínas”. De entre as 5 proteínas diferentemente expressas entre as células estaminais e diferenciadas, é de salientar a maior expressão nas células diferenciadas das hnRNPs associadas ao processo de apoptose e proliferação celular. A identificação de diferenças de expressão de proteínas relacionadas com o cancro, em conjunto com modificações pós-traducionais identificadas, nomeadamente a presença de H3K9ac apenas nas células estaminais, corrobora o uso das células HC11 como modelo para o estudo do cancro da mama.

keywords

breast cancer, nuclear proteome, histones, PTMs, mass spectrometry, electrophoresis

abstract

The aim of the present work was to characterize the changes in the nuclear proteome of the cell line HC11, a model used in the study of breast cancer during their differentiation process. To assess the alterations in the post-translational modifications' profile in histones with the differentiation process, we performed the purification of nuclei and isolation of histones from HC11 stem-cell like and differentiated cells. The profile of post-translational modifications in histones was analyzed by HPLC-ESI-MS/MS and nanoLC-MALDI-MS/MS, after digestion with trypsin and Glu-C, being identified a total of 36 variants of histones and 2659 PTMs, 99% of which with a linear ion trap mass spectrometer with an electrospray source. The decrease in the degree of histone acetylation in H3 and H4 classes, analysed by AUT-PAGE, the diminished number of amino acid residues, the increase of acetylated H3 and methylated H4, the presence of trimethylated H3K27 in differentiated cells, the identification of acetylated H3K9 and dimethylated H3K4 in stem cell like support the notion that cellular differentiation is reflected by a decreased ability to gene expression. However, the highest number of PTMs observed in the N-terminal of H4 from differentiated cells suggests an important, yet unknown, contribution of this class of histone in epigenetic regulation. The nuclear proteome was analyzed by twodimensional electrophoresis and 100 distinct proteins were identified using a MALDI-TOF/TOF, 48% of which were related with "biosynthesis of DNA/RNA/Protein". Among the five proteins differentially expressed between stem-cell like and differentiated cells, it is worth of note the higher levels of hnRNPs associated with apoptosis and cell proliferation, in differentiated cells. The identification of expression differences in proteins related with cancer, together with the post-translational modifications identified, which includes the presence of H3K9ac in stem cell like, supports the use of HC11 cells as a model for the study of breast cancer.

Índice

Lista de Tabelas	III
Lista de Figuras	V
1 Introdução	1
2 Revisão da literatura	3
2.1 Reguladores estruturais da cromatina	3
2.2 Regulação da expressão génica por alterações epigenéticas	4
2.2.1 Enzimas modificadores de histonas	7
2.2.2 Controlo da diferenciação celular por modificações em histonas	12
2.2.3 Efeitos epigenéticos das variantes de histonas	13
2.2.4 Alterações epigenéticas no cancro	14
2.3 As células HC11 como modelo de estudo de cancro da mama	16
2.4 Caracterização de PTMs das histonas com recurso à espectrometria de massa	16
3 Objectivos	19
4 Material e Métodos	21
4.1 Desenho experimental	21
4.2 Cultura de células HC11 e indução da sua diferenciação	22
4.3 Purificação dos núcleos para o estudo do seu proteoma	22
4.4 Preparação das histonas para o estudo das suas PTMs	22
4.5 Caracterização das diferentes classes de histonas e seus níveis globais de acetilação por electroforese AUT-PAGE	23
4.6 Identificação das diferentes classes de histonas por electroforese bis-tris SDS-PAGE	23
4.7 Análise de proteínas nucleares por electroforese 2D-PAGE	23
4.8 Identificação de proteínas e caracterização das modificações pós traducionais por espectrometria de massa	24
4.8.1 Identificação de proteínas	24
4.8.2 Caracterização das modificações pós traducionais das histonas	25
4.8.2.1 Análise por LC-ESI-MS/MS	25
4.8.2.2 Análise por LC-MALDI-MS/MS	26
5 Resultados	27
5.1 Análise comparativa das PTMs de histonas em células HC11 SCL e diferenciadas	27

5.2	Caracterização do proteoma nuclear de células HC11 SCL e diferenciadas	32
6	Discussão	37
7	Conclusão	41
	Bibliografia	43
	Apêndices	
A	Lista de PTMs identificadas em histonas de células HC11 SCL e diferenciadas	55
B	Lista de proteínas identificadas nos géis 2D-PAGE dos núcleos das células HC11 SCL e diferenciadas	65

Lista de Tabelas

2.1	Enzimas modificadoras de histonas (1)	7
2.2	Metilação de histonas: enzimas e funções (2)	9
2.3	Lista de metiltransferases ligadas a doença (3):	10
2.4	Variantes de histonas e sua função (4)	13
4.1	Valores de massa induzidos por modificações pós-traducionais	25
5.1	Possíveis interações estabelecidas pela SAP18, de acordo com o <i>Plug-in Apid</i> do <i>Cytoskape</i>	34
5.2	Possíveis interações estabelecidas pela HDAC2, de acordo com o <i>Plug-in Apid</i> do <i>Cytoskape</i>	35
5.3	Proteínas identificadas diferentemente expressas nas células SCL e diferenciadas . . .	36

Lista de Figuras

2.1.1 O nucleossoma	3
2.2.1 Recrutamento de proteínas para as histonas (1) : (A) Domínios que reconhecem lisinas metiladas, acetiladas ou serinas fosforiladas; (B) Proteínas que se associam preferencialmente a histonas H3 e H4 modificadas.	5
2.2.2 <i>Crosstalk</i> entre modificações de histonas (1):A influência positiva de uma modificação em outra é representada setas, as influências negativas são representadas por linhas a vermelho.	6
2.2.3 Árvore filogenética de metiltransferases de histonas com domínio SET. O genoma humano codifica 48 proteínas com domínio SET, que estão representadas de acordo com a sua relação filogenética, baseada na sequência de aminoácidos do domínio SET. Para cada proteína, é fornecido o nome convencional, assim como sinónimos mais usados, o alvo específico na histona e a estrutura do domínio. A localização do domínio SET e anotação de outros domínios, são dados de acordo com a base de dados SMART. SET: <i>Suppressor de variação, Enhancer de Zeste</i> , domínio <i>Tritorax</i> ; <i>pre/post-SET</i> : motivos ricos em cisteína encontrados adjacentes a um subconjunto de domínios SET; PHd: homeodomínio <i>zinc finger</i> de planta; ANK: repetições de anquirinas (<i>ankyrin repeats</i>); <i>AT hook</i> : domínio de ligação a DNA A/T; C2H2 Znf: <i>zinc finger</i> do tipo C2H2; HMG: grupo de alta mobilidade; SANT: domínio de ligação SWI3, AdA2, N-CoR e TFIIB; CxxC: <i>zinc finger</i> CxxC; MBd: domínio de ligação CpG.	8
2.2.4 Regulação deficiente de genes supressores de tumores e oncogenes por metiltransferases de histonas (3): Pensa-se que tanto mecanismos genéticos, como epigenéticos, contribuem para o desenvolvimento de cancro. Tanto os genes supressores de tumores podem ser silenciados por modificações de histonas repressivas (A) como também a metilação e acetilação (marcas associadas a activação de transcrição) podem promover a expressão de oncogenes (B). HMT = Metiltransferase de histona; HDM = Desmetilase de histona; HAT = Acetiltransferase de histona; HDAC = Desacetilase de histona.	11
2.2.5 Resolução dos domínios bivalentes em histonas de células estaminais embrionárias, durante a diferenciação celular (5).	12
4.1.1 Esquema de trabalho experimental	21
5.1.1 Comparação da separação das classes de histonas obtidas por electroforese SDS-PAGE (a) e electroforese Bis-Tris SDS-PAGE (b)	27
5.1.2 Separação das classes de histonas das células SCL e diferenciadas por electroforese. Em (a) é apresentada uma imagem representativa do perfil de separação das diferentes classes por electroforese Bis-Tris SDS-PAGE. O perfil de densidades ópticas de cada amostra é apresentado em (b).	28

5.1.3 Distribuição relativa das modificações encontradas nos péptidos de histonas nas células SCL (a) e diferenciadas (b)	28
5.1.4 Comparação da distribuição das metilações e acetilações nos péptidos analisados das diferentes classes de histonas entre as células SCL e diferenciadas. Azul - péptidos somente acetilados; Vermelho - péptidos somente metilados; Verde - péptidos acetilados e metilados	29
5.1.5 Análise comparativa do perfil de modificações de cada classe de histonas	29
5.1.6 Localização dos resíduos de aminoácido alvo de acetilação e de mono-, di- e trimetilação na histona H3 e H4. (a) Histona H3. (b) Histona H4. (c) Legenda	30
5.1.7 Separação das classes, variantes e níveis de acetilação de histonas das células SCL e diferenciadas. Em (a) é apresentada uma imagem representativa do perfil da separação de histonas por electroforese AUT-PAGE (6). A separação electroforética obtida para a amostra SCL encontra-se na imagem (b) e para a amostra diferenciada encontra-se na imagem (c). O perfil de densidades ópticas de cada amostra é apresentado em (d).	31
5.2.1 Análise comparativa do proteoma nuclear dos estadios SCL (a) e diferenciado (b) das células HC11.(Os spots assinalados nas imagens têm correspondência na tabela 5.3)	32
5.2.2 Distribuição das proteínas identificadas por classes funcionais, segundo o GOA	32
5.2.3 Esquema das potenciais interações descritas na literatura que podem ser estabelecidas pela HDAC2 (a) e pela SAP18 (b)	33

1

Introdução

O DNA genómico dos eucariotas encontra-se compactado de forma ordenada no núcleo de forma a ocupar o mínimo espaço possível e inibir a acessibilidade a sequências específicas. O DNA é manipulado de muitas formas diferentes por ligação ao RNA e proteínas dentro de um sistema complexo designado de cromatina (7). Assim, todos os processos biológicos que requerem acessibilidade ao DNA genómico, tais como a replicação ou a transcrição, são dependentes das características precisas da cromatina nos eucariotas. Para além de desempenharem um papel crucial na estruturação do DNA, as histonas são susceptíveis a modificações pós-traducionais (PTMs) específicas que influenciam a organização da estrutura da cromatina, tais como metilação, acetilação e fosforilação (1). Os padrões de modificação presentes nestas proteínas definem um código epigenético, que marca diferentes regiões funcionais na cromatina (8; 9). Alterações neste código epigenético podem promover o desenvolvimento do cancro.

Originalmente o estudo epigenético do cancro limitava-se à análise da metilação aberrante do DNA (10; 11). Esta ideia, no entanto, evoluiu, e as metilações de DNA genómico passaram a ser incluídas num novo contexto epigenético, mais complexo, envolvendo PTMs de histonas. Evidências de alterações do padrão de PTMs de histonas, com relevância clínica, foram já descritas em células cancerígenas (12; 13). Adicionalmente, tem sido sugerido que o padrão de histonas modificadas se correlaciona com diferentes subtipos de tumores pelo que, poderá ser utilizado como factor de prognóstico (14). No entanto, a descrição compreensiva de como as modificações de histonas, isoladamente ou combinadas, se alteram em células que se diferenciam, permanece elusiva. Nesse sentido, o presente estudo foca-se na caracterização do perfil de PTMs de histonas associadas ao cancro da mama, utilizando-se para o efeito uma linha de células epiteliais da mama HC11 com diferentes graus de diferenciação e, conseqüentemente, diferentes graus de malignidade. No sentido de identificar potenciais proteínas nucleares envolvidas na regulação do perfil de PTMs das histonas, procedeu-se ainda a uma análise por 2DE-MS/MS do proteoma nuclear de células HC11 não diferenciadas (*stem cell like*) e diferenciadas.

2

Revisão da literatura

2.1 Reguladores estruturais da cromatina

Os nucleossomas (figura 2.1.1) são as unidades estruturais da eucromatina eucariótica. A sua estrutura foi descrita em 1984, com uma resolução de 7 Å (15), enquanto que o octâmero de histonas em si, foi descrito apenas em 1991, com uma resolução de 3,1 Å (16). Estas estruturas revelaram que o octâmero é composto por 3 constituintes, 2 heterodímeros H2A/H2B e um tetrâmero H3₂H4₂. Ou seja, duas moléculas de cada tipo de histonas do *core* (H2A, H2B, H3 e H4) que formam um complexo octamérico, em torno do qual se enrolam 146 pares de bases(bp) de DNA (1,8 voltas). Outra histona, H1, denominada de histona *linker*, liga-se aos segmentos de DNA que não estão em contacto directo com o octâmero de histonas, fixando o DNA no local. Esta histona cobre cerca de 20bp e suporta a formação de super-estruturas, enroladas em espiral, de 30nm de diâmetro, chamadas solenóides.

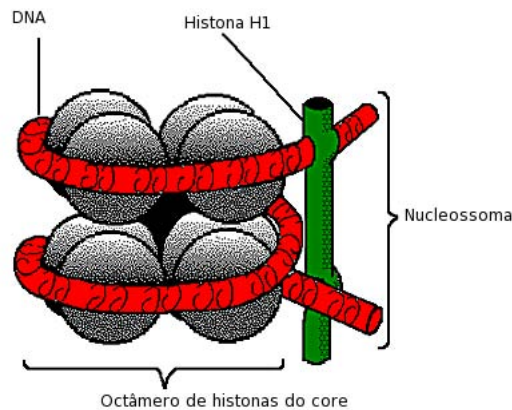


Figura 2.1.1: O nucleossoma

Estas proteínas dividem-se em duas super classes: histonas do *core* (H2A, H2B, H3 e H4) e histonas *linkers* (H1). As histonas do *core* são proteínas globulares, à excepção das suas caudas N-terminal, que possuem uma cadeia linear. Estas caudas representam aproximadamente 25-30% da massa das histonas individuais (17; 18). Com uma alta proporção de lisinas e argininas, as histonas são fortemente básicas. A sua sequência de aminoácidos quase não mudou durante o curso da evolução, como se pode observar ao comparar as sequências de histonas de mamíferos, plantas e fungos (por exemplo, as histonas H3 em humanos e trigo, diferem apenas num resíduo de aminoácido e,

apenas existem algumas diferenças entre humanos e leveduras). Também existem variações dentro da mesma classe de histonas, como H3.1 e H3.2, duas variantes de histona da classe H3 (à exceção da histona H4 em todas as outras classes já se identificaram numerosas variantes nos seres eucariontes) (19). É possível concluir que as histonas já tinham sido “otimizadas” quando o último antepassado de animais, plantas e fungos viveu na Terra (mais de 700 milhões de anos atrás). Apesar de terem ocorrido várias mutações nos genes de histonas, quase todas levaram à extinção dos organismos a que pertenciam.

No nucleossoma, as caudas das histonas (são N-terminais, por vezes C-terminais) constituídas por cerca de 20 resíduos de aminoácidos, projectam-se para fora do *core* do nucleossoma, em direcção aos nucleossomas adjacentes (20). Estas caudas são importantes na regulação da estrutura da cromatina e no controlo da expressão genética das histonas, enquanto que a transcrição de genes é iniciada pela acetilação de resíduos de lisina, na região N-terminal (21). Portanto, apesar destas caudas das histonas serem dispensáveis para a formação do nucleossoma, são necessárias para as interacções nucleossoma-nucleossoma (20), e para estabelecer a cromatina transcricionalmente repressiva, denominada de heterocromatina. Para ocorrer esta regulação da transcrição de genes, é necessário então, algo que diferencie as histonas nos diversos genes. Neste caso, a transcrição é controlada por uma série de modificações que podem ocorrer, na sua maioria em resíduos de aminoácidos pertencentes às caudas das histonas (22). Estas alterações nos resíduos de aminoácidos de histonas são consideradas alterações epigenéticas.

2.2 Regulação da expressão génica por alterações epigenéticas

Toda a complexidade e organização de um ser multicelular é originada a partir de um único zigoto. Apesar dos humanos possuírem mais de 200 tipos de células distintas, todas as células somáticas possuem os mesmo genes. Logo, a especialização das diferentes células deve ser realizada a partir do controlo da expressão (ou silenciamento) de um conjunto de genes presente dentro do genoma (3).

As histonas, assim como a cadeia de DNA, podem sofrer modificações (sem que ocorram alterações na sequência de nucleotídeos, no caso do DNA) que afectam a expressão genética. A estas modificações dá-se o nome de alterações epigenéticas. No caso particular das histonas, estas modificações podem ocorrer tanto a nível de modificações covalentes das histonas (por exemplo, a adição de grupos metilo), como a nível de substituição das histonas “genéricas” do *core* por variantes de histonas (19). No caso particular das variantes de histonas, tem-se o exemplo da histona humana H2A.X, que representa aproximadamente 10-15% das H2A's na cromatina humana, é incorporada no genoma de forma aparentemente aleatória, e possui um C-terminal mais longo que todas as outras espécies de H2A (19).

Nas histonas existem muitos locais onde podem ocorrer as modificações covalentes. Já se detectaram modificações em mais de 60 resíduos diferentes (usando anticorpos específicos ou por espectrometria de massa) (1), sendo que no caso particular da metilação de lisinas, conhecem-se 9 locais de metilação nas caudas das histonas H3 e H4 (H3K4, H3K9, H3K14, H3K27, H3K36, H3K37, H4K16, H4R23, H4K20) e, apenas 3 locais de metilação no domínio globular destas (H3K79, H3K122, H4R35) (23; 24; 25; 26; 27). No total conhecem-se 17 locais de metilação em resíduos de lisinas e 7 em resíduos de arginina (28). No entanto, existem muitas mais modificações, uma vez que cada resíduo pode ter diferentes tipos de modificação (ex: metilação, acetilação, fosforilação) e, com diferentes estados combinações. Por exemplo, as lisinas podem encontrar-se mono-, di- ou trimeti-

ladas (a trimetilação deve ser a forma mais estável (29)), enquanto que as argininas apenas se podem encontrar mono- ou di-metiladas (sendo que esta dimetilação pode ser simétrica ou assimétrica) (30; 31). Além destas possibilidades, ainda podem ocorrer diversas combinações de modificações, tanto num só nucleossoma, como em vários, descrevendo o designado “código de histonas”. Este “código de histonas” é hereditário, sendo definido como um código epigenético (32). A hereditariedade reflecte-se na passagem do código de uma célula para outra. Dado que as histonas são segregadas aleatoriamente durante a divisão celular, cada cromossoma filho deverá herdar algum tipo de histona modificada (desde que a região modificada seja suficientemente grande); o estado de modificação poderá então ser transmitido localmente às histonas recém sintetizadas (22). Como exemplo deste mecanismo, foi observado na *Saccharomyces pombe* um processo pelo qual a célula transmite o seu estado heterocromático durante a divisão celular: 1º) A metilação de H3K9 recruta Swi6 pelo seu cromodomínio; 2º) Swi6 recruta a H3K9 metiltransferase Clr4; 3º) Clr4 modifica as outras H3K9 nas histonas circundantes (33).

De acordo com o “código de histonas”, modificações distintas nas caudas de histonas, em uma ou mais classes, actuam sequencialmente, ou em combinação, de modo a formar-se uma mensagem que será lida por outras proteínas, que desencadearão acontecimentos distintos (34). Estes códigos influenciarão, de acordo com vários estudos (19; 35), a progressão do ciclo celular, a replicação e reparação do DNA, os rearranjos programados de DNA, o fenómeno de *imprinting*, as divisões de células estaminais coordenadas pelo desenvolvimento, e a estabilidade e identidade cromossómica (19). Assim, apesar da sequência de DNA ser idêntica em todos os tecidos, as modificações epigenéticas variam consoante o tecido.

Foram propostos dois mecanismos para explicar as consequências dos perfis de modificações das histonas (1). O primeiro envolve o comprometimento dos contactos entre os nucleossomas com o consequente desenrolar da cromatina. O segundo envolve o recrutamento de proteínas não histonas. No primeiro caso, as modificações afectam as interações entre as histonas e o DNA, ou entre histonas adjacentes. A modificação com maior potencial para induzir o desenrolamento da cromatina é a acetilação, que neutraliza a carga positiva do resíduo de lisina e, assim, interfere na interação entre a cadeia de DNA e a cauda da histona. Este fenómeno foi descrito por Shogren-Knaak *et al* (36), que observaram um efeito negativo da acetilação de H4K16 na formação de uma fibra de cromatina. O segundo mecanismo, descreve o recrutamento de diferentes proteínas dependendo das modificações presentes numa dada histona (figura 2.2.1), algumas com capacidade catalítica e com domínios específicos de ligação, que irão modificar ainda mais a cromatina. No caso da metilação, esta é reconhecida por domínios do tipo *chromo* da família *Royal* (*chromo tudor*, MBT) e domínios PHD não relacionados; a acetilação é reconhecida por bromodomínios; a fosforilação é reconhecida por um domínio dentro das proteínas 14-3-3. Estas proteínas aparecerão sequencialmente, por exemplo, na transcrição e na replicação do DNA.

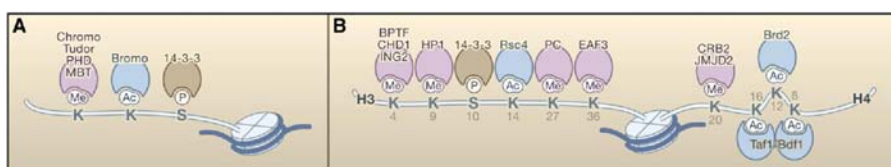


Figura 2.2.1: Recrutamento de proteínas para as histonas (1) : (A) Domínios que reconhecem lisinas metiladas, acetiladas ou serinas fosforiladas; (B) Proteínas que se associam preferencialmente a histonas H3 e H4 modificadas.

Estas modificações nas histonas podem ainda ter um terceiro papel: a prevenção da ligação de proteínas não histonas às histonas. Como é o caso da H3K4me que compromete a ligação do complexo NuRD e H3T3ph e previne a ligação do complexo INHAT, em que ambos os complexos podem reprimir a transcrição (37).

A presença de um grande número de modificações nas caudas das histonas pode induzir *cross-talk* entre elas (figura 2.2.2) (1). Estas interações podem ocorrer a vários níveis: (i) dada a possibilidade de existirem diferentes tipos de modificações em lisinas e estas serem mutuamente exclusivas, podem ocorrer processos de regulação antagónicos, por exemplo a metilação de lisinas que tanto pode levar à repressão como à activação, dependendo do estado e localização da modificação; (ii) a ligação de uma proteína por um resíduo de aminoácido pode ser perturbada por uma modificação num resíduo adjacente (38); (iii) a actividade catalítica de uma enzima pode ser comprometida por uma modificação no local de reconhecimento do substrato (por exemplo, a isomerização de H3P38 afecta a metilação de H3K36 pelo Set2) (39); (iv) uma enzima pode reconhecer melhor o substrato na presença de uma segunda modificação (por exemplo, a GCN5 acetiltransferase pode reconhecer a H3 mais facilmente quando esta se encontra fosforilada na H3S10) (40).

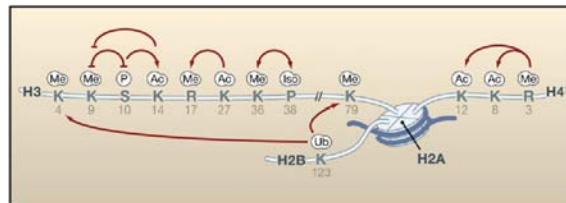


Figura 2.2.2: *Crosstalk* entre modificações de histonas (1):A influência positiva de uma modificação em outra é representada setas, as influências negativas são representadas por linhas a vermelho.

Além destas, existe ainda a possibilidade da interação entre modificações em diferentes caudas de histonas, como é o caso da ubiquitinação da H2B que é necessária para a metilação H3K4me3 (1).

Em termos de consequências funcionais das modificações, estas podem ser divididas atendendo à sua função: (i) com capacidade para estabelecer ambientes globais de cromatina; (ii) que actuam em diferentes domínios do genoma; (iii) orquestrando funções biológicas com base no DNA.

Os ambientes de cromatina, heterocromatina silenciosa e eucromatina activa, estão associados a modificações diferentes. Estes ambientes são separados entre si por “elementos de fronteira”, que recrutam enzimas para modificar a cromatina, é o caso observado especificamente nos mamíferos, do factor de transcrição CTCF, que se liga aos elementos de fronteira e recruta as enzimas modificadoras (41). A heterocromatina é uma estrutura importante para a protecção das extremidades dos cromossomas e para a sua separação na mitose. No caso específico dos mamíferos, o estado heterocromático é associado a baixos níveis de acetilação e a altos níveis de metilação em locais específicos, nomeadamente H3K9, H3K27 e H4K20, enquanto que o estado de eucromatina possui geralmente altos níveis de acetilação e encontra-se trimetilada em H3K4, H3K36 e H3K79 (1). Recentemente foram descritos domínios bivalentes, que possuem modificações que activam ou reprimem genes, o que implica a existência de outros mecanismos adicionais na regulação do estado de cromatina (42). A integração destas evidências experimentais sugere que a regulação dos estados de cromatina com a transcrição é determinada, não só pelo tipo de modificação em si, mas também pelo contexto em que se encontra, por exemplo: o facto da metilação estar envolvida tanto na activação como na repressão (acetilação metilação, fosforilação e ubiquitinação estão implicadas na activação, enquanto que na repressão estão implicadas a metilação, ubiquitinação, sumoilação, desiminação e isomerização de

prolina) (1)), implica que o contexto da modificação seja determinante para os efeitos desta. Tendo em consideração a necessidade de enzimas específicas para cada modificação, surge a possibilidade de a enzima que catalisa a modificação, seja também ela dependente do contexto onde se encontra a histona (43; 44).

2.2.1 Enzimas modificadores de histonas

A identificação de enzimas modificadoras de histonas tem sido, nos últimos anos, um assunto de intensa pesquisa científica. Já foram identificadas enzimas envolvidas na metilação (45), acetilação (46), fosforilação (47), ubiquitinação (29), sumoilação (48), ADP-ribosilação (49), desiminação (50; 51) e isomerização de prolina (39). Na maioria destes estudos, tem sido demonstrado que estas modificações são dinâmicas, isto é, não são permanentes. Só recentemente se identificaram desmetilases de argininas de histonas, pois até então pensava-se que a única forma deste aminoácido perder a sua metilação seria através de um processo de desiminação, tendo por base a relação observada entre o processo de desiminação e o desaparecimento das metil-argininas (1). No caso da isomerização de prolinas não é necessária uma enzima específica, visto que as isomerases, na sua grande maioria, têm a capacidade intrínseca de catalizar a formação de *cis*- e de *trans*-prolina (1).

Tabela 2.1: Enzimas modificadoras de histonas (1)

Só foram incluídas enzimas com especificidade para 1 ou poucos locais. Estão presentes enzimas humanas e de leveduras. As de leveduras possuem o prefixo Sc.

Lisina Metiltransferases	Resíduos modificados	Lisina Desmetilases	Resíduos modificados
SUV39H1	H3K9	LSD1/BHC110	H3K4
SUV39H2	H3K9	JHDM1a	H3K36
G9a	H3K9	JHDM1b	H3K36
ESET/SETDB1	H3K9	JHDM2a	H3K9
EuHMTase/GLP	H3K9	JHDM2b	H3K9
CLL8	H3K9	JMJD2A/JMJD3A	H3K9, H3K36
SpClr4	H3K9	JMJD2B	H3K9
MLL1	H3K4	JMJD2C/GASC1	H3K9, H3K36
MLL2	H3K4	JMJD2D	H3K9
MLL3	H3K4		
MLL4	H3K4	Arginina Metiltransferases	Resíduos modificados
MLL5	H3K4	CARM1	H3 (R2, R17, R26)
SET1A	H3K4	PRMT4	H4R3
SET1B	H3K4	PRMT5	H3R8, H4R3
ASH1	H3K4		
Sc/Sp SET1	H3K4	Ubiquitilases	Resíduos modificados
SET2 (Sc/Sp SET2)	H3K36	Bmi/Ring1A	H2AK119
NSD1	H3K36	RNF20/RNF40	H2BK120
SYMD2	H3K36		
DOT1	H3K79	Prolina Isomerases	Resíduos modificados
Sc/Sp DOT1	H3K79	ScFPR4	H3P30, H3P38
Pr-SET 7/8	H4K20		
SUV420H1	H4K20	Desacetilases	Resíduos modificados
SUV420H2	H4K20	SirT2 (ScSir2)	H4k16
SpSet 9	H4K20		
EZH2	H3K27	Acetiltransferases	Resíduos modificados
RIZ1	H3K9	HAT1	H4(K5, K12)
			H3 (K14, K18), H4 (K5, K8), H2A (K5), H2B(K12, K15)
Serina/Treonina Cinases	Resíduos modificados	CBP/P300	
Haspina	H3T3	PCAF/GCN5	H3 (K9, K14, K18)
MSK1	H3S28	TIP60	H4 (K5, K8, K12, K16), H3K14
MSK2	H3S28	HB01(ScESA1, SpMST1)	H4 (K5, K8, K12)
CKII	H4S1	ScSAS3	H3 (K14, K18)
Mst1	H2BS14	ScSAS2(SpMST2)	H4K16
		ScRTT109	H3K56

De todas as enzimas que modificam histonas, as mais específicas são as metiltransferases e as cinases (tabela 2.1), o que parece justificar o facto de a metilação e a fosforilação serem das modificações mais estudadas (1). A sua elevada especificidade é evidenciada pela existência de metiltransferases específicas para resíduos de classes de histonas particulares, como é o caso da Set9, uma metiltransferase identificada inicialmente como uma HMTase específica para H3K4, que se revelou uma metiltransferase com alta especificidade para H3K4 em histonas livres, mas não para H3K4 de histonas nucleossómicas (43; 44). Na tabela 2.1 são apresentadas algumas enzimas modificadoras de histonas.

As metiltransferases de histonas (HMTs) com actividade para os resíduos de arginina e lisina, pertencem na sua maioria a uma família de enzimas, com um domínio conservado chamado SET (*Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax*). O genoma humano codifica 48 destas proteínas com domínio SET (figura 2.2.3).

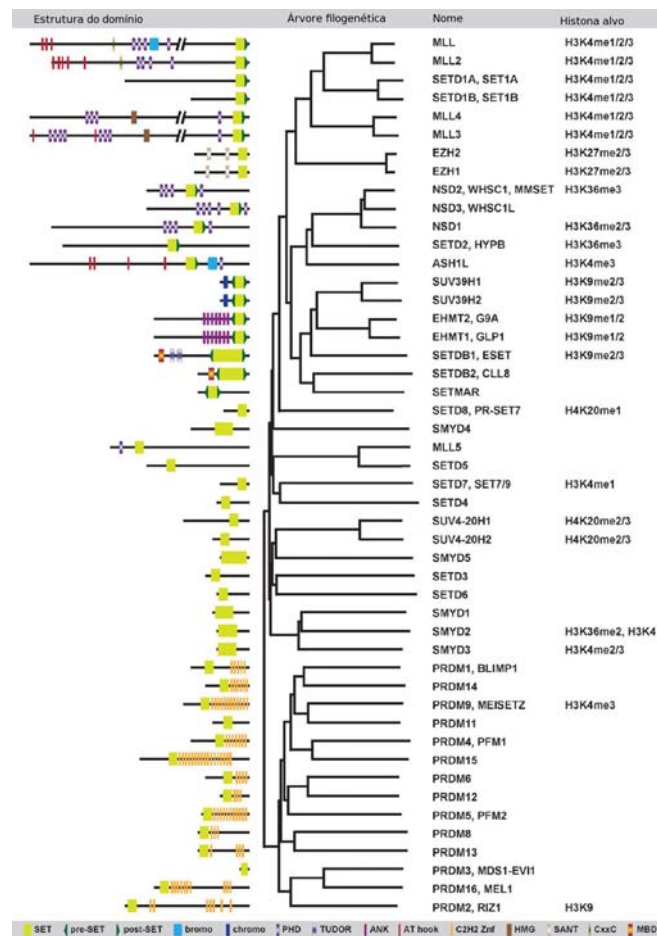


Figura 2.2.3: Árvore filogenética de metiltransferases de histonas com domínio SET. O genoma humano codifica 48 proteínas com domínio SET, que estão representadas de acordo com a sua relação filogenética, baseada na sequência de aminoácidos do domínio SET. Para cada proteína, é fornecido o nome convencional, assim como sinónimos mais usados, o alvo específico na histona e a estrutura do domínio. A localização do domínio SET e anotação de outros domínios, são dados de acordo com a base de dados SMART.

SET: *Supressor de variegação, Enhancer de Zeste*, domínio *Trithorax*; *pre/post-SET*: motivos ricos em cisteína encontrados adjacentes a um subconjunto de domínios SET; PHd: homeodomínio *zinc finger* de planta; ANK: repetições de anquirinas (*ankyrin repeats*); *AT hook*: domínio de ligação a DNA A/T; C2H2 Znf: *zinc finger* do tipo C2H2; HMG: grupo de alta mobilidade; SANT: domínio de ligação SWI3, AdA2, N-CoR e TFIIB; CxxC: *zinc finger CxxC*; MBD: domínio de ligação CpG.

Estas enzimas metilam predominantemente os resíduos de aminoácidos das caudas das histonas H3 e H4, mas também podem metilar os resíduos de aminoácidos do domínio globular do *core*, como no caso da H3K79, metilada por DOT1L (52) (tabela 2.2).

Tabela 2.2: Metilação de histonas: enzimas e funções (2)

Local	Enzima	Função
HISTONA H3		
<u>R2</u>	CARM1(Mm, Hs)	Local de metilação <i>in vitro</i>
<u>K4</u>	???(Tt)	Activação de transcrição
	Set1(Sc)	Silenciamento de rDNA, Silenciamento telomérico
	Set1(Sc)	Activação de transcrição
	SET7/Set9 (Hs)	Activação de transcrição
	Trx/MLL (dm, Hs)	Activação de <i>tritorax</i>
	Ash1 (dm)	Activação de <i>tritorax</i> (em conjunto com a metilação de H3K9 e H4K20)
<u>K9</u>	Suv39h1 (Mm)	Heterocromatina pericêntrica
	Suv39h2 (Mm)	Heterocromatina pericêntrica
	Su(var)3-9 (dm)	Modificador PEV dominante
	Clr4 (Sp)	Silenciamento do tipo centromérico/textitmatng
	dim5 (Nc)	Metilação de DNA
	KRYPTONITE (At)	Metilação de DNA
	Suv38h1 (Mm)	Metilação de DNA
	Suv39h2 (Mm)	Metilação de DNA
	SUV39H1 (Hs)	Silenciamento mediado por Rb
	G9a (Mm)	<i>Imprinting</i>
	G9a (Mm)	Regressão da transcrição
	G9a (Hs)	Regressão da transcrição
	Eu-HMTase1 (Hs)	Regressão da transcrição
	Eset/SETdB1 (Mm, Hs)	Regressão da transcrição
	E(z)/EZH2 (dm, Hs)	Repressão de <i>Polycomb</i>
	Ash1 (dm)	Activação de <i>tritorax</i> (em conjunto com a metilação de H3K4 e H4K20)
	???(Mm, Hs)	Inactivação do cromossoma X
<u>R17</u>	CARM1 (Mm, Hs)	Activação de transcrição
	CARM1 (Mm, Hs)	Activação de transcrição (em conjunto com a acetilação de H3K18 e H3K23)
<u>R26</u>	CARM1 (Mm, Hs)	Local de metilação <i>in vitro</i>
<u>R27</u>	G9a (Mm)	Repressão da transcrição
	E(z)/EZH2 (dm, Hs)	Repressão de <i>Polycomb</i>
	EZH2 (Hs)	Progresão do cancro da próstata humano
	Ezh2 (Mm)	desenvolvimento inicial das células B, rearranjo IgH
	Ezh2 (Mm)	Inactivação do cromossoma X
<u>K36</u>	Set2 (Sc)	Repressão de genes
<u>K79</u>	dot1/dOT1L (Sc, Hs)	Silenciamento telomérico, checkpoint de paquíteno
Histona H4		
<u>R3</u>	PRMT1 (Hs)	Activação de transcrição
<u>K20</u>	Pr-SET7/Set8 (Hs, dm)	<i>Transcriptional silencing mitotic condensation</i>
	Ash1 (dm)	Activação de <i>tritorax</i> (em conjunto com a metilação de H3K4 e H3K9)

???= Nome não se encontra descrito

As primeiras metiltransferases de histonas a serem descritas foram a Suv39h nos mamíferos e a sua homóloga Clr4 em *Saccharomyces pombe* (53). Recentemente identificaram-se desmetilases de histonas (HDM), para resíduos de lisina, o que veio alterar a noção de a metilação ser uma marca hereditária permanente (54). A presença das desmetilases de histonas e de histonas metiltransferases nos mesmos complexos sugere a existência de capacidade para desligar determinados estados de transcrição, por deleção de marcas epigenéticas pré-existentes, subsequentemente substituídas por

novas marcas na cromatina (3). Para o efeito, é necessário a existência de mecanismos rígidos para a regulação da expressão, actividade e recrutamento das HMTs e HDMs. A desregulação em qualquer um dos casos irá promover uma expressão de genes inapropriada, podendo então levar ao aparecimento de uma doença (figura 2.2.4). Efectivamente, das cerca de 50 HMTs de arginina e lisina, codificadas pelo genoma humano, cerca de 22 foram associadas ao cancro ou a outras doenças (tabela 2.3). Acrescente-se que, a desregulação de algumas HMTs pode também estar associada à agressividade do tumor. Verificou-se, por exemplo, que o repressor de transcrição EZH2 (grupo *Polycomb*), se encontra sobre-expresso em vários tipos de cancro (55): (i) foi proposto como um marcador da progressão e metastização do cancro da próstata (56); (ii) ligado à agressividade do cancro da mama (57; 58); (iii) envolvido na progressão de tumores na bexiga (59).

Tabela 2.3: Lista de metiltransferases ligadas a doença (3):

Em muitos destes casos ainda não se percebe o mecanismo do desenvolvimento da doença, e ainda não se sabe se a regulação deficiente das HMTs contribui para a iniciação ou progressão da doença. H=Humano; R=Ratinho

Gene	Espécie	Doença	Aberração genética/expressão aberrante
<u>MLL</u>	H,R	Leucemia (AML, ALL, MLL)	>50 fusões MLL diferentes
	H,R	Leucemia mielóide aguda (AML)	MLL-PTD
<u>MLL2</u>	H	Carcinoma Hepatoceular (HCC)	Integração do vírus da hepatite B no MLL2: fusão HBx-MLL2
	R	Leucemia mielóide aguda (AML)	NUP98-JARID1A
<u>MLL3</u>	H	Cancro colorectal (CRC)	Mutações intragénicas
<u>DOT1L</u>	H,R	Leucemia (AML, ALL)	Fusão MLL-AF10, fusão MLL-AF4
	H	Leucemia linfoblástica aguda das células T (T-ALL)	Fusão CALM-AF10
<u>EZH2</u>	H,R	Leucemia linfoblástica aguda das células T (T-ALL)	Fusão SET-NUP214
	H	Carcinoma da bexiga	Sobre-expressão: miR-101 reduzido, amplificação de gene
	H	Cancro da mama	Sobre-expressão: amplificação de gene
	H	Cancro colorectal (CRC)	Sobre-expressão: amplificação de gene
	H	Cancro gástrico	Sobre-expressão
	H	Carcinoma hepatocelular (HCC)	Sobre-expressão
	H,R	Linfoma	Sobre-expressão: miR-26a reduzido, amplificação de gene
	H	Melanoma	Sobre-expressão
	H	Cancro da próstata	Sobre-expressão: repressão mediada por miR-101 reduzida
	H	Outros tipos de cancro	Sobre-expressão
<u>NSD1</u>	H,R	Leucemia mielóide aguda (AML)	Translocação t(5;11)(q35;p15,5): fusão NUP98-NSD1
	H	Síndrome mielodisplásica (Mds)	Translocação t(5;11)(q35;p15,5): fusão NUP98-NSD1
	H	Síndrome de Sotos	Mutações intragénicas, microdeleções 5q35
<u>NSD2</u>	H	Glioblastoma multiforme (GBM)	Sobre-expressão
	H	Carcinoma hepatocelular (HCC)	Sobre-expressão
	H	Leucemia	Sobre-expressão
	H	Mieloma múltiplo	t(4;14)(p16,q32): expressão alterada de FGFR3, NSD2
	H	Outros tipos de cancro	Sobre-expressão
<u>NSD3</u>	H	Leucemia mielóide aguda (AML)	Translocação t(8;11)(p11.2;p15): fusão NUP98-NSD3
<u>SUV38H1/2</u>	R	Linfoma das células B	Ratinhos <i>knockout</i>
<u>EHMT1</u>	H	Síndrome de deleção subtelomérica 9q	Haploinsuficiência de EHMT1
	H	Cancro da mama	Mutações intragénicas
	H	Meduloblastoma	<i>Downregulation</i>
<u>SETDB1</u>	H	Doença de <i>Huntington</i> (HD)	Sobre-expressão
<u>SMYD2</u>	H	Carcinoma hepatocelular (HCC)	Sobre-expressão
<u>SMYD3</u>	H	Cancro da mama	Sobre-expressão
	H	Cancro colorectal (CRC)	Sobre-expressão
	H	Carcinoma hepatocelular (HCC)	Sobre-expressão
<u>SMYD4</u>	H	Cancro da mama	<i>Downregulation</i>
	H	Meduloblastoma	<i>Downregulation</i>
<u>PRDM1</u>	H	Linfoma	Mutações no gene PRDM1; silenciamento epigenético
<u>PRDM2</u>	H	Cancro da mama	Mutações no gene PRDM2; metilação do DNA promotor
	H	Cancro colorectal (CRC)	Mutações no gene PRDM2
	R	Linfoma das células B difusas (dBCL)	Ratinhos <i>knockout</i>
	H	Cancro gástrico	Mutações no gene PRDM2; metilação do DNA promotor
	H	Carcinoma hepatocelular (HCC)	<i>downregulation</i> ; metilação do DNA promotor
	H,R	Cancro dos pulmões	<i>downregulation</i> ; Ratinhos <i>knockout</i>
	H	Neuroblastoma	<i>downregulation</i>
	H	Cancro da mama	<i>downregulation</i> ; metilação do DNA promotor
<u>PRDM5</u>	H	Cancro gástrico e colorectal	<i>downregulation</i> ; metilação do DNA promotor
	H	Cancro do fígado	<i>downregulation</i> ; metilação do DNA promotor
	H	Linhas celulares de cancro dos ovários	<i>downregulation</i> ; metilação do DNA promotor
	H	Leucemia mielóide crónica (CML)	Microdeleções 9q englobando RRP4 e PRDM12
<u>PRDM12</u>	H	Cancro da mama	Sobre-expressão
<u>PRMT1</u>	R	Leucemia mielóide aguda (AML)	Fusão MLL-EEN
	H	Linhas celulares de cancro da mama	Sobre-expressão
<u>CARM1</u>	H	Cancro da mama	Sobre-expressão
	H	Cancro da próstata	Sobre-expressão
<u>PRMT5</u>	H	Linfoma e leucemia	Sobre-expressão

No entanto, em muitos casos não é claro se uma HMT específica contribui directamente para o desenvolvimento da doença, ou se sua desregulação é uma mera consequência da doença em si (3).

Relativamente aos mecanismos da desregulação de HMTs, apenas ainda foram identificadas mutações intragénicas para algumas HMTs, nomeadamente ao nível de MLL3, NSD1, PRDM1 e PRDM2 (60; 61; 62; 63; 64; 65), e a presença do gene em regiões cromossómicas onde ocorre frequentemente amplificação, ou deleção, como por exemplo NSD3, EHMT1, SMYD2 e PRDM12 (66; 55; 67; 68; 69)). No caso das leucemias humanas, 10% estão associadas a translocações cromossómicas das HMT MLL do grupo *Trithorax* (70) e a rearranjos cromossómicos envolvendo NUP98 descritos para, por exemplo, NSD1 e NSD3 (71; 72; 73). Adicionalmente à formação de proteínas aberrantes, estas translocações de cromossomas contribuem para uma regulação deficiente de genes, através da colocação, inapropriada, de elementos promotores na vizinhança de outros genes, como acontece na translocação de t(4;14) que envolve NSD2, observada no mieloma (74).

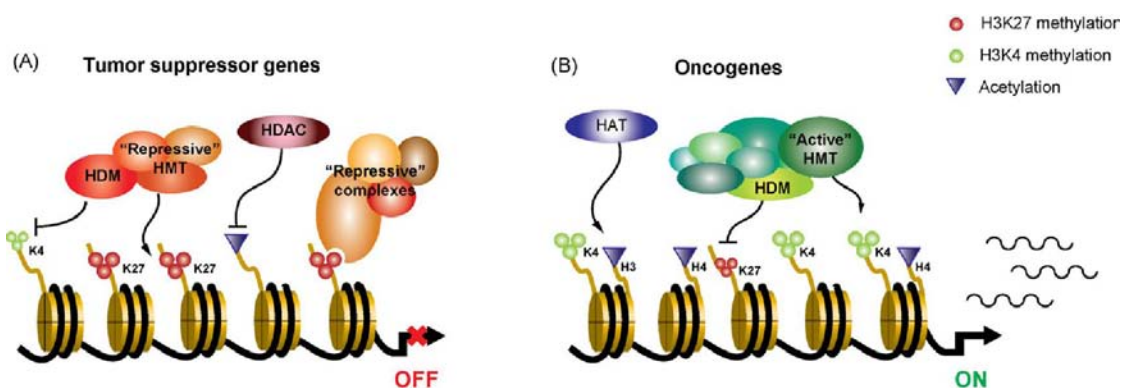


Figura 2.2.4: Regulação deficiente de genes supressores de tumores e oncogenes por metiltransferases de histonas (3): Pensa-se que tanto mecanismos genéticos, como epigenéticos, contribuem para o desenvolvimento de cancro. Tanto os genes supressores de tumores podem ser silenciados por modificações de histonas repressivas (A) como também a metilação e acetilação (marcas associadas a activação de transcrição) podem promover a expressão de oncogenes (B). HMT = Metiltransferase de histona; HDM = Desmetilase de histona; HAT = Acetiltransferase de histona; HDAC = Desacetilase de histona.

Além das aberrações genéticas, os mecanismos epigenéticos contribuem também para uma regulação deficiente das HMT. Por exemplo, enquanto que a PRDM2 é inactivada por deleções, ou mutações *frame-shift*, numa série de tumores, a metilação do DNA promotor, ligada à regulação negativa de PRDM2, foi detectada em outros tumores (75; 76; 77). Da mesma forma, a ilha CpG (região rica em locais CpG) dentro do promotor de PRDM5, é frequentemente metilada em linhas celulares de cancro (78; 79).

Recentemente, os microRNAs, foram implicados na regulação deficiente das HMTs no cancro. Varambally *et al* (80) demonstraram que no caso do cancro da próstata, a expressão de EZH2 é regulada por miR-101. No caso de linhas celulares de linfoma de *Hodgkin* (HL), a expressão de miR-9 e let-7a é inversamente proporcional aos níveis de proteína (81). Apesar de inúmeros estudos referirem mutações e regulação negativa de PRDM1 em linfomas (82; 65; 83), o seu papel como supressor tumoral continua controverso (84; 85).

2.2.2 Controlo da diferenciação celular por modificações em histonas

Um dos processos fisiológicos influenciados por modificações epigenéticas das histonas, é a diferenciação celular. Estudos realizados com inibidores de HDAC demonstraram que estes reduzem a diferenciação e induzem a expansão da *pool* de células estaminais/progenitoras, pelo que é sugerido que um nível global elevado de acetilação de histonas é importante para manter as células num estado indiferenciado (86; 87). No entanto, o tratamento de culturas de células primárias (88), ou de linhas celulares tumorais (89; 90), com o inibidor de HDAC, induz diferenciação, pelo que foi sugerido que os efeitos dos inibidores de HDAC dependem do contexto e do tipo de célula, visto que, estando a acetilação ligada à transcrição, a remoção desta deveria promover uma diminuição na transcrição, logo, impedir a diferenciação. O desenvolvimento cerebral e o processo de aprendizagem, assim como a formação de memórias, também implicam uma regulação por mecanismos epigenéticos (91), pelo que a regulação epigenética parece ser um mecanismo geral para a maturação celular.

Relativamente à metilação, sabe-se que as marcas repressivas H3K9me2 e H3K9me3 aumentam durante a embriogénese (86; 92). No entanto, para se manter a pluripotência de uma célula, é necessário reprimir alguns genes específicos de desenvolvimento, pelo que para o fazer, existem os complexos *Polycomb* (PcG) que se associam com a marca H3K27me3 (93). A metilação da lisina H4K20 também está ligada ao silenciamento da transcrição, no entanto, foi sugerido, por Sanders *et al* (94), que a trimetilação de H4K20 não se encontra directamente envolvida na regulação da expressão genética, embora seja importante no controlo de danos do DNA. Foi sugerido que a metilação de H4K20 varia durante a diferenciação celular, visto que, em estudos realizados com células neuronais de rato, os níveis de H4K20me1 são elevados, enquanto que os níveis de H4K20me3 são baixos, sendo que estas modificações aumentam progressivamente com a diferenciação celular (95).

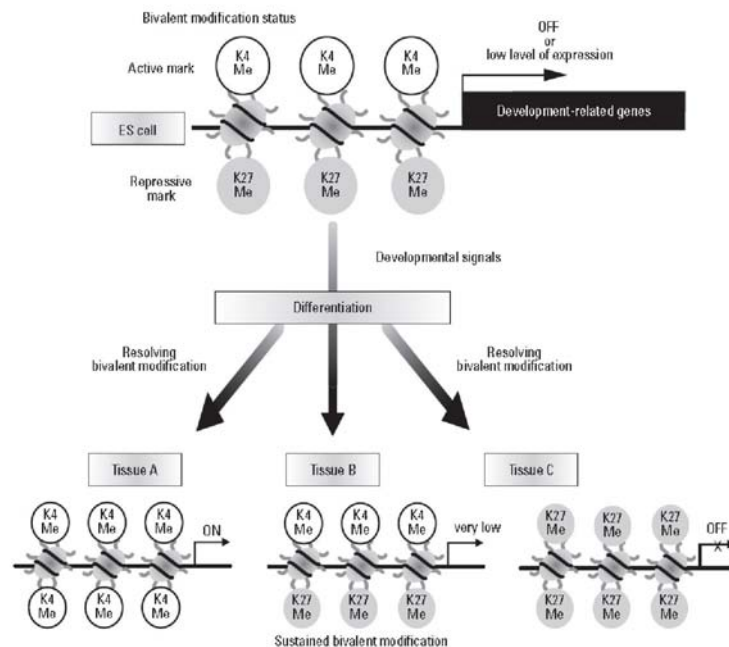


Figura 2.2.5: Resolução dos domínios bivalentes em histonas de células estaminais embrionárias, durante a diferenciação celular (5).

Em células estaminais embrionárias de ratinho, muitos genes reguladores de desenvolvimento, possuem domínios bivalentes (figura 2.2.5) com H3K27me3, marca repressora de transcrição, e H3K4me3, marca activadora de transcrição (96). Durante a diferenciação celular, esta bivalência desaparece em genes individuais, pelo que ou permanece H3K27me3 ou então H3K4me3. Estes genes bivalentes são pouco expressos, o que sugere a predominância de H3K27me3. De acordo com Bernstein *et al* (96), a marca H3K27me3 silencia os genes de desenvolvimento nas células estaminais, enquanto que H3K4me3 permite manter o gene pronto a ser activado. No entanto, Kimura *et al* (97), identificaram em células estaminais genes transcritos e silenciados com a modificação H3K4me3, que sugere que a H3K4me3 induza a um estado permissivo à transcrição, mas que não se traduz obrigatoriamente em transcrição.

2.2.3 Efeitos epigenéticos das variantes de histonas

Apesar das histonas serem proteínas que pouco evoluíram desde o seu aparecimento, existem muitas variantes não-alélicas que apresentam diferenças nas suas estruturas primárias, desde apenas a substituição de alguns aminoácidos, até mudanças extremamente divergentes. Enquanto algumas variantes apenas se localizam em algumas regiões específicas do genoma, outras possuem características biofísicas distintas das histonas mais “genéricas”, causando alterações no nucleossoma após a sua inclusão (4). As variantes menos comuns encontram-se geralmente presentes sob a forma de um gene individual, cuja expressão não está limitada apenas à fase S do ciclo celular. Ao contrário dos subtipos predominantes de histonas, os genes das variantes contém intrões e, os seus transcritos costumam encontrar-se poliadenilados, características que se pensam ser importantes na regulação pós-traducional destas proteínas (98). Algumas variantes substituem as histonas pré-existentes durante os processos de desenvolvimento e diferenciação, pelo que a estas se dá o nome de histonas substituintes (99; 100; 101; 102). Estas substituições resultam no aumento da quantidade de variantes, que se tornam as espécies predominantes nas células diferenciadas (103; 101). Estas observações levaram à sugestão de que as variantes de histonas possuem funções especializadas na regulação da dinâmica da cromatina (4).

Tabela 2.4: Variantes de histonas e sua função (4)

Variante	Espécies	Efeitos na cromatina	Função
H1 ⁰	Ratinho	Condensação da cromatina	Repressão da transcrição
H5	Galinha	Condensação da cromatina	Repressão da transcrição
SpH1	Ouriços do mar	Condensação da cromatina	Empacotamento da cromatina
H1t	Ratinho	Cromatina aberta	Troca de histonas, recombinação?
MacroH2A	Vertebrados	Condensação da cromatina	Inactivação do cromossoma X
H2ABbd	Vertebrados	Cromatina aberta	Activação da transcrição
H2A.X	Ubíquota	Condensação da cromatina	Repressão da reparação/ recombinação/ transcrição do DNA
H2A.Z	Ubíquota	Cromatina aberta/fechada	Activação/Repressão da transcrição, segregação dos cromossomas
SpH2B	Ouriço do mar	Condensação da cromatina	Empacotamento da cromatina
CenH3	Ubíquota		Formação/funcionamento dos cinetocoros
H3.3	Ubíquota	Cromatina aberta	Transcrição

A título de exemplo, salienta-se o caso de variantes de histonas H1 que parecem intervir na transcrição, nomeadamente na repressão (tabela 2.4) (104; 105; 106). No caso de histonas do *core*, a classe H2A é a que possui maior número de variantes (4). Uma das variantes de H2A é MacroH2A, que se pensa estar envolvida na repressão de transcrição. Esta variante localiza-se no cromossoma X inactivo (107) e, apesar não causar a inactivação do cromossoma X pela sua presença no nucleossoma (108), alguns autores sugerem que a cauda C-terminal da MacroH2A reprime a transcrição enzimaticamente (109), enquanto outros pensam que essa variante bloqueia estericamente o acesso a factores de transcrição e coactivadores (110; 111; 112). Em contraste, para a variante H2A-Bbd foi sugerido que a ausência da cauda C-terminal pode destabilizar o nucleossoma, favorecendo assim o deslocamento dos nucleossomas durante a transcrição (113; 114; 115). Este papel é consistente com a localização de H2A-Bbd no cromossoma X activo e autossomas (116).

Em relação à classe de histonas H3, foi sugerido que a variante H3.3 também possui um papel fulcral na transcrição. Uma das características que distingue esta variante é a sua expressão constante ao longo do ciclo celular (apesar de haver um aumento durante a fase S) e a possibilidade de ser incorporada na cromatina na fase S. No caso de células em divisão, a variante H3.3 está presente em genes marcados para transcrição, ou activamente transcritos. É largamente aceite, que a disrupção do nucleossoma ocorre durante processos nucleares, como a transcrição e reparação de DNA pelo que se torna necessário repor as histonas eliminadas nesse processo. Como a variante H3.3 de *Drosophila* é incorporada em *loci* transcripcionalmente activos, como rDNA, fora da fase S (117), a H3.3 poderá substituir H3 em genes activos, à medida que os nucleossomas se voltam a formar. Neste contexto, é necessário referir que no caso de leveduras, onde a variante H3.3 é a histona mais abundante da classe H3, o genoma encontra-se empacotado num estado transcripcionalmente activo ou competente (118). Tem sido proposto que, a troca das H3 mais abundantes pela sua variante pode marcar activamente os genes e regular o processo de transcrição, assim como modificar o código de histonas, pela remoção de histonas modificadas (4).

2.2.4 Alterações epigenéticas no cancro

As alterações epigenéticas associadas ao cancro compreendem uma variedade de modificações, incluindo perdas globais e ganhos regionais de metilação de DNA e alterações na metilação de histonas, assim como nos níveis de acetilação (12; 119; 120). Em contraste com os danos genéticos, as alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis, permitindo uma intervenção terapêutica. Como o cancro é, o que se acredita ser, uma doença com características de células estaminais e/ou células progenitoras, e como diversas HMTs são importantes reguladores de processos de diferenciação, uma hipótese que tem sido levantada é a de que a deficiente regulação de HMTs bloqueia a ocorrência de uma diferenciação celular normal. Vários mecanismos já foram sugeridos para explicar o desenvolvimento tumoral associado a alterações epigenéticas. Uma metilação aberrante de histonas nos promotores dos oncogenes ou dos genes supressores tumorais, pode induzir a sua activação errónea, ou silenciamento, respectivamente. Também a reactivação dos “genes de pluripotência”, e o silenciamento dos programas de linhagem das *committed cells*, pode fazer com que as células recuperem características de células estaminais, nomeadamente o elevado potencial proliferativo (121). Mais ainda, as HMTs funcionam para manter a integridade do genoma e são essenciais para uma correcta segregação de cromossomas. Ratos mutantes para H4K20me1 HMT Pr-Set7 apresentaram uma letalidade embrionária, ainda na fase de pré-implantação, devido a defeitos no ciclo celular, danos no DNA e deficiente condensação de cromossomas, na mitose (122). A delecção das enzimas Suvh39h

origina a perda de H3K9me_{2/3} na heterocromatina constitutiva e leva a instabilidades cromossômicas associadas com uma fraca viabilidade e um aumento do risco de tumores (123).

Uma enzima que se encontra frequentemente sobre-expressa em vários tumores, é a HMT EZH2, que catalisa a dimetilação de H3K27. Foi já descrita uma regulação positiva da EZH2, em estados avançados da doença e com mau prognóstico (56; 58; 124), bem como de outras proteínas PcG (121). No caso específico deste resíduo, H3K27, a enzima responsável pela sua desmetilação, UTX, encontra-se inactiva em vários tipos de tumores, devido a mutações somáticas (125), o que em conjunto com a sobre-expressão da enzima responsável pela metilação EZH2, sugere que o controlo dos níveis de metilação de H3K27 é essencial para a prevenção do desenvolvimento tumoral.

Relativamente à relação entre metilação e cancro, tem sido dado particular ênfase aos resíduos H3K9 e H4K20. Os referidos resíduos quando se encontram trimetilados, H3K9me₃ e H4K20me₃ induzem a formação da heterocromatina constitutiva e inibem a transcrição. Uma perda substancial de H3K9me₃ e H4K20me₃ pode resultar numa organização de heterocromatina mais “relaxada”, o que perturba a estabilidade do genoma (126; 127; 128). Adicionalmente, verificou-se recentemente que a H4K20me₃ é um *checkpoint* crucial para o controlo de danos, que H4K20me₃ compromete a capacidade das células de pararem o ciclo celular (94). Verificou-se, ainda, que a H3K9me₃ é absolutamente necessária para as células entrarem na via terminal de diferenciação (129) pelo que a perda desta modificação compromete o equilíbrio entre a proliferação celular e os processos de diferenciação, favorecendo a proliferação celular. Qualquer um destes mecanismos pode promover uma transformação neoplásica da célula.

De modo a comprovar a associação entre as alterações no perfil de modificações das histonas e a iniciação e progressão do cancro, é necessário verificar se essas alterações ocorrem em estágios preneoplásico, se permanecem durante os restantes estadios do cancro, e se aumentam as alterações de modificações durante a progressão do tumor (130).

Um estudo realizado por Coombes *et al* (131), refere a diminuição global dos níveis de metilação de H3K4, e um aumento da metilação de H3K9 nas histonas associadas ao gene supressor tumoral p16, em células de linhas tumorais de cabeça e pescoço, Tu-159. Nestas linhas celulares não se observa a transcrição do gene p16. Coombes *et al* (131) avaliaram o estado de metilação da histona H3 no gene p16 e observaram a existência de dimetilação em H3K4, à semelhança do verificado no gene p16. No entanto, a dimetilação de H3K9 não foi observada no gene p15, ao contrário do constatado para o gene p16. Estas evidências sugerem que o aumento de metilação de H3K9, a diminuição da metilação de H3K4, juntamente com a desacetilação de histonas e silenciamento de genes, estão interligados a este locus e outros genes metilados, em células Tu159.

Ao nível da acetilação, esta parece ocorrer, no caso das histonas H4, preferencialmente de K16 para K15, sendo que a maioria desta acetilação é monoacetilação e ocorre no resíduo de lisina 16 (132). Visto que em células normais e células tumorais não existem diferenças evidentes no que diz respeito aos níveis de H4K16ac, é sugerido que esta acetilação tem um papel central na função da cromatina, logo será a transição para a acetilação H4K15ac que estará relacionada com o desenvolvimento do cancro. É de salientar que tanto as células tumorais como normais apresentam uma percentagem baixa, cerca de 5%, de histonas H4 monoacetiladas em K5, K8, ou K12 (12).

Atendendo a todas as diferenças já caracterizadas entre histonas de células tumorais e não tumorais, surge a necessidade de, não só estudar PTMs individuais, mas fundamentalmente caracterizar o perfil global de PTMs e de o correlacionar com as enzimas específicas, de modo a determinar novos alvos terapêuticos.

2.3 As células HC11 como modelo de estudo de cancro da mama

A linha de células epiteliais mamárias HC11 foi obtida de ratos fêmea BALB/c, por interrupção da sua gravidez (133), e assemelham-se muito a células estaminais, ou progenitoras. As células HC11 exibem capacidade para auto-regeneração, pluripotência, pelo que podem ser cultivadas indefinidamente, no estado proliferativo de células estaminais, ou podem tornar-se funcionalmente diferenciadas, passando a expressar proteínas do leite *in vitro*. Neste sentido, são consideradas um modelo útil para o estudo da diferenciação de células mamárias (133). Num estudo, realizado por Williams e colaboradores (134), foi analisado o processo de diferenciação destas células, ao nível do transcrito. Após comparação com diferentes tipos de cancro da mama e suas metástases, constatou-se a existência de correlações entre o padrão de expressão das células no estado *stem-cell like* (SCL) e tumores mamários com mau prognóstico, pelo que se pensa que as células HC11 constituem um modelo adequado para o estudo das células estaminais da mama, o seu processo de diferenciação e a sua relação com o cancro.

2.4 Caracterização de PTMs das histonas com recurso à espectrometria de massa

Na pesquisa de modificações pós-traducionais (PTMs) das histonas têm sido utilizadas diversas abordagens metodológicas, sendo de destacar a aplicação da espectrometria de massa (MS). A primeira análise de histonas efectuada com técnicas de MS foi realizada por Banks *et al* (135), em que demonstraram a aplicação da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) na identificação de modificações na fosforilação de histonas H1 de células tratadas com dexametasona, apesar de não terem sido identificados os locais de modificação. Um ano depois, foi publicada por Galasinski *et al* (136) uma análise das PTMs de histonas do *core* tratadas com outras substâncias. O primeiro estudo que demonstrou a aplicação de MS na localização com exactidão dos locais de modificação nas histonas H3 e H4, foi apresentado por Zhang *et al* (137; 138). Estes autores demonstraram, na análise de H4, a possível existência de um padrão não-aleatório de acetilação. Este grupo fez uso do HPLC para purificar as histonas do *core* e as fracções obtidas, contendo H3, sendo em seguida digeridas com tripsina. Estes digestos foram novamente separados por HPLC, e as novas fracções obtidas foram analisadas por MALDI-TOF. Este grupo também utilizou uma aproximação similar para analisar o padrão de modificações no N-terminal da histona H4. A análise dos péptidos derivados da cauda N-terminal da histona H4 sugere uma progressão ordenada da acetilação, começando na lisina 16, progredindo sequencialmente pelas lisinas 12, 8 e 5.

Mais tarde, Allis *et al* (139) descreveram novos locais de metilação de histonas, identificados também por espectrometria de massa. Após a identificação de metiltransferases de lisinas de mamíferos CARM1 e PRMT1 como coactivadores de transcrição, capazes de metilar histonas *in vitro*, estes autores utilizaram MS para determinar se as histonas isoladas de culturas de células humanas continham resíduos de metilarginina. Assim, após purificação por RP-HPLC, as histonas foram digeridas com quimotripsina e analisadas por ESI-MS. Esta análise confirmou a presença de metilação nas argininas das histonas e, identificou a arginina 3 da histona H4 como um local preferencial de monometilação. Experiências subsequentes, *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que PRMT1 é a principal enzima responsável por esta modificação. Estudos posteriores, ainda com espectrometria de massa, mostraram que estas metilações não são restritas aos resíduos da cauda N-terminal, mas também podem existir nos domínios globulares do *core*. Usando histonas purificadas com diferentes

origens (culturas de células de tecido humano, timo bovino, eritrócitos de galinha e *Saccharomyces cerevisiae*), quatro grupos diferentes de investigadores identificaram com PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) metilação no resíduo de lisina 79 na histona H3 (23; 25; 26; 137). A presença da metilação na H3K79, neste conjunto de diferentes organismos, indica que é uma modificação altamente conservada. No entanto, o grau de metilação neste resíduo parece diferir de organismo para organismo. Enquanto que a H3K79 da levedura se encontra principalmente trimetilada, a análise da histona H3 em humanos e bovinos indicou presença de monometilação e, no caso das aves, de mono- e dimetilação. Não está esclarecido se esta ausência de trimetilação em vertebrados é uma questão da sensibilidade do método de detecção, visto que as enzimas responsáveis por esta modificação (do tipo DOT1) são em termos evolutivos, altamente conservadas. Num estudo no qual foi analisada a H3 de ratinho foram identificados péptidos contendo lisinas 79 mono-, di- e trimetiladas (140). Rice *et al* (141) demonstraram que a mono- e a dimetilação na H3K9 estão localizadas na eucromatina, enquanto que a trimetilação da H3K9 encontra-se predominantemente na heterocromatina.

A técnica *peptide mass fingerprinting* tem sido então aplicada de forma sistemática, na identificação e mapeamento das PTMs das 4 histonas do *core* (142). A análise de histonas isoladas de timo bovino, fraccionadas por HPLC, digeridas e analisadas por FTICR MS (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) resultou na identificação de 20 novos locais de modificação. O alto poder de resolução do FTICR MS permitiu a identificação dos péptidos, sem a necessidade da separação por HPLC e sequenciamento por espectrometria de massa tandem. Neste estudo foram ainda distinguidos os péptidos trimetilados dos acetilados. Muitos destes locais novos encontram-se no *core* globular das histonas (142).

A aplicação sistemática de PMF à análise de histonas do *core*, modificou a ideia existente acerca das PTMs nestas proteínas. Nomeadamente, demonstrou que estes locais estão localizados em vários pontos da superfície do nucleossoma ou em locais de ligação do DNA às histonas (143).

A espectrometria de massa também ajudou na identificação dos locais onde actuam as enzimas modificadoras de histonas, *in vivo*. Grunstein *et al* (144) desenvolveram um sistema baseado em espectrometria de massa, para determinar os locais específicos de desacetilação pela HDAC Hos3p de levedura. A Hos3p recombinante foi incubada com péptidos representativos da cauda N-terminal das histonas H3 e H4, com acetil-lisina incorporada em cada um dos locais de acetilação reversível. Os níveis totais de acetilação dos péptidos foram posteriormente analisados por MALDI-TOF e o estado de acetilação das lisinas individuais foi determinado por MS/MS ou *peptide mapping*. Segundo Tweedie-Cullen *et al* (27), os últimos locais de metilação detectados em histonas H3 e H4 foram: K14 e K122 nas variantes H3.1 e H3.2; K14, K36, K37, K40 e K122 na histona H3.3; K16, R23 e R35 na histona H4. No caso específico de H2A e H2B, já foram encontradas diversas PTMs, tais como: a acetilação (H2A: K5, K8 ; H2B: K5, K12, K15, K20); a fosforilação (H2A: S1 ; H2B: S10); a monometilação (H2A: K15 ; H2B: K5, K43); a ubiquitinação (H2A: K119 ; H2B: K120/K123) (145; 146; 147; 142; 148; 149; 150; 151).

Os resultados, então descritos, obtidos no mapeamento de PTMs de histonas e aliados à evolução da técnica de MS que conferiu vantagens relativamente a outras técnicas (como o caso do *Western Blotting* que requer anticorpos específicos), levaram à escolha deste método para o visualização global de modificações pós-traducionais em histonas, desenvolvidos no presente estudo.

3

Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo o estudo de alterações do proteoma nuclear de um modelo de estudo de cancro da mama, usando para o efeito a linha celular epitelial HC11. Como objectivos específicos para o desenvolvimento deste estudo procedeu-se:

- (i) Ao desenvolvimento de metodologias para o isolamento de núcleos; à separação electroforética de diferentes classes de histonas, suas variantes e graus de acetilação; e à comparação de metodologias para a análise do perfil de PTMs de histonas;
- (ii) À avaliação das modificações pós-traducionais em histonas induzidas pelo processo de diferenciação celular;
- (iii) À caracterização das alterações no proteoma nuclear em células HC11 estaminais e diferenciadas.

4

Material e Métodos

4.1 Desenho experimental

No sentido de dar uma perspectiva global sobre todo o processo experimental desenvolvido para atingir os objectivos propostos, apresenta-se o seguinte esquema experimental (figura 4.1.1).

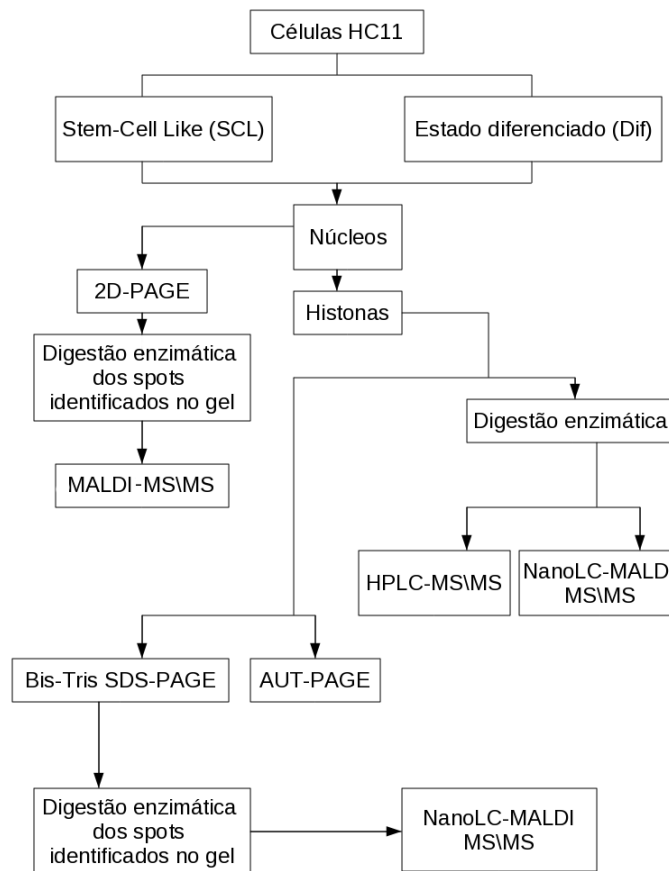


Figura 4.1.1: Esquema de trabalho experimental

4.2 Cultura de células HC11 e indução da sua diferenciação

De forma a obter o estado *stem-cell like* (SCL) e o estado diferenciado (Dif) das células HC11, cultivaram-se as células de acordo com Williams *et al* (134). Em resumo, as células mamárias epiteliais HC11 foram cultivadas em meio RPMI 1640, com 10% FBS (*fetal bovine serum*), L-glutamina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina, 10 ng/mL de EGF (*epidermal growth factor*) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. Para se obter as células pré-diferenciadas, deixou-se as células atingirem 100% confluência e modificou-se o meio, removendo o EGF, e diminuindo o FBS para 2%. Após 48 horas, iniciou-se o tratamento, de 72 horas, com meio sem EGF e com 100nM de dexametasona e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de prolactina, obtendo-se assim as células competentes.

4.3 Purificação dos núcleos para o estudo do seu proteoma

A extração dos núcleos foi realizada utilizando o protocolo descrito por Garland (152) para células aderentes. Brevemente, as células foram lavadas 2 vezes com 25mL de PBS gelado por tubo, e centrifugadas a 1500 x g a 4°C (todas as soluções e centrifugações foram realizadas a 4°C) para precipitar as células. O precipitado celular foi ressuspenso no tampão I (0,01M tris-HCl, 0,01M NaCl, 0,003M MgCl_2 , 0,03M sacarose, pH 7 com a adição de 500 μL NP-40 para cada 100mL) centrifugado a 1500 x g durante 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem em tampão I. Removeu-se o sobrenadante e ressuspenso o precipitado em 2mL de tampão II (a cada 100mL do tampão I adicionou-se 1mL de solução stock CaCl_2 10mM). Centrifugou-se durante 10 minutos a 1500 x g, e ressuspenso de novo o precipitado em 2mL de tampão II. Repetiu-se a lavagem. Por fim descartou-se o sobrenadante e armazenou-se o precipitado contendo os núcleos a -70°C.

4.4 Preparação das histonas para o estudo das suas PTMs

A fracção de histonas foi obtida a partir da fracção dos núcleos obtida utilizando o protocolo descrito no ponto 4.3 do "Material e Métodos". A extração das histonas foi realizada utilizando o protocolo descrito por Shechter *et al* (153). Brevemente, ressusponderam-se os núcleos em 400 μL de 0,4N H_2SO_4 e incubaram-se na incubadora a 4°C durante 2 horas com agitação constante. Centrifugaram-se as amostras a 16000 x g, durante 10 minutos, a 4°C, e transferiu-se o sobrenadante contendo as histonas para um novo tubo de 1,5mL. Para precipitar as histonas, adicionou-se uma solução de TCA 100%, gota a gota, até uma concentração final de 33% (132 μL) de TCA. Homogenizou-se a solução e incubou-se novamente em gelo durante 30 minutos com uma agitação esporádica. Centrifugou-se a fracção de histonas a 16.000 g, 4°C, 10minutos e removeu-se cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta. Lavou-se o precipitado de histonas com acetona gelada sem o perturbar e centrifugou-se 16.000g, 4°C, durante 5minutos. Repetiu-se a lavagem do precipitado com acetona gelada e centrifugou-se utilizando as mesmas condições. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o precipitado durante 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim dissolveu-se o precipitado em 100 μL e transferiu-se para novo tubo e 1,5mL.

4.5 Caracterização das diferentes classes de histonas e seus níveis globais de acetilação por electroforese AUT-PAGE

Para se compararem os níveis globais de acetilação entre as duas amostras, realizou-se um gel AUT-PAGE de acordo com o descrito previamente (154). Preparou-se o *running gel* com 8,75mL de solução de acrilamida 60%, 1,4mL de solução bis-acrilamida 2,5%, 2,1mL de ácido acético glacial, 0,115mL hidróxido de amónio 28%, 16,8g ureia e perfez-se até 31,75mL com H₂O. Desgaseificou-se esta solução num banho de ultrasons e adicionou-se 0,788mL de Triton X-100 (25% v/v). Para iniciar a polimerização do gel, adicionou-se 0,300mL de solução APS 10% e 0,030mL de TEMED. Uma vez polimerizado, adicionou-se o *stacking gel*, preparado da seguinte forma: 3,2g de ureia, 0,447mL de solução acrilamida 60%, 0,427mL de solução bis-acrilamida 2,5%, 0,380mL de ácido acético glacial, 0,023mL de hidróxido de amónio 28% e perfeito com H₂O até 6,2mL. Desgaseificou-se esta solução e adicionou-se 0,300mL de APS 10% e 0,030mL de TEMED. Como tampão de corrida usou-se uma solução constituída por 1M ácido acético e 0,1M glicina. Diluiu-se cada amostra com tampão constituído por 7,7mg de ditiotretitol (DTT), 50µL de hidróxido de amónio 28%, 50µL de H₂O e 0,9mL de solução ureia 9M. Para a separação das proteínas no gel, utilizou-se o seguinte programa de corrida: 300V, 25mA e 5W durante 3 h. A detecção das bandas foi realizada por incubação *overnight* dos géis obtidos com *coomassie colloidal* G-250 (0,1% m/v coomassie G-250 em 40 % metanol).

4.6 Identificação das diferentes classes de histonas por electroforese bis-tris SDS-PAGE

A separação das histonas foi realizada utilizando um gel SDS-PAGE preparado com tampão Bis-Tris em substituição do tampão Tris usualmente geralmente. Em resumo, preparou-se o *running gel* com 1,86 mL de H₂O, 2,5mL de tampão bis-tris 1,25M, 2,53mL de solução de acrilamida 40%, 1,395mL de solução bis-acrilamida 2% e 0,084mL de SDS 10%. Para iniciar a polimerização do gel, adicionou-se 0,042mL de solução APS 10% e 0,005mL de TEMED. Uma vez polimerizado adicionou-se o *stacking gel*, preparado por mistura de 1,856mL de H₂O, 0,25mL de tampão bis-tris 1,25M, 0,243mL de acrilamida 40%, 0,135mL de bis-acrilamida 2% e 0,025mL de SDS 10%. Iniciou-se a polimerização adicionando 0,013mL de APS 10% e 0,003mL de TEMED. Como tampão de corrida, usou-se uma solução constituída por 50mM MES (2-(*N*-morpholino)ethanosulfonic acid), 50mM tris, 1mM EDTA, 0,1% SDS e pH 7,3. Cada amostra foi diluída em tampão LDS (40% glicerol, 4% lítio dodecil sulfato, 4% Ficoll-400, 0,8M trietanolamina-Cl pH 7,6, 0,025% vermelho de fenol, 0,025% coomassie G250, 2mM EDTA), fervida durante 5 minutos antes de ser aplicada no gel. As proteínas das amostras foram separadas a uma voltagem de 200V durante 40 minutos.

4.7 Análise de proteínas nucleares por electroforese 2D-PAGE

A expressão proteica da fracção nuclear das SCL e células diferenciadas foi realizada utilizando a electroforese bidimensional segundo a qual na primeira dimensão separam-se as proteínas por ponto isoeléctrico e na segunda por peso molecular.

Para o efeito, solubilizou-se 200µg da fracção nuclear em tampão de rehidratação (8M ureia, 2M tiourea, 1% CHAPS, 12,9mM DTT, 0,1% *pharmalyte* 3-10NL e 0,01% azul de bromofenol) num volume final de 250µL. Aplicou-se a amostra no sarcófago e colocou-se a tira de acrilamida (*IpGstrip*

3-10NL, GE Healthcare). A focagem isoelétrica foi realizada no *IpGPhor* (GE Healthcare) tendo-se utilizado o seguinte programa: incubação a 20°C, durante 12 horas a 5mA; 1 hora de gradiente até 150V; 1 hora de gradiente até 500V; 1 hora de gradiente até 1000V; por fim, a 8000V durante 3,5 horas. Após a separação das proteínas com base no ponto isoelétrico, incubaram-se as tiras de acrilamida com 5mL de tampão de equilíbrio (para 200mL: 6,7mL tampão tris-HCl 1,5M pH 8,8, 72,1g ureia, 69mL de glicerol 87%, 4g SDS; com a adição de 2g de DTT) e incubados com agitação suave durante 15 minutos. As tiras foram posteriormente lavadas com tampão de corrida de SDS-PAGE e colocadas no topo do gel de SDS-PAGE 12,5% (155). A separação ds proteínas com base no peso molecular foi realizada a: 200V, 75mA e 15W durante 3h. A detecção das proteínas nos géis foi realizada com *coomassie G-250*.

4.8 Identificação de proteínas e caracterização das modificações pós traducionais por espectrometria de massa

4.8.1 Identificação de proteínas

Após a revelação dos géis com *coomassie* coloidal como descrito previamente, as bandas/*spots* dos géis bis-tris SDS-PAGE e 2D-PAGE foram removidos e transferidos para tubos tipo *ependorf*. Realizaram-se duas lavagens com 50µL de hidrogenocarbonato de amónio 50mM e 50µL de ACN com uma incubação de 30 minutos. Após as incubações removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 50µL de ACN com incubação de 10 minutos de forma a desidratar os pedaços de gel. Removeu-se o ACN e secaram-se os pedaços de gel na *SpeedVac Plus SC 210 A* (Thermo Savant, USA). Uma vez secos, adicionou-se às bandas/*spots* de gel, 25µL de tripsina e incubou-se a 37°C e, após 1 hora, adicionou-se mais hidrogenocarbonato de amónio 50mM de modo a cobrir todos os *spots/bandas* e incubou-se a 37°C durante toda a noite. A extracção dos péptidos dos géis fez-se recolhendo o sobrenadante existente para um *ependorf*, seguindo-se uma lavagem com 25µL de ácido fórmico (AF) 10% durante 30 minutos. Colectou-se este sobrenadante para o mesmo *ependorf* e por fim, realizaram-se 2 lavagens, durante 30 minutos cada, com 25µL de AF 10% e 25µL de ACN, sendo que todo o sobrenadante por fim adquirido, foi concentrado de novo com o recurso à *SpeedVac Plus SC 210 A* (Thermo Savant, USA). Os digestos foram ressuspensos em 50% acetonitrilo e 0,3% TFA para serem então aplicados numa placa de MALDI. Os espectros de massa dos péptidos provenientes da digestão foram obtidos num *MALDI-TOF/TOF* (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o modo reflectrão positivo, no intervalo de massas 700-4500Da. O método de aquisição seleccionou os dez picos mais intensos de cada *spot* (excluindo os picos referentes à autólise da tripsina ou acrilamida), de modo a posteriormente ocorrer uma aquisição de espectros por MS/MS. Os dados obtidos foram processados e analisados usando o *Global Protein Server* (GPS) *Workstation* (Applied Biosystems), que realiza a identificação de proteínas pela conjugação dos dados de *peptide mass fingerprinting* (PMF) com os dados MS/MS (*peptide fragment fingerprinting*) no *Mascot* (v2.1.1, Matrixscience, UK) na base de dados da *SwissProt* (march 2009). Os critérios foram, tripsina ou Glu-c como enzima, 2 cortes falhados, 30ppm de tolerância para o precursor e 0,3Da para os iões fragmento. A identificação foi aceite quando o grau de confiança era superior a 95% e um score de *Mascot* superior a 70.

4.8.2 Caracterização das modificações pós traducionais das histonas

Para a análise por LC-ESI e por LC-MALDI, usaram-se digestos de histonas das amostra de extractos celulares *Stem-Cell Like* (SCL) e diferenciada (Dif). Digeriram-se 100 μ g de proteína com tripsina e 100 μ g com Glu-C. Brevemente, ao volume equivalente a 100 μ g de histonas, adicionou-se tampão de hidrogenocarbonato de amónio 50mM, de modo a perfazer um volume final de 100 μ L. Às amostras adicionou-se 50 μ L de tripsina 0,01 μ g/ μ l ou 2 μ L de solução de Glu-C 0,25 μ g/ μ L. As amostras digeridas com tripsina foram incubadas a 37°C durante 2 horas, enquanto que as amostras com Glu-C foram incubadas a 25°C durante 6 horas. Em ambas as situações, as reacções foram terminadas com adição de TFA, para uma concentração final de 0,1%. As amostras foram conservadas a -70°C até serem analisadas por LC-ESI e LC-MALDI.

4.8.2.1 Análise por LC-ESI-MS/MS

De modo a analisar os digestos das amostras de histonas, estes foram separados por HPLC (Alliance Waters 2690, Waters, Milford, MA, USA). Para tal, foi injectado um volume de digesto equivalente a 20 μ g de proteína no HPLC, onde os péptidos foram separados numa coluna ACE-C18-AR (1mm de diâmetro interno e 3 μ m de tamanho de partícula) com um gradiente 10 a 18% de B (acetonitrilo e 0,1% de ácido fórmico) em A (água e 0,1% de ácido fórmico) nos primeiros 9 minutos, 18 a 55% de B em 40 minutos e 55 a 90% de B em 7 minutos. O HPLC estava a acoplado a uma fonte de *electrospray* de uma trapa linear (*LXQ Linear Ion Trap*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os espectros foram adquiridos na gama de massas de 200-2000 m/z no modo positivo (com um potencial de 5kV no capilar, temperatura de solvatação de 280°C) e o iões com mais de 1000 *counts* foram automaticamente seleccionados para MS/MS (com uma energia de colisão de 35%). Os espectros adquiridos foram processados utilizando o *Sequest* (v3.0, Thermo) com uma base de dados interna na qual estão incluídas todas as sequências de histonas pertencentes à taxonomia *Rodentia*. Os critérios foram, tripsina ou Glu-c como enzima, 4 cortes falhados, 0,8Da de tolerância para o precursor e 1,2Da para os iões fragmento. As modificações pós-traducionais foram pesquisadas com base na informação disponível na *Universal Protein Resource* (www.uniprot.org). Na tabela seguinte (tabela 4.1) estão presentes as variações de massa induzidas pela presença das modificações nos diferentes resíduos de aminoácidos, de acordo com os valores presentes na base de dados *UNIMOD* (www.unimod.org).

Tabela 4.1: Valores de massa induzidos por modificações pós-traducionais

Modificação	Massa monoisotópica (Da)
Acetilação	42,010565
Mono-metilação	14,015650
Di-metilação	28,031300
Tri-metilação	42,046950

As modificações foram aceites quando o *peptide probability* foi inferior a 0,05, e *Xcorr* inferior a 1,8 para carga +1, 2,2 para carga +2 e 2,5 para carga +3.

4.8.2.2 Análise por LC-MALDI-MS/MS

Os digestos preparados foram separados por nanoLC (Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), em que as alíquotas foram aplicadas automaticamente numa placa de MALDI, através de um colector automático *Probot* (LcPackings), em fracções de 20 segundos, com adição de 270nL de matriz do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (6mg/mL de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico preparada em 70% acetonitrilo e 0.3% de ácido trifluoroacético suplementada, com 0.4 μ L de uma solução (15fmol) glu-fib). Após a injeção de um volume equivalente a 2 μ g/mL de amostra, deu-se a separação dos péptidos, através de uma coluna C18 (C18 Zorbax SB 300; 0.75 μ m diâmetro interno; 15cm de comprimento), localizada num módulo de separação *Ultimate 3000* (LC Packings). O gradiente usado para a separação foi de 5-55% B, durante 30 minutos; 55-80% B, durante 10 minutos e 80-5% A, durante 5 minutos, em que o solvente A era composto por água, acetonitrilo e ácido trifluoroacético numa proporção 95:5:0,05 (v/v/v), e no solvente B mudava a proporção para 20:80:0,04 (v/v/v). A análise das fracções colectadas foi realizada utilizando os mesmos critérios definidos para a identificação de proteínas. A pesquisa de modificações foi realizada utilizando a mesma informação introduzida no ponto anterior com recurso ao *MASCOT* como descrito na identificação de proteínas. Todas as modificações foram aceites quando o grau de confiança individual foi superior a 99% e validadas manualmente.

5

Resultados

5.1 Análise comparativa das PTMs de histonas em células HC11 SCL e diferenciadas

No sentido de se obter uma boa separação das várias classes de histonas para posterior análise das respectivas PTMs, testaram-se duas metodologias diferentes: SDS-PAGE (155) e Bis-Tris SDS-PAGE (como descrito no ponto 4.6 do "Material e Métodos"). Como se pode constatar pela análise da figura 5.1.1, utilizando a segunda metodologia, obteve-se uma melhor separação na gama de baixo peso molecular (10-25 kDa). Consequentemente, utilizou-se a metodologia Bis-Tris SDS-PAGE para análise comparativa do perfil de histonas e PTMs entre os diferentes estadios de diferenciação das células HC11.

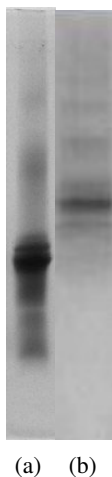


Figura 5.1.1: Comparação da separação das classes de histonas obtidas por electroforese SDS-PAGE (a) e electroforese Bis-Tris SDS-PAGE (b)

Como se pode constatar pela análise da figura 5.1.2a, observa-se um perfil de separação semelhante, embora com maiores teores relativos de cada classe de histonas nas células SCL, sendo mais notória para a classe H4.

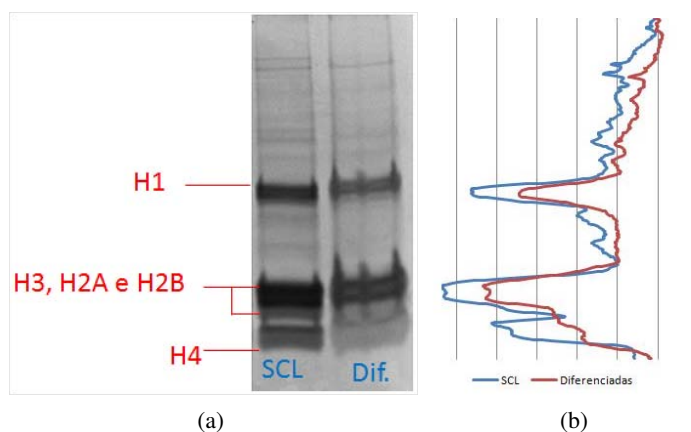


Figura 5.1.2: Separação das classes de histonas das células SCL e diferenciadas por electroforese. Em (a) é apresentada uma imagem representativa do perfil de separação das diferentes classes por electroforese Bis-Tris SDS-PAGE. O perfil de densidades ópticas de cada amostra é apresentado em (b).

A análise dos digestos por HPLC-MS e nanoLC-MS destas várias classes de histonas, após digestão com Glu-C e tripsina e posterior análise por HPLC-MS e nanoLC-MS, resultou na identificação de um total de 2659 modificações, sendo que destas apenas 23 foram identificadas por MALDI-TOF/TOF, das quais 8 foram exclusivamente observadas com esta técnica. Todas as restantes identificações foram obtidas por ESI-Ion Trap-MS/MS. Com esta abordagem, foi possível obter um total de 1363 diferentes péptidos modificados na células SCL e 1185 nas células diferenciadas.

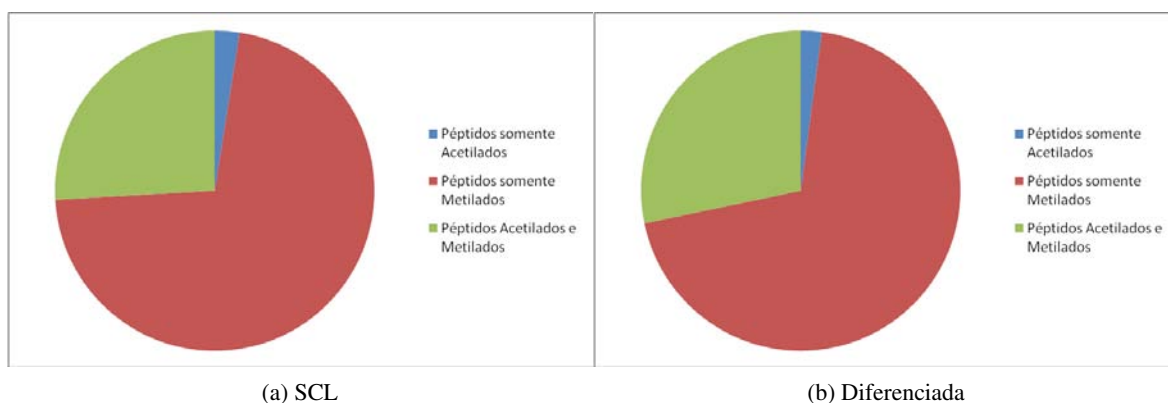


Figura 5.1.3: Distribuição relativa das modificações encontradas nos péptidos de histonas nas células SCL (a) e diferenciadas (b)

Da análise da figura 5.1.3 pode-se observar que durante o processo de diferenciação, houve um incremento nos péptidos com metilações e acetilações. Uma análise aprofundada da distribuição das modificações identificadas nas diferentes classes de histonas, permite verificar que o aumento de péptidos com metilações e acetilações foi mais significativo na classe H2B, seguindo-se a classe H1.

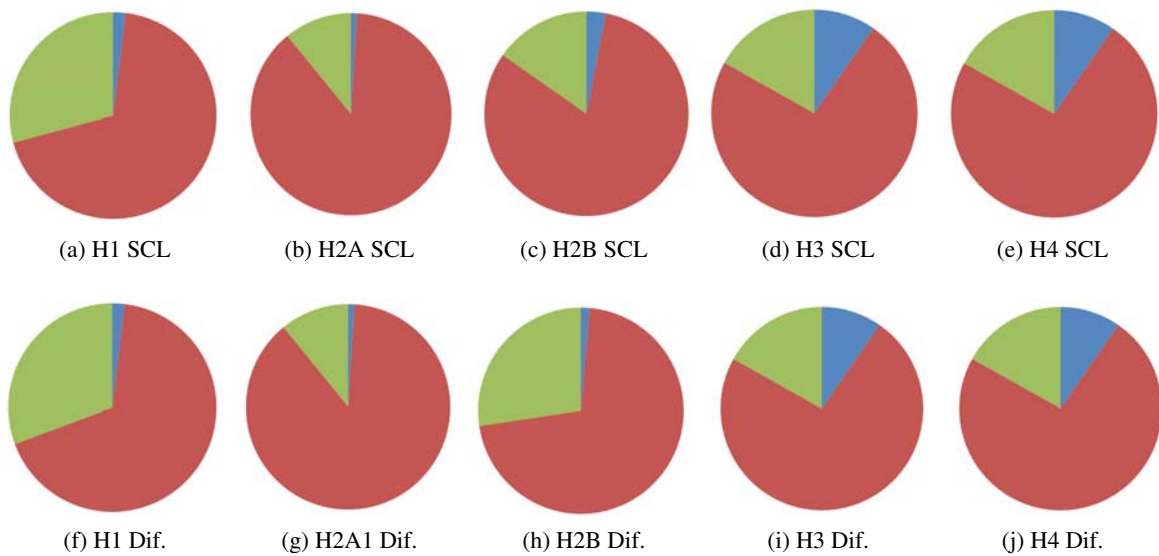


Figura 5.1.4: Comparação da distribuição das metilações e acetilações nos péptidos analisados das diferentes classes de histonas entre as células SCL e diferenciadas. **Azul** - péptidos somente acetilados; **Vermelho** - péptidos somente metilados; **Verde** - péptidos acetilados e metilados

Analisando o número de PTMs identificadas nas variantes de histonas H3, observa-se a predominância de modificações na variante H3.2 em relação à variante H3.3B (anexo A).

A avaliação do teor relativo das modificações identificadas, evidencia a predominância de metilações em todas as classes de histonas, à exceção da classe H4, na qual a acetilação se encontra ao nível das restantes modificações (figura 5.1.5).

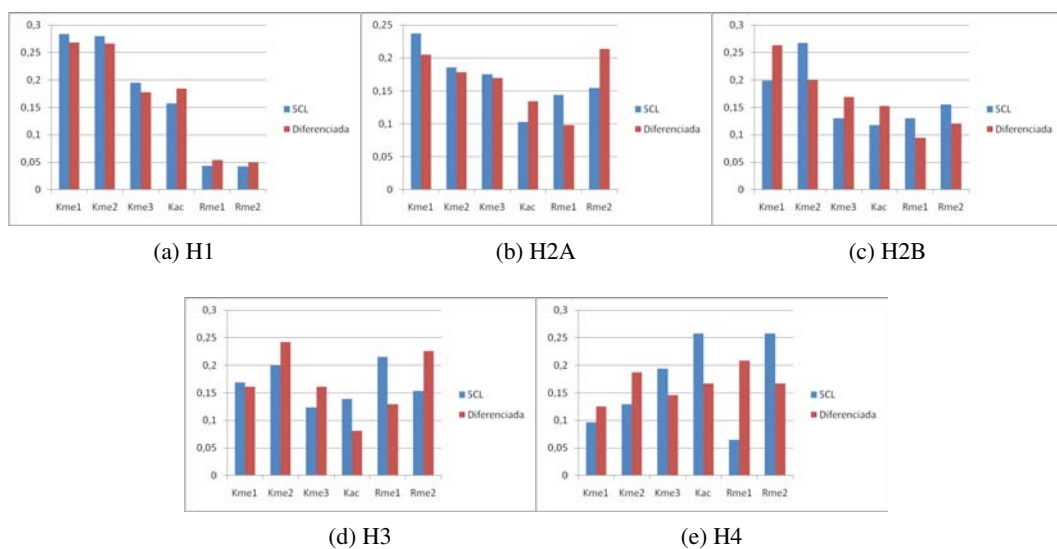


Figura 5.1.5: Análise comparativa do perfil de modificações de cada classe de histonas

A análise comparativa do perfil de modificações das diferentes classes de histonas, sugere ainda que a contribuição de argininas modificadas para o total PTMs identificadas na H1, é bastante inferior ao observado nas restantes classes, devendo-se isto, principalmente, ao menor teor deste aminoácido na estrutura primária da H1.

Atendendo ao grau de diferenciação celular, é de salientar a maior variação no perfil de modificações nas classes H3 e H4. No sentido de obter uma melhor visualização das PTMs identificadas nestas classes de histonas e das diferenças do perfil de modificação entre as condições em estudo, contextualizou-se as PTMs identificadas na sequência das histonas H3 e H4 (figura 5.1.6).

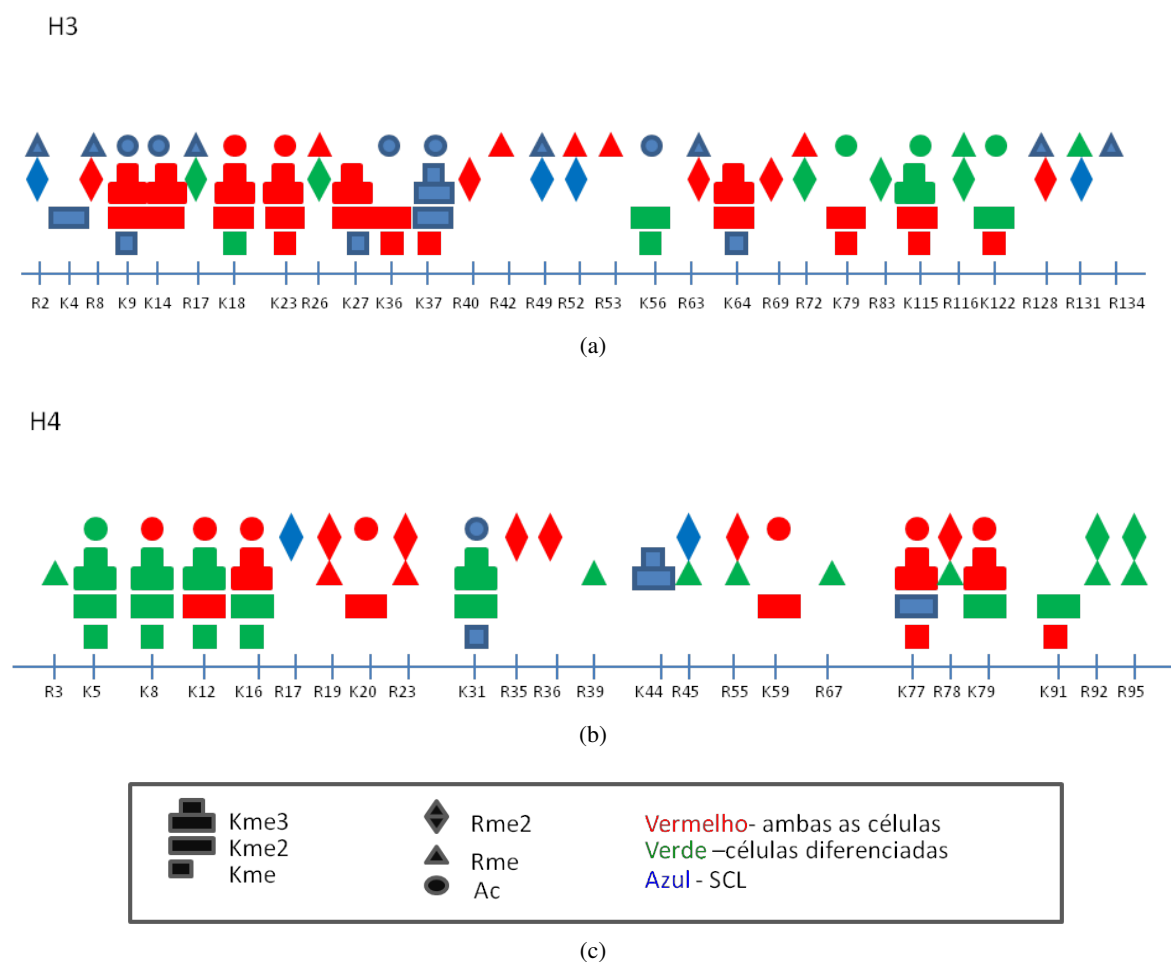


Figura 5.1.6: Localização dos resíduos de aminoácido alvo de acetilação e de mono-, di- e trimetilação na histona H3 e H4. (a) Histona H3. (b) Histona H4. (c) Legenda

Efectivamente, para a H3, observa-se uma diminuição da acetilação das lisinas e da monometilação das argininas, com um aumento da dimetilação das argininas, com o processo de diferenciação celular. Um perfil oposto é observado na H4, pois apesar de se observar uma diminuição da acetilação, como ocorre em H3, verifica-se um aumento da monometilação de argininas, concomitante a uma diminuição das dimetilações das argininas. Pode-se ainda notar a homologia entre as células SCL e diferenciadas, no que diz respeito a modificações na cauda N-terminal da histona H3 (figura 5.1.6a), ao contrário do que sucede na cauda N-terminal da histona H4 (figura 5.1.6b), em que predomina

minam as modificações no estado diferenciado. Nesta classe de histonas é de salientar a ocorrência de metilação e acetilação do resíduo K5, bem como a metilação dos resíduos R3, R39, R67 R92 e R95, observada apenas em células HC11 diferenciadas. Em oposição, apenas nas células estaminais se observou a trimetilação de K44 e a monometilação de R17.

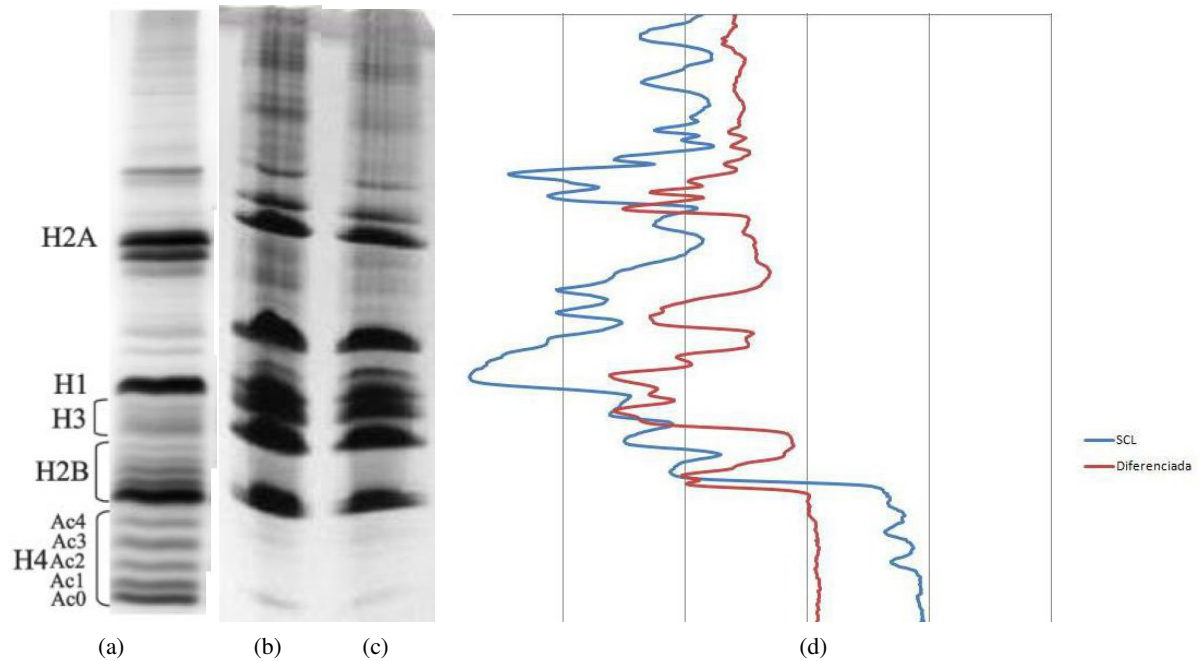


Figura 5.1.7: Separação das classes, variantes e níveis de acetilação de histonas das células SCL e diferenciadas. Em (a) é apresentada uma imagem representativa do perfil da separação de histonas por electroforese AUT-PAGE (6). A separação electroforética obtida para a amostra SCL encontra-se na imagem (b) e para a amostra diferenciada encontra-se na imagem (c). O perfil de densidades ópticas de cada amostra é apresentado em (d).

Paralelamente, utilizou-se uma abordagem metodológica diferente (electroforese AUT-PAGE) para analisar os níveis de modificação, em particular acetilações, nas diferentes variantes de histonas. Os resultados obtidos e apresentados na figura 5.1.7 sugerem uma diminuição das acetilações das histonas H3 e H4 com o processo de diferenciação celular, corroborando assim os resultados anteriormente descritos (figura 5.1.5).

5.2 Caracterização do proteoma nuclear de células HC11 SCL e diferenciadas

As proteínas nucleares foram separadas por 2D-PAGE (figura 5.2.1), tendo-se analisado duplicados das células SCL e diferenciadas. Da análise efectuada com o *software PDQuest* identificaram-se 342 ± 21 spots nas células SCL e 389 ± 35 spots nas células diferenciadas. Um total de 472 spots foram removidos dos géis e, após a análise por MALDI-TOF/TOF, 45 spots foram identificados positivamente, contendo 100 proteínas diferentes (apêndice B). As proteínas identificadas foram agrupadas em 7 classes diferentes de acordo com a sua função fisiológica: metabolismo, transporte, estrutura, ligação/*fold*ing de proteínas, transdução de sinal, apoptose e biossíntese DNA/RNA/Proteínas, tendo por base a informação obtida no *Gene Ontology Annotation* (GOA).

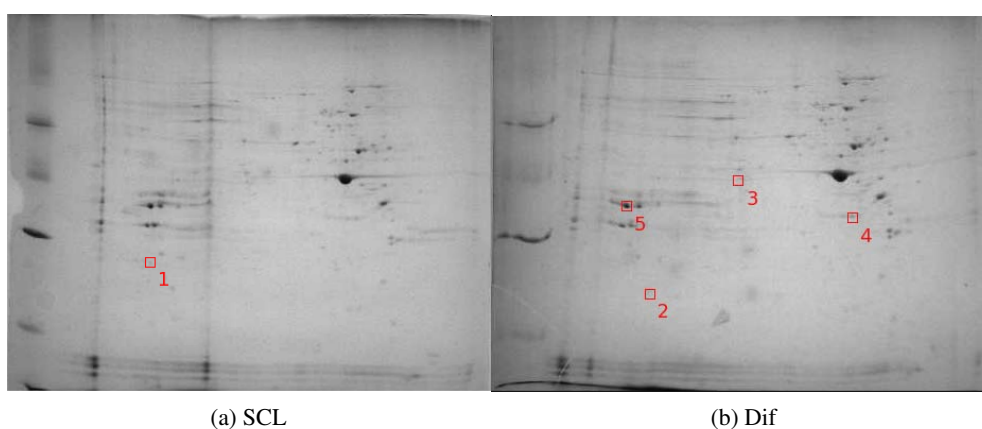


Figura 5.2.1: Análise comparativa do proteoma nuclear dos estadios SCL (a) e diferenciado (b) das células HC11. (Os spots assinalados nas imagens têm correspondência na tabela 5.3)

Como se pode constatar da análise da figura 5.2.2, 48% das proteínas identificadas pertencem à classe de biossíntese de DNA/RNA/Proteínas, seguindo-se as proteínas estruturais (18%), as de transdução de sinal (11%) e as de ligação/*fold*ing de proteínas (10%).

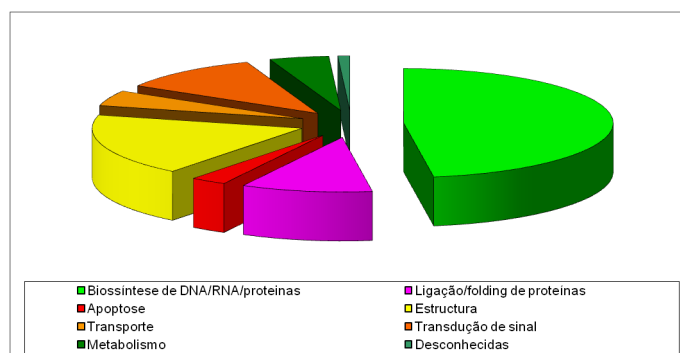


Figura 5.2.2: Distribuição das proteínas identificadas por classes funcionais, segundo o GOA

Relativamente à classe funcional “biossíntese de DNA/RNA/Proteínas”, é de salientar a identificação das proteínas envolvidas na regulação do perfil de PTMs das histonas (realçadas no apêndice B), tais como Desacetilase de histona 1 e 2 (HDAC1 e HDAC2), subunidade SAP18 do complexo HDAC e proteína do tipo RuvB1, componente do complexo acetiltransferase de histonas NuA4 e a metiltransferase dependente de S-adenosil-L-metionina (*tRNA Wybutosine-synthesizing protein 2 homolog*). De forma a analisar as potenciais interacções destas com outras proteínas nucleares, com significado na regulação das PTMs de histonas, procedeu-se a uma análise com o *Plug-in Apid* do *Cytoskape*.

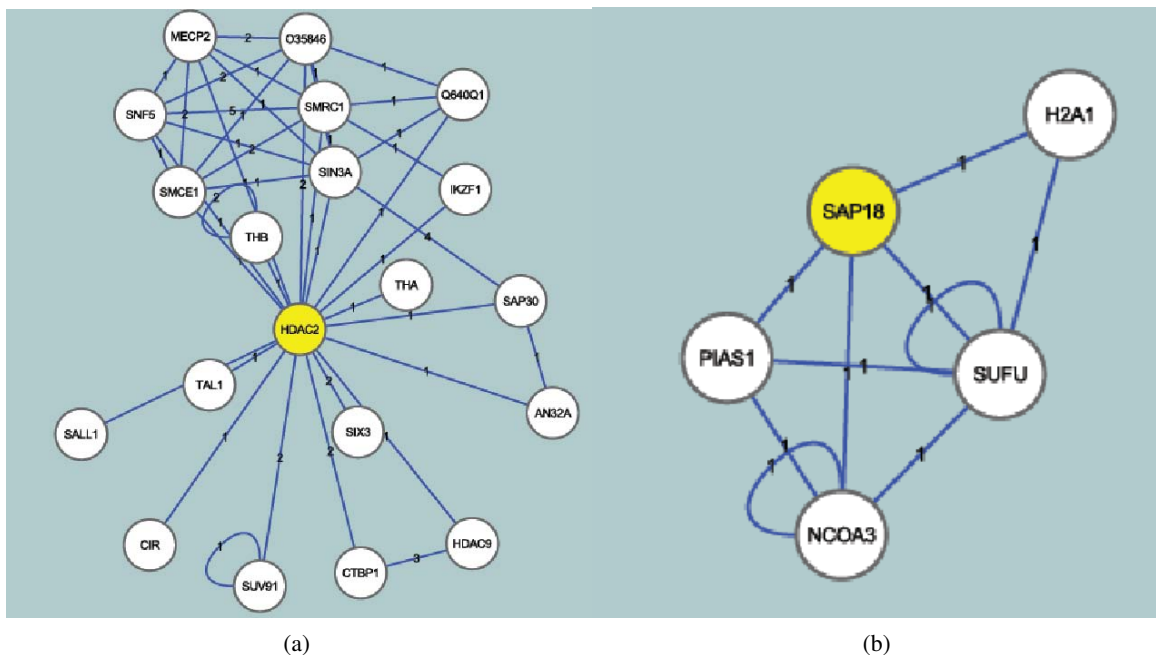


Figura 5.2.3: Esquema das potenciais interacções descritas na literatura que podem ser estabelecidas pela HDAC2 (a) e pela SAP18 (b)

Desta análise é de salientar as interacções das proteínas SAP18 (figura 5.2.3b e tabela 5.1) e da proteína HDAC2 (figura 5.2.3a e tabela 5.2). Como se pode constatar da análise da tabela 5.1, a subunidade do complexo HDAC interage com a histona H2A do tipo I, bem como com uma proteína ligase envolvida na sumoilação, uma PTM de histonas ligada à repressão de genes (1).

Relativamente à proteína HDAC2, da análise efectuada observou-se um número maior de proteínas com as quais esta enzima poderá interactuar, como por exemplo a HDAC9 ou a metiltransferase SUV39H1 (tabela 5.2).

Tabela 5.1: Possíveis interações estabelecidas pela SAP18, de acordo com o *Plug-in Apid* do *Cytoscape*

ID	APID_ID	CLUSTERIZATION F	DESCRIPTION	NCBI_GENE	UNIPROT_NAME	canonicalName
SAP18	51183	0.666667	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Sap18	SAP18_MOUSE	SAP18
NCOA3	45054	0.288889	Nuclear receptor coactivator 3	Ncoa3	NCOA3_MOUSE	NCOA3
SUFU	51180	0.071146	Suppressor of fused homolog	Sufu	SUFU_MOUSE	SUFU
PIAS1	48334	0.217949	E3 SUMO-protein ligase PIAS1	Pias1	PIAS1_MOUSE	PIAS1
H2A1	44477	0.333333	Histone H2A type 1	Hist1h2ab	H2A1_MOUSE	H2A1

Tabela 5.2: Possíveis interações estabelecidas pela HDAC2, de acordo com o *Plug-in Apid* do *Cytoscape*

ID	APID_ID	CLUSTERIZATION F	DESCRIPTION	NCBI_GENE	UNIPROT_NAME	canonicalName
SNF5	2991	0.355556	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1	Smarb1	SNF5_MOUSE	SNF5
SIX3	48829	0.0	Homeobox protein SIX3	Six3	SIX3_MOUSE	SIX3
O35846	2986	0.527778	Brm protein	Smarca2	O35846_MOUSE	O35846
Q640Q1	44534	0.166667	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	Arid1a	Q640Q1_MOUSE	Q640Q1
SALL1	51545	0.0	Sal-like protein 1	Sall1	SALL1_MOUSE	SALL1
SUV91	10773	0.054545	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H1	Suv39h1	SUV91_MOUSE	SUV91
SMCE1	2992	0.290909	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator chromatin subfamily E member 1	Smarce1	SMCE1_MOUSE	SMCE1
IKZF1	3270	0.065359	DNA-binding protein Ikaros	Ikzf1	IKZF1_MOUSE	IKZF1
CTBP1	3291	0.038462	C-terminal-binding protein 1	Ctbp1	CTBP1_MOUSE	CTBP1
AN32A	18832	0.1	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	Anp32a	AN32A_MOUSE	AN32A
TAL1	44183	0.03268	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1 homolog	Tal1	TAL1_MOUSE	TAL1
SMRC1	2987	0.269231	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	Smarcc1	SMRC1_MOUSE	SMRC1
SAP30	3262	0.178571	Histone deacetylase complex subunit SAP30	Sap30	SAP30_MOUSE	SAP30
CIR	19131	0.254545	CBF1-interacting corepressor	CIR	CIR_HUMAN	CIR
THA	16801	0.125	Thyroid hormone receptor alpha	THRA	THA_HUMAN	THA
MECP2	2989	0.535714	Methyl-CpG-binding protein 2	Mecp2	MECP2_MOUSE	MECP2
HDAC9	3193	0.035714	Histone deacetylase 9	Hdac9	HDAC9_MOUSE	HDAC9
HDAC2	2988	0.128655	Histone deacetylase 2	Hdac2	HDAC2_MOUSE	HDAC2
THB	15415	0.078571	Thyroid hormone receptor beta	THRB	THB_HUMAN	THB
SIN3A	2990	0.099567	Paired amphipathic helix protein Sin3a	Sin3a	SIN3A_MOUSE	SIN3A

Comparando o perfil dos géis 2D dos diferentes tipos de células, com o *software PDQuest*, observou-se uma homologia de 62%. Na pesquisa das proteínas diferentemente expressas entre as células SCL e diferenciadas, observaram-se 21 *spots* diferentes, a maioria dos quais não foram identificados por MALDI-TOF/TOF.

Das 5 proteínas encontradas diferentemente expressas, 4 foram apenas observadas ou encontradas sobre-expressas nas células diferenciadas, sendo de salientar a *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* e a *Septin-2*, presentes apenas nas células diferenciadas e a *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2* observada apenas nas células SCL (tabela 5.3). A maioria destas proteínas pertencem à classe funcional "biossíntese de DNA/RNA/proteínas" (tabela 5.3).

Tabela 5.3: Proteínas identificadas diferentemente expressas nas células SCL e diferenciadas

Nº spot	Nome da proteína	Nº de acesso	Peso molecular	pI	SLC	Diferenciadas	Processo funcional
1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HCD2_MOUSE	27401,6	8,53	++		Metabolism
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_MOUSE	34175,25	9,27		++	DNA/RNA/protein biosynthesis
3	Septin-2	SEPT2_MOUSE	41499,27	6,1		++	Signal transduction
4	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1_MOUSE	27727,811	10,37		↑	DNA/RNA/protein biosynthesis
5	TAR DNA-binding protein 43	TADBP_MOUSE	44519,289	6,26		↑	Apoptosis, DNA/RNA /protein biosynthesis

(++ - identificadas apenas nessa amostra; ↑ - maior expressão)

Apesar de se terem observadas diferenças no teor de acetilação e metilação das histonas associadas ao grau de diferenciação celular (figura 5.1.7), na análise comparativa efectuada com o *software PDQuest* não se detectaram diferenças de densidade óptica entre os *spots* correspondentes às proteínas identificadas associadas à regulação das modificações de histonas.

6

Discussão

No sentido de estudar as alterações do proteoma nuclear no processo de diferenciação celular associado ao cancro da mama, utilizou-se como modelo a linha celular HC11. É reconhecido que a agressividade das células tumorais está associada às alterações pós-traducionais em histonas e em proteínas de regulação do processo da transcrição. Neste trabalho foram encontradas 2659 PTMs diferentes, das quais apenas 23 foram identificadas por MALDI-TOF/TOF, nas diversas classes de histonas e suas variantes (apêndice A). Adicionalmente, foram identificadas 100 proteínas nucleares (apêndice B), a maioria das quais associadas à “biossíntese de DNA/RNA/Proteínas”. Atendendo ao grau de diferenciação das células analisadas, observaram-se grandes diferenças no perfil de PTMs em histonas que não se correlacionaram com alterações de expressão de proteínas nucleares.

A metilação, acetilação e fosforilação são PTMs de histonas com efeitos reconhecidos na regulação da transcrição. No presente estudo procedeu-se a uma extracção ácida de histonas, o que inviabilizou a análise de fosforilações nestas proteínas nucleares, pelo que foi dado particular ênfase às metilações e acetilações. O efeito da acetilação na transcrição relaciona-se com o aumento do teor de eucromatina transcripcionalmente activa (156). Relativamente à regulação associada à metilação, esta pode ter efeitos distintos tendo em consideração que podem ocorrer diferentes níveis de metilação no mesmo resíduo de aminoácido. Assim, a metilação pode promover ou inibir a transcrição por favorecer ou impedir, respectivamente, a ligação de complexos de transcrição às sequências de DNA que interactivam com as histonas modificadas (45).

Da análise geral das variantes de histonas identificadas (apêndice A), salienta-se a ausência da histona H3.2 na amostra diferenciada e a presença de variantes não observadas nas células no estado estaminal, nomeadamente, H2A type 1-F, H2A type 2-B e H2B type 1-K. Devido à abundância de lisinas na sequência primária destas proteínas, foi necessário o uso de duas proteases diferentes (tripsina e Glu-C) para se obter uma cobertura completa da sequência de aminoácidos das histonas. Esta opção metodológica baseou-se no facto de as diferenças na estrutura primária de variantes de histonas poderem estar localizadas em péptidos muito pequenos (diferenças de apenas 1 aminoácido), o que dificulta a sua identificação. Apesar de se terem utilizado duas proteases distintas, não se identificaram todas as variantes descritas na literatura.

A análise global do perfil de PTMs nas classes das histonas H3 e H4, evidencia uma diminuição da proporção de acetilações em diferentes resíduos de aminoácidos com a diferenciação celular (figura 5.1.5d e 5.1.5e). Estes resultados são confirmados pelo perfil electroforético observado nos géis

AUT-PAGE (figura 5.1.7b e figura 5.1.7c). Nestes géis observou-se ainda uma diminuição dos níveis de acetilação de H1 com a diferenciação celular. Esta diminuição da acetilação sugere que durante a diferenciação das células HC11 diminui a proporção de genes transcritos por diminuição de eucromatina (157). Paralelamente, o teor de metilação das classes de histonas H3 e H4 aumentou com a diferenciação celular, o que sugere a alteração dos processos de regulação da expressão de genes que envolvem a ligação de outros complexos proteicos, como por exemplo *Polycom* (1; 37).

Analisando as PTMs pelas diferentes variantes da classe de histonas H3 (apêndice A), observa-se mais modificações e maiores diferenças, entre as situações estudadas na variante H3.2 relativamente à H3.3B, o que sugere uma maior contribuição da H3.2 para o controlo epigenético. É de salientar ainda o facto de se ter observado H3K9me3 apenas na variante H3.2, tanto no estado estaminal como no estado diferenciado. Esta modificação específica tem sido associada à inibição da transcrição pela indução da formação da heterocromatina (127; 126; 158). Esta modificação não parece ser relevante no processo de diferenciação celular, uma vez que foi observada em ambas situações estudadas, no entanto será necessário uma análise quantitativa para corroborar esta observação.

Da análise do perfil de PTMs das histonas H3 (apêndice A), observa-se ainda a modificação do resíduo H3K27, que no estado estaminal da célula se encontra sob a forma mono- e dimetilada. Segundo Lee *et al* (93), a ligação de complexos *Polycomb* a este resíduo trimetilado (H3K27me3) causa a repressão de genes. Atendendo aos resultados obtidos, apenas nas células diferenciadas parece ocorrer a repressão genética por este mecanismo. De acordo com Rice e Allis (159), a acetilação da lisina 9 da histona H3 mantém as regiões do genoma transcripcionalmente, por impedimento da metilação da lisina 9. Como se pode observar na figura 5.1.6a, a H3K9ac apenas foi identificada nas células estaminais, indicando assim um estado permissivo à transcrição nesta fase do processo de diferenciação celular.

No presente estudo, verificou-se a ausência de H3K4me2 no estado diferenciado, estando presente apenas no estado estaminal, o que sugere a associação desta modificação específica ao processo de diferenciação celular. Estes resultados estão de acordo com Orford (160), a perda de H3K4me2 na passagem do estado estaminal ao estado diferencial dos eritrócitos, ocorria a perda de H3K4me2 em muitos promotores de genes, deduzindo que esta modificação identifica os genes a serem transcritos.

No caso da histona H4, além dos níveis de acetilação já analisados acima, observa-se um considerável aumento do número de resíduos de arginina monometilados, bem como resíduos de lisina mono- e dimetilados com a diferenciação celular (figura 5.1.5e e apêndice A). Como se pode observar na figura 5.1.6, as maiores diferenças são observadas na região N-terminal das histonas H3 e H4. Atendendo à quantidade de PTMs identificadas na cauda N-terminal da histona H4 com o processo de diferenciação e, pela relevância das modificações da cauda das histonas para o “código das histonas” (20; 21; 22), a histona H4 parece exercer uma maior contribuição no controlo epigenético associado à diferenciação celular.

Da análise global dos resultados é possível identificar um conjunto de factores que regulam a passagem das células do estado estaminal para o estado diferenciado, tais como marcadores reguladores da transcrição (H3K4me2 nas células SCL e H3K27me3 nas células diferenciadas) e alterações dos níveis de acetilação (maiores no estado estaminal) que regulam a cromatina transcripcionalmente activa.

As alterações do perfil de PTMs de histonas têm sido relacionadas com o desenvolvimento tumoral. Por exemplo, foi sugerido que os níveis de H3K9me3 na histona H3.2 diminui em certos tumores (160). Segundo Pogribny *et al* (161), os níveis de H4K20me3 diminuem bastante, enquanto que os níveis de H3K29me3 aumentam drasticamente no cancro. Paralelamente, ocorre uma dimi-

nuição do teor relativo de H3K9ac e o aumento de H4K16ac. De entre estas modificações apontadas como marcadores de cancro, apenas a H3K9ac foi observada exclusivamente nas células estaminais. Apesar de não ter sido efectuada uma análise quantitativa das modificações identificadas, os resultados do presente estudo evidenciam algum paralelismo entre o processo de diferenciação de células HC11 e o desenvolvimento tumoral (162).

Com intuito de identificar alterações do proteoma relacionadas com a variação do perfil de PTMs nas células HC11 durante o processo de diferenciação, procedeu-se a uma análise por 2D-PAGE-MS/MS de núcleos isolados de células estaminais e diferenciadas (figura 5.2.1). Esta análise permitiu a identificação de 100 proteínas diferentes, a maioria das quais pertencentes à classe de “biossíntese de DNA/RNA/Proteínas”. A análise comparativa dos géis 2D-PAGE de células SCL e diferenciadas evidenciou diferenças em 21 *spots*, tendo sido apenas identificadas 5 proteínas (tabela 5.3). Nas células diferenciadas observou-se um aumento da expressão das proteínas *Splicing factor, arginine/serine-rich 1* e *TAR DNA-binding protein 43*. A proteína *TAR DNA-binding protein 43* está envolvida na regulação da transcrição e do *splicing* do mRNA. Esta proteína de 45kDa é uma ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP), cuja função celular permanece pouco conhecida. No entanto, Ayala *et al* (163) verificaram que a perda desta proteína resulta na desregulação do ciclo celular e na apoptose. Um perfil de expressão semelhante foi observado para outra ribonucleoproteína nuclear heterogénea, a *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*, mais expressa em células diferenciadas (tabela 5.3). A depleção dos seus níveis nucleares pode contribuir para a proliferação celular (164), podendo ser considerada um marcador de proliferação infinita (164). A sobre-expressão desta proteína já foi observada no cancro do pulmão (165), do cólon (166) e também no cancro da mama (167). Li *et al* (167), utilizando *western blotting* e imunohistoquímica, observaram uma elevada expressão de hnRNP A1 em tecido tumoral da mama (167). A maior expressão desta proteína no estado diferenciado parece, mais uma vez, justificar o uso das células HC11 para estudo do cancro da mama. No presente estudo, observou-se ainda a sobre-expressão da proteína *Splicing factor, arginine/serine-rich 1* nas células diferenciadas. Esta proteína é um potente proto-oncogene com expressão anormal em muitos tumores (168). No entanto, múltiplos mecanismos pós-transcricionais e traducionais parecem estar envolvidos na regulação da expressão da *Splicing factor, arginine/serine-rich 1* (168), não se conhecendo estudos que relacionem alterações da sua expressão com o processo de diferenciação celular.

Em relação às proteínas reguladoras de modificações de histonas identificadas no presente estudo, tais como desacetilases de histonas 1 e 2 (HDAC1 e HDAC2), subunidade SAP18 do complexo HDAC e proteína do tipo RuvB1, componente do complexo acetiltransferase de histonas NuA4 e a metiltransferase dependente de S-adenosil-L-metionina (*tRNA Wybutosine-synthesizing protein 2 homolog*) (apêndice B), de acordo com a análise comparativa realizada com o *software PDQuest*, não se observaram diferenças de expressão induzidas pelo processo de diferenciação celular. De entre estas proteínas, tem sido sugerido que a proteína SAP18 desempenha um papel fundamental no recrutamento gene-específico do complexo HDAC envolvido na regulação da acetilação das histonas H2A tipo 1 (tabela 5.1) (169). Paralelamente à não observação de variação na expressão desta proteína, não se identificaram diferenças no teor de acetilação desta variante de H2A. Estes resultados, aliados às diferenças observadas no teor de acetilação e metilação, em particular de H1, H3 e H4, sugerem a existência de mecanismos de regulação mais finos e ainda por estudar.

7

Conclusão

Com o intuito de caracterizar as alterações do proteoma nuclear da linha celular HC11, um modelo utilizado no estudo do cancro da mama, durante o seu processo de diferenciação, analisaram-se marcadores epigenéticos em histonas e caracterizou-se o seu proteoma nuclear.

De acordo com um dos objectivos do trabalho, o desenvolvimento de metodologias adequadas para a análise do proteoma e PTMs das histonas das células HC11, conseguiram-se obter resultados comparáveis aos encontrados na literatura. Mais ainda, o uso de ionização por *electrospray* com um espectrómetro de massa do tipo Trapa Linear revelou-se mais eficaz na detecção de modificações pós-traducionais (99% de todas as PTMs identificadas).

De acordo com a literatura, o grau de diferenciação celular traduz-se por uma diminuição da capacidade de expressão génica. A diminuição do grau de acetilação nas classes de histonas H3 e H4, detectada por AUT-PAGE, a diminuição do número de resíduos de aminoácidos acetilados e o aumento dos metilados em H3 e H4, a presença do resíduo trimetilado H3K27 apenas nas células diferenciadas, a identificação da H3K9 acetilada e de H3K4 dimetilada apenas nas células estaminais suportam esta noção. No entanto, o número mais elevado de PTMs diferentes observado no N-terminal da H4 sugere uma importante, e ainda desconhecida, contribuição desta classe de histonas na regulação epigenética do processo de diferenciação celular. É ainda de salientar a elevada susceptibilidade do resíduo K5 de H4 a modificações, apenas observadas em células diferenciadas. A identificação de H3K9ac apenas nas células estaminais corrobora a sua utilização como modelo para o estudo dos processos de regulação epigenética no cancro da mama.

O processo de diferenciação celular induziu a alteração do proteoma nuclear, traduzida na presença de 21 *spots* com densidades ópticas diferentes. De entre as proteínas diferentemente expressas, é de salientar as hnRNPs associadas ao processo de apoptose e proliferação celular.

As inúmeras PTMs observadas na H1 e na componente globular das diferentes histonas do nucleossoma, bem como o aumento das variantes de H2 e da expressão de proteínas nucleares de associadas à “biossíntese de DNA/RNA/Proteínas” em células HC11 diferenciadas, indicam a existência de mecanismos de regulação mais finos e ainda por estudar.

Bibliografia

- [1] Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
- [2] Lachner, M., O’Sullivan, R. J. & Jenuwein, T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science* **116**, 2117–2124 (2003).
- [3] Albert, M. & Helin, K. Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol* (2009).
- [4] Kamakaka, R. & Biggins, S. Histone variants: deviants? *Genes & Development* **19**, 295–310 (2005).
- [5] Kondo, Y. Epigenetic cross-talk between dna methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Medical Journal* **50**, 455–463 (2009).
- [6] Myers, F., Chong, W., Evans, D., Thorne, A. & Crane-Robinson, C. Acetylation of histone h2b mirrors that of h4 and h3 at the chicken beta-globin locus but not at housekeeping genes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36315–36322 (2003).
- [7] Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry* (W.H. Freeman), fourth edn.
- [8] Dobosy, J. & Selker, E. Emerging connections between dna methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 721–727 (2001).
- [9] Jenuwein, T. & Allis, C. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
- [10] Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427–5440 (2002).
- [11] Feinberg, A. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983).
- [12] Fraga, M. F. *et al.* Loss of acetylation at lys16 and trimethylation at lys20 of histone h4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* **37**, 391–400 (2005).
- [13] Seligson, D. *et al.* Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* **435**, 1262–1266 (2005).
- [14] Elsheikh, S. E. *et al.* Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Research* **69**, 3802–3809 (2009).
- [15] Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. Structure of the nucleosome core particle at 7a resolution. *Nature* **311**, 532–537 (1984).

- [16] Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E. & Moudrianakis, E. N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1- \AA resolution - a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10148–10152 (1991).
- [17] Holde, K. E. V. *Chromatin*. Molecular And Cell Biology (Springer, 1988).
- [18] Wolffe, A. P. & Hayes, J. J. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research* **27**, 711–720 (1999).
- [19] Hake, S. B., Xiao, A. & Allis, C. D. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer* **90**, 761–769 (2004).
- [20] Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 \AA resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
- [21] Koolman, J. & Roehm, K.-H. *Color atlas of biochemistry* (Thieme, Stuttgart, 1996).
- [22] Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S. The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669–681 (2007).
- [23] Feng, Q. *et al.* Methylation of h3-lysine 79 is mediated by a new family of hmtases without a set domain. *Current Biology* **12**, 1052–1058 (2002).
- [24] Lacoste, N., Utley, R. T., Hunter, J. M., Poirier, G. G. & Cote, J. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone h3 methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 30421–30424 (2002).
- [25] Ng, H. H. *et al.* Lysine methylation within the globular domain of histone h3 by dot1 is important for telomeric silencing and sir protein association. *Genes and Development* **16**, 1518–1527 (2002).
- [26] van Leeuwen, F., Gafken, P. R. & Gottschling, D. E. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**, 745–56 (2002).
- [27] Tweedie-Cullen, R. Y., Reck, J. M. & Mansuy, I. M. Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain. *J Proteome Res* **8**, 4966–82 (2009).
- [28] Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Reversing histone methylation. *Nature* **436**, 1103–1106 (2005).
- [29] Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: Implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 243–269 (2006).
- [30] Bannister, A. J., Schneider, R. & Kouzarides, T. Histone methylation: Dynamic or static? *Cell* **109**, 801–806 (2002).
- [31] Wang, X. & Zhu, W. G. [advances in histone methyltransferases and histone demethylases]. *Ai Zheng* **27**, 1018–25 (2008).
- [32] Turner, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836–845 (2000).

- [33] Grewal, S. I. S. & Moazed, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**, 798–802 (2003).
- [34] Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
- [35] Villar-Garea, A. & Imhof, A. Fine Mapping of Posttranslational Modifications of the Linker Histone H1 from *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **3** (2008).
- [36] Shogren-Knaak, M. *et al.* Histone h4-k16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–847 (2006).
- [37] Margueron, R., Trojer, P. & Reinberg, D. The key to development: interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics and Development* **15**, 163–176 (2005).
- [38] Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116–1122 (2005).
- [39] Nelson, C. J., Santos-Rosa, H. & Kouzarides, T. Proline isomerization of histone h3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**, 905–916 (2006).
- [40] Clements, A. *et al.* Structural basis for histone and phosphohistone binding by the gcn5 histone acetyltransferase. *Molecular Cell* **12**, 461–473 (2003).
- [41] Grunau, C., Buard, J., Brun, M.-E. & De Sario, A. Mapping of the juxtacentromeric heterochromatin-euchromatin frontier of human chromosome 21. *Genome Research* **16**, 1198–1207 (2006).
- [42] Bernstein, B. E. *et al.* Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169–181 (2005).
- [43] Wang, H. *et al.* Purification and functional characterization of a histone h3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* **8**, 1207–17 (2001).
- [44] Nishioka, K. *et al.* Set9, a novel histone h3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes and Development* **16**, 479–489 (2002).
- [45] Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development* **15**, 2343–2360 (2001).
- [46] Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 435–+ (2000).
- [47] Nowak, S. J. & Corces, V. G. Phosphorylation of histone h3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics* **20**, 214–220 (2004).
- [48] Nathan, D. *et al.* Histone sumoylation is a negative regulator in *saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes and Development* **20**, 966–976 (2006).

- [49] Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hottiger, M. O. Nuclear adp-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 789–829 (2006).
- [50] Cuthbert, G. L. *et al.* Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545–553 (2004).
- [51] Wang, H. B. *et al.* Histone h3 and h4 ubiquitylation by the cul4-ddb-roc1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to dna damage. *Molecular Cell* **22**, 383–394 (2006).
- [52] Park, G., Gong, Z., Chen, J. & Kim, J.-E. Characterization of the DOT1L Network: Implications of Diverse Roles for DOT1L. *Protein Journal* **29**, 213–223 (2010).
- [53] Rea, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone h3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599 (2000).
- [54] Agger, K., Christensen, J., Cloos, P. A. C. & Helin, K. The emerging functions of histone demethylases. *Current Opinion in Genetics and Development* **18**, 159–168 (2008).
- [55] Bracken, A. P. *et al.* Ezh2 is downstream of the prb-e2f pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo Journal* **22**, 5323–5335 (2003).
- [56] Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein ezh2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624–629 (2002).
- [57] Kleer, C. G. *et al.* Ezh2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11606–11611 (2003).
- [58] Collett, K. *et al.* Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clinical Cancer Research* **12**, 1168–1174 (2006).
- [59] Weikert, S. *et al.* Expression levels of the ezh2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *International Journal of Molecular Medicine* **16**, 349–353 (2005).
- [60] Chadwick, R. B. *et al.* Candidate tumor suppressor riz is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2662–2667 (2000).
- [61] Fang, W. *et al.* Preferential loss of a polymorphic riz allele in human hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* **84**, 743–747 (2001).
- [62] Rahman, N. Mechanisms predisposing to childhood overgrowth and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* **15**, 227–233 (2005).
- [63] Tatton-Brown, K. *et al.* Genotype-phenotype associations in sotos syndrome: An analysis of 266 individuals with nsd1 aberrations. *American Journal of Human Genetics* **77**, 193–204 (2005).

- [64] Sjoblom, T. *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**, 268–274 (2006).
- [65] Tam, W. *et al.* Mutational analysis of *prdm1* indicates a tumor-suppressor role in diffuse large b-cell lymphomas. *Blood* **107**, 4090–4100 (2006).
- [66] Angrand, P. O. *et al.* *Nsd3*, a new set domain-containing gene, maps to 8p12 and is amplified in human breast cancer cell lines. *Genomics* **74**, 79–88 (2001).
- [67] Kolomietz, E. *et al.* Quantitative pcr identifies a minimal deleted region of 120 kb extending from the philadelphia chromosome *abl* translocation breakpoint in chronic myeloid leukemia with poor outcome. *Leukemia* **17**, 1313–1323 (2003).
- [68] Kleefstra, T. *et al.* Disruption of the gene euchromatin histone methyl transferase1 (*eu-hmtase1*) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Journal of Medical Genetics* **42**, 299–306 (2005).
- [69] Skawran, B. *et al.* Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions. *Modern Pathology* **21**, 505–516 (2008).
- [70] Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. Mll translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Reviews Cancer* **7**, 823–833 (2007).
- [71] Rosati, R. *et al.* *Nup98* is fused to the *nsd3* gene in acute myeloid leukemia associated with *t(8;11)(p11.2;p15)*. *Blood* **99**, 3857–3860 (2002).
- [72] Cerveira, N. *et al.* Frequency of *nup98-nsd1* fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. *Leukemia* **17**, 2244–2247 (2003).
- [73] La Starza, R. *et al.* Cryptic insertion producing two *nup98/nsd1* chimeric transcripts in adult refractory anemia with an excess of blasts. *Genes Chromosomes Cancer* **41**, 395–9 (2004).
- [74] Chesi, M. *et al.* The *t(4;14)* translocation in myeloma dysregulates both *fgfr3* and a novel gene, *mmset*, resulting in *igh/mmset* hybrid transcripts. *Blood* **92**, 3025–34 (1998).
- [75] Du, Y. *et al.* Hypermethylation in human cancers of the *riz1* tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily. *Cancer Research* **61**, 8094–8099 (2001).
- [76] Lal, G. *et al.* *Riz1* is epigenetically inactivated by promoter hypermethylation in thyroid carcinoma. *Cancer* **107**, 2752–2759 (2006).
- [77] Piao, G. H. *et al.* Hyper-methylation of *riz1* tumor suppressor gene is involved in the early tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Histology and Histopathology* **23**, 1171–1175 (2008).
- [78] Deng, Q. D. & Huang, S. *Prdm5* is silenced in human cancers and has growth suppressive activities. *Oncogene* **23**, 4903–4910 (2004).
- [79] Watanabe, Y. *et al.* *Prdm5* identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clinical Cancer Research* **13**, 4786–4794 (2007).

- [80] Varambally, S. *et al.* Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase ezh2 in cancer. *Science* **322**, 1695–1699 (2008).
- [81] Nie, K. *et al.* MicroRNA-mediated down-regulation of prdm1/blimp-1 in hodgkin/reed-sternberg cells: A potential pathogenetic lesion in hodgkin lymphomas. *American Journal of Pathology* **173**, 242–252 (2008).
- [82] Pasqualucci, L. *et al.* Inactivation of the prdm1/blimp1 gene in diffuse large b cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 311–317 (2006).
- [83] Courts, C. *et al.* Recurrent inactivation of the prdm1 gene in primary central nervous system lymphoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **67**, 720–727 (2008).
- [84] Zhao, W. L. *et al.* Prdm1 is involved in chemoresistance of t-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood* **111**, 3867–3871 (2008).
- [85] D’Costa, K. *et al.* Blimp1 is limiting for transformation in a mouse plasmacytoma model. *Blood* **113**, 5911–5919 (2009).
- [86] Lee, J. H., Hart, S. R. L. & Skalnik, D. G. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* **38**, 32–38 (2004).
- [87] De Felice, L. D. *et al.* Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Research* **65**, 1505–1513 (2005).
- [88] Snykers, S. *et al.* Chromatin remodeling agent trichostatin a: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *Bmc Developmental Biology* **7**, – (2007).
- [89] Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F. & Pelicci, P. G. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* **20**, 3110–3115 (2001).
- [90] Munster, P. N., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. & Richon, V. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (saha) induces differentiation of human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* **7**, 3725s–3725s (2001).
- [91] Levenson, J. M. & Sweatt, J. D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1009–1016 (2006).
- [92] Meshorer, E. *et al.* Hyperdynamic plasticity in pluripotent embryonic of chromatin proteins stem cells. *Developmental Cell* **10**, 105–116 (2006).
- [93] Lee, T. I. *et al.* Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301–13 (2006).
- [94] Sanders, S. L. *et al.* Methylation of histone h4 lysine 20 controls recruitment of crb2 to sites of dna damage. *Cell* **119**, 603–614 (2004).

- [95] Biron, V. L., McManus, K. J., Hu, N. H., Hendzel, M. J. & Underhill, D. A. Distinct dynamics and distribution of histone methyl-lysine derivatives in mouse development. *Developmental Biology* **276**, 337–351 (2004).
- [96] Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315–326 (2006).
- [97] Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. & Tada, T. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 5710–5720 (2004).
- [98] Old, R. & Woodland, H. Histone genes - not so simple after all. *CELL* **38**, 624–626 (1984).
- [99] Brandt, W. *et al.* Histone program during the life-cycle of the sea-urchin. *European Journal of Biochemistry* **94**, 1–10 (1979).
- [100] Zweidler, A. *Core histone variants of the mouse: primary structure and differential expression*, 339–369 (Wiley/Interscience, New York, 1984).
- [101] Wunsch, A., Reinhardt, K. & Lough, J. Normal transitions in synthesis of replacement histones h2a.z and h3.3 during differentiation of dystrophic myotube cells - a brief note. *Mechanisms of Ageing and Development* **59**, 299–305 (1991).
- [102] Bosch, A. & Suau, P. Changes in core histone variant composition in differentiating neurons - the roles of differential turnover and synthesis rates. *European Journal of Cell Biology* **68**, 220–225 (1995).
- [103] Pina, B. & Suau, P. Changes in histone h2a and h-3 variant composition in differentiating and mature rat-brain cortical-neurons. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **123**, 51–58 (1987).
- [104] Poccia, D. & Green, G. Packagin and unpackaging the sea-urchin sperm genome. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 223–227 (1992).
- [105] DOENECKE, D., ALBIG, W., BOUTERFA, H. & DRABENT, B. Organization and expression of h1 histone and h1 replacement histone genes. *Journal of Cellular Biochemistry* **54**, 423–431 (1994).
- [106] Buttinelli, M., Panetta, G., Rhodes, D. & Travers, A. The role of histone h1 in chromatin condensation and transcriptional repression. *Genetica* **106**, 117–124 (1999).
- [107] Costanzi, C. & Pehrson, J. Histone macroh2a1 is concentrated in the inactive x chromosome of female mammals. *NATURE* **393**, 599–601 (1998).
- [108] Mermoud, J., Costanzi, C., Pehrson, J. & Brockdorff, N. Histone macroh2a1.2 relocates to the inactive x chromosome after initiation and propagation of x-inactivation. *Journal of Cell Biology* **147**, 1399–1408 (1999).
- [109] Ladurner, A. Inactivating chromosomes: A macro domain that minimizes transcription. *Molecular Cell* **12**, 1–3 (2003).
- [110] Perche, P. *et al.* Higher concentrations of histone macroh2a in the barr body are correlated with higher nucleosome density. *Current Biology* **10**, 1531–1534 (2000).

- [111] Angelov, D. *et al.* The histone variant macroh2a interferes with transcription factor binding and swi/snf nucleosome remodeling. *Molecular Cell* **11**, 1033–1041 (2003).
- [112] Abbott, D. *et al.* Structural characterization of macroh2a containing chromatin. *Biochemistry* **43**, 1352–1359 (2004).
- [113] Angelov, D. *et al.* Swi/snf remodeling and p300-dependent transcription of histone variant h2abbd nucleosomal arrays. *EMBO JOURNAL* **23**, 3815–3824 (2004).
- [114] Bao, Y. *et al.* Nucleosomes containing the histone variant h2a.bbd organize only 118 base pairs of dna. *EMBO Journal* **23**, 3314–3324 (2004).
- [115] Gautier, T. *et al.* Histone variant h2abbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Reports* **5**, 715–720 (2004).
- [116] Chadwick, B. & Willard, H. A novel chromatin protein, distantly related to histone h2a, is largely excluded from the inactive x chromosome. *Journal of Cell Biology* **152**, 375–384 (2001).
- [117] Ahmad, K. & Henikoff, S. The histone variant h3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell* **9**, 1191–1200 (2002).
- [118] Lohr, D. & Hereford, L. Yeast chromatin is uniformly digested by dnase-i. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4285–4288 (1979).
- [119] Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* **3**, 415–428 (2002).
- [120] Weber, M. *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential dna methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics* **37**, 853–862 (2005).
- [121] Sparmann, A. & van Lohuizen, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer* **6**, 846–856 (2006).
- [122] Oda, H. *et al.* Monomethylation of histone h4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 2278–2295 (2009).
- [123] Peters, A. H. F. M. *et al.* Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337 (2001).
- [124] Bachmann, I. M. *et al.* Ezh2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 268–273 (2006).
- [125] van Haften, G. *et al.* Somatic mutations of the histone h3k27 demethylase gene utx in human cancer. *Nature Genetics* **41**, 521–523 (2009).
- [126] Kourmouli, N. *et al.* Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone h4 in animals. *J Cell Sci* **117**, 2491–501 (2004).

- [127] Schotta, G. *et al.* A silencing pathway to induce h3-k9 and h4-k20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes and Development* **18**, 1251–1262 (2004).
- [128] Dyson, M. H. *et al.* Map kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone h3 at s10 or s28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *Journal of Cell Science* **118**, 2247–2259 (2005).
- [129] Ait-Si-Ali, S. *et al.* A suv39h-dependent mechanism for silencing s-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *Embo Journal* **23**, 605–615 (2004).
- [130] Zempleni, J. & Daniel, H. *Molecular nutrition* (CABI Pub., Wallingford, Oxon, UK ; Cambridge, MA, 2003).
- [131] Coombes, M. M. *et al.* Resetting the histone code at cdkn2a in hnscc by inhibition of dna methylation. *Oncogene* **22**, 8902–8911 (2003).
- [132] Turner, B. M., Oneill, L. P. & Allan, I. M. Histone-h4 acetylation in human-cells - frequency of acetylation at different sites defined by immunolabeling with site-specific antibodies. *Febs Letters* **253**, 141–145 (1989).
- [133] Ball, R., Friis, R., Schoenenberger, C., Doppler, W. & Groner, B. Prolactin regulation of beta-casein gene-expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial-cell line. *EMBO Journal* **7**, 2089–2095 (1988).
- [134] Williams, C., Helguero, L., Edvardsson, K., Haldosen, L.-A. & Gustafsson, J.-A. Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression. *Breast Cancer Research* **11** (2009).
- [135] Banks, G. C., Deterding, L. J., Tomer, K. B. & Archer, T. K. Hormone-mediated dephosphorylation of specific histone h1 isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36467–36473 (2001).
- [136] Galasinski, S. C., Louie, D. F., Gloor, K. K., Resing, K. A. & Ahn, N. G. Global regulation of post-translational modifications on core histones. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2579–2588 (2002).
- [137] Zhang, K. L. *et al.* Identification of acetylation and methylation sites of histone h3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **306**, 259–269 (2002).
- [138] Zhang, K. L. *et al.* Histone acetylation and deacetylation - identification of acetylation and methylation sites of hela histone h4 by mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **1**, 500–508 (2002).
- [139] Strahl, B. D. *et al.* Methylation of histone h4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator prmt1. *Current Biology* **11**, 996–1000 (2001).
- [140] Cocklin, R. R. & Wang, M. Identification of methylation and acetylation sites on mouse histone h3 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* **22**, 327–334 (2003).

- [141] Rice, J. C. *et al.* Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Molecular Cell* **12**, 1591–1598 (2003).
- [142] Zhang, L. W., Eugeni, E. E., Parthun, M. R. & Freitas, M. A. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**, 77–86 (2003).
- [143] Freitas, M. A., Sklenar, A. R. & Parthun, M. R. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *Journal of Cellular Biochemistry* **92**, 691–700 (2004).
- [144] Carmen, A. A. *et al.* Yeast hos3 forms a novel trichostatin a-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12356–12361 (1999).
- [145] Goll, M. G. & Bestor, T. H. Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes and Development* **16**, 1739–1742 (2002).
- [146] Henry, K. W. & Berger, S. L. Trans-tail histone modifications: wedge or bridge? *Nature Structural Biology* **9**, 565–566 (2002).
- [147] Turner, B. M. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285–291 (2002).
- [148] Ahn, S. H. *et al.* Sterile 20 kinase phosphorylates histone h2b at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *s. cerevisiae*. *Cell* **120**, 25–36 (2005).
- [149] Cao, R., Tsukada, Y. & Zhang, Y. Role of bmi-1 and ring 1a in h2a ubiquitylation and hox gene silencing. *Molecular Cell* **20**, 845–854 (2005).
- [150] Zhu, B. *et al.* Monoubiquitination of human histone h2b: The factors involved and their roles in hox gene regulation. *Molecular Cell* **20**, 601–611 (2005).
- [151] Bonenfant, D., Coulot, M., Towbin, H., Schindler, P. & van Oostrum, J. Characterization of histone h2a and h2b variants and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 541–552 (2006).
- [152] www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?id=1533 .
- [153] Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D. & Hake, S. B. Extraction, purification and analysis of histones. *Nature Protocols* **2**, 1445–1457 (2007).
- [154] Walker, J. M. (ed.) *The Protein Protocols Handbook* (Humana Press, 2002), 2nd edn.
- [155] Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature* **227**, 680–& (1970).
- [156] Gorisch, S., Wachsmuth, M., Toth, K., Lichter, P. & Rippe, K. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of Cell Science* **118**, 5825–5834 (2005).
- [157] Hebbes, T., Thorne, A. & Cranerobinson, C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO Journal* **7**, 1395–1402 (1988).

- [158] Martens, J. *et al.* The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO Journal* **24**, 800–812 (2005).
- [159] Rice, J. & Allis, C. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 263–273 (2001).
- [160] Orford, K. *et al.* Differential h3k4 methylation identifies developmentally poised hematopoietic genes. *Developmental Cell* **14**, 798–809 (2008).
- [161] Pogribny, I. P., Tryndyak, V. P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I. & Ross, S. A. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *Journal of Nutrition* **137**, 216S–222S (2007).
- [162] Humphreys, R. & Rosen, J. Stably transfected hc11 cells provide an in vitro and in vivo model system for studying wnt gene function. *Cell Growth & Differentiation* **8**, 839–849 (1997).
- [163] Ayala, Y. M., Misteli, T. & Baralle, F. E. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **105**, 3785–3789 (2008).
- [164] Haley, B., Paunesku, T., Protic, M. & Woloschak, G. Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in dna damage repair. *Int J Radiat Biol* (2009).
- [165] Pino, I. *et al.* Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *LUNG CANCER* **41**, 131–143 (2003).
- [166] Ushigome, M. *et al.* Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* **26**, 635–640 (2005).
- [167] Li, S. *et al.* Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX. *JOURNAL OF PATHOLOGY* **218**, 327–336 (2009).
- [168] Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Karni, R. & Krainer, A. R. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY* **17**, 306–U70 (2010).
- [169] McCallum, S. A. *et al.* Structure of SAP18: A ubiquitin fold in histone deacetylase complex assembly. *BIOCHEMISTRY* **45**, 11974–11982 (2006).

H1.5 OS=Mus musculus		H1.5 OS=Mus musculus		R53me1		R53me2	
K135me1	K138me2	K118me3	K135ac	K135me1	K138me2	K118me3	K135ac
K136me1	K139me2	K147me3	K136ac	K136me1	K139me2	K147me3	K136ac
K139me1	K147me2	K189me3	K139ac	K139me1	K147me2	K189me3	K139ac
K148me1	K148me2	K199me3	K179ac	K148me1	K148me2	K199me3	K179ac
K151me1	K155me2	K25me3	K196ac	K151me1	K155me2	K25me3	K196ac
K152me1	K185me2	K33me3	K20ac	K152me1	K185me2	K21me3	K25ac
K170me1	K196me2	K45me3	K33ac	K170me1	K196me2	K108me3	K105ac
K191me1	K33me2	K51me3	K45ac	K191me1	K25me2	K116me3	K129ac
K16me1	K45me2	K120me3	K62ac	K96me1	K118me2	K128me3	K147ac
K31me1	K62me2	K138me3	K138ac	K109me1	K128me2	K129me3	K159ac
K33me1	K96me2	K152me3	K148ac	K118me1	K129me2	K138me3	K167ac
K45me1	K116me2	K159me3	K184ac	K138me1	K151me2	K151me3	K181ac
K51me1	K120me2	K176me3	K201ac	K159me1	K156me2	K152me3	K185ac
K116me1	K126me2	K182me3		K173me1	K191me2	K158me3	
K191me1	K128me2	K185me3		K174me1	K199me2	K206me3	
K147me1	K152me2			K185me1	K206me2		
K156me1	K158me2						
K176me1	K174me2						
K179me1	K179me2						
K181me1	K201me2						
K182me1	K209me2						
K189me1							
K194me1							
K22me1	K63me2	K22me3	K62ac	K22me1	K63me2	K22me3	K62ac
K25me1	K74me2	K33me3	K126ac	K25me1	K74me2	K33me3	K126ac
K51me1	K109me2	K51me3	K128ac	K51me1	K109me2	K51me3	K128ac
K62me1	K129me2	K180me3	K129ac	K62me1	K129me2	K180me3	K129ac
K63me1	K145me2	K193me3	K174ac	K63me1	K145me2	K193me3	K174ac
K137me1	K149me2	K195me3	K51ac	K137me1	K149me2	K195me3	K31ac
K139me1	K180me2	K63me3	K63ac	K139me1	K180me2	K31me3	K33ac
K178me1	K184me2	K74me3	K105ac	K178me1	K184me2	K45me3	K45ac
K181me1	K190me2	K80me3	K108ac	K181me1	K190me2	K105me3	K136ac
K184me1	K195me2	K118me3	K109ac	K184me1	K195me2	K108me3	K137ac
K188me1	K198me2	K120me3	K118ac	K188me1	K198me2	K126me3	K188ac
K190me1	K203me2	K128me3	K121ac	K190me1	K203me2	K129me3	K208ac
K198me1	K213me2	K140me3	K139ac	K198me1	K213me2	K181me3	K216ac
K203me1	K16me2	K154me3	K146ac	K203me1	K20me2	K190me3	
K205me1	K25me2	K157me3	K168ac	K205me1	K22me2	K203me3	
K20me1	K45me2	K184me3	K184ac	K20me1	K31me2		
K45me1	K80me2	K188me3	K190ac	K26me1	K140me2		
K74me1	K96me2		K200ac	K118me1	K174me2		
K96me1	K105me2		K210ac	K126me1	K178me2		
K108me1	K116me2			K206me1	K205me2		
K109me1	K118me2			K215me1			
K116me1	K121me2						
K120me1	K137me2						
K121me1	K138me2						
K140me1	K146me2						
K145me1	K147me2						
K146me1	K178me2						
K149me1	K188me2						
K156me1	K193me2						
K16me1	K215me2						
K193me1							
K195me1							

K200me1			H1.X OS=Mus musculus			K200me1				
K68me1	K39me2	K119me3	K172ac	R85me1	R117me2	K68me1	K39me2	K119me3	R85me1	R117me2
K74me1	K105me2	K159me3	K184ac	R117me1	R126me2	K74me1	K105me2	K159me3	R117me1	R126me2
K89me1	K114me2	K194me3	K75ac	R35me1	R162me2	K89me1	K114me2	K194me3	R61me1	R162me2
K93me1	K142me2	K197me3	K89ac	R126me1	R35me2	K93me1	K142me2	K197me3	R127me1	R154me2
K105me1	K165me2	K201me3	K142ac	R154me1	R127me2	K105me1	K165me2	K201me3	R155me1	R155me2
K114me1	K173me2	K22me3	K145ac			K114me1	K173me2	K36me3	R162me1	R169me2
K172me1	K178me2	K34me3	K165ac			K172me1	K178me2	K41me3	R211me1	
K173me1	K184me2	K40me3	K173ac			K173me1	K184me2	K68me3		
K178me1	K186me2	K74me3	K181ac			K178me1	K186me2	K93me3		
K179me1	K187me2	K105me3	K186ac			K179me1	K187me2	K181me3		
K184me1	K198me2	K114me3	K187ac			K184me1	K198me2	K184me3		
K206me1	K19me2	K118me3	K195ac			K206me1	K34me2	K186me3		
K41me1	K33me2	K142me3	K198ac			K19me1	K40me2	K195me3		
K75me1	K68me2	K145me3	K201ac			K22me1	K74me2	K198me3		
K144me1	K74me2	K158me3				K33me1	K118me2			
K187me1	K75me2	K172me3				K36me1	K119me2			
K194me1	K89me2	K173me3				K119me1	K157me2			
K197me1	K93me2	K178me3				K142me1	K158me2			
	K197me2	K179me3				K145me1	K165me2			
	K145me2	K187me3				K158me1				
	K172me2					K165me1				
	K181me2					K186me1				
	K194me2					K198me1				
	K195me2					K201me1				
	K201me2									
	K206me2									
H1oo OS=Mus musculus			H1oo OS=Mus musculus			H1oo OS=Mus musculus				
K229me1	K71me2	K57me3	K153ac	R59me1	R37me2	K229me1	K71me2	K57me3	R59me1	R37me2
K57me1	K133me2	K127me3	K201ac	R85me1	R62me2	K57me1	K133me2	K127me3	R85me1	R62me2
K87me1	K142me2	K133me3	K214ac	R136me1	R136me2	K71me1	K142me2	K133me3	R136me1	R136me2
K110me1	K153me2	K147me3	K231ac	R169me1	R168me2	K110me1	K153me2	K147me3	R136me1	R168me2
K112me1	K154me2	K148me3	K234ac	R193me1	R169me2	K123me1	K154me2	K148me3	R193me1	R169me2
K119me1	K159me2	K216me3	K236ac	R37me1	R217me2	K127me1	K159me2	K216me3	R38me1	R217me2
K125me1	K167me2	K87me3	K241ac	R99me1	R221me2	K128me1	K167me2	K125me3	R62me1	R221me2
K127me1	K186me2	K91me3	K71ac	R168me1	R44me2	K133me1	K186me2	K142me3	R217me1	R193me2
K133me1	K229me2	K112me3	K123ac			K142me1	K194me2	K154me3	R252me1	R293me2
K142me1	K231me2	K119me3	K125ac			K147me1	K229me2	K159me3		
K147me1	K234me2	K123me3	K128ac			K148me1	K231me2	K167me3		
K148me1	K253me2	K153me3	K142ac			K164me1	K234me2	K174me3		
K154me1	K294me2	K164me3	K183ac			K167me1	K253me2	K183me3		
K183me1	K184me2	K184me3	K188ac			K174me1	K294me2	K201me3		
K186me1	K112me2	K198me3	K216ac			K188me1	K57me2			
K190me1	K119me2	K229me3	K229ac			K190me1	K91me2			
K194me1	K123me2	K231me3				K198me1	K183me2			
K214me1	K125me2	K234me3				K201me1	K184me2			
K231me1	K127me2	K236me3				K241me1	K190me2			
K251me1	K128me2	K241me3				K285me1	K214me2			
K274me1	K147me2					K294me1	K236me2			
	K148me2					K296me1	K251me2			
	K164me2						K285me2			
	K174me2									
	K198me2									

H2A.1 OS=Mus Musculus	K95me1	K142me1 K147me1 K176me1 K197me1 K35me1 K118me1 K128me1 K150me1 K151me1 K153me1 K167me1 K170me1 K190me1	K142me2 K150me2 K151me2 K190me2 K197me2 K22me2 K118me2 K150me2 K153me2 K167me2 K170me2 K192me2 K202me2	K131me3 K153me3 K22me3 K35me3 K147me3 K158me3 K167me3 K176me3 K180me3 K192me3 K207me3	K22ac K43ac K64ac K123ac K158ac K170ac K183ac K190ac	R136me1 R37me1 R175me1 R182me1 R206me1	R139me2 R182me2 R23me2 R24me2 R163me2 R201me2	H2A.1 OS=Mus Musculus	R88me2	R99me1	R136me1 R37me1 R175me1 R182me1 R206me1	R139me2 R182me2 R23me2 R24me2 R163me2 R201me2	H2A.1 OS=Mus Musculus	R95me2*	R35me1	R32me2
H2A type 1-F OS=Mus musculus	K119me1 K127me1	K118me2 K127me1	K118me3	K119ac K118ac K125ac	R99me2		H2A type 1-F OS=Mus musculus		K75me1 K125me1	K74me2	K118me3 K127me3	K119ac K129ac		R81me1 R77me2 R81me2		
H2A type 1-K OS=Mus musculus	K9me1 K13me1 K15me1 K36me1 K118me1 K119me1 K125me1	K9me2	K9me3 K95me3 K99me3 K118me3 K125me3		R77me2 R81me1 R88me1 R17me1	R77me2 R81me2 R20me2 R29me2 R32me2 R35me2	H2A type 1-H OS=Mus musculus	K127me1	K9me1 K75me1	K99me2	K9me3 K95me3 K99me3 K118me3 K74me3 K119me3	K75ac		R20me1 R81me1 R88me1 R88me2	R77me2	
H2A type 2-C OS=Mus musculus		K95me2* K99me2*					H2A type 2-B OS=Mus musculus	K75me1 K88me1* K124me1	K124me2 K129me2		K127me3	K74ac K127ac		R77me2		
H2A type 4 OS=Rattus norvegicus	K5me1 K125me2	K5me2 K125me2	K5me3 K13me3		R20me1 R3me1 R17me1	R3me2 R29me2	H2A type 4 OS=Rattus norvegicus	K9me1	K13me2 K15me2 K119me2	K9ac	K5me3 K74me3 K75me3			R11me2 R17me2 R42me2 R71me2		
H2A.J OS=Mus musculus	K124me1 K126me1 K119me1 K127me1	K126me2 K127me2 K128me2	K119me3 K118me3	K99ac K118ac K128ac			H2A.J OS=Mus musculus	K124me1 K126me1 K118me1 K128me1	K99me2* K124me2	K99ac K119ac	K119me3 K126me3			R22me2 R84me2 R91me2 R31me2		
H2A.V OS=Mus musculus	K79me1 K101me1 K121me1	K7me2 K13me2 K115me2	K7me3 K121me3	K101ac K120ac	R84me1 R91me1 R19me1 R34me1	R22me2 R84me2 R91me2 R31me2	H2A.V OS=Mus musculus	K79me1 K101me1 K13me1 K15me1	K37me2 K74me2 K79me2 K79me2	K74ac K77ac K79ac K125ac	K4me3 K77me3			R22me2 R84me2 R91me2 R34me2		

K125me2	K77me1 K125me1	R45me2 R80me2
H2A.x OS=Mus musculus	K5me1 K13me1 K18me1 K119me1 K127me1 K134me1	R11me2 R17me2 R20me2 R35me2
H2A.x OS=Mus musculus	K9ac K133ac K119me3	R29me2 R32me1
H2A.Z OS= Mus musculus	K9me3 K36me3 K119me3	K5me2 K36me2
H2A.Z OS= Mus musculus	K11me3 K13me3	K9ac K101ac K115ac
H2B subacrosomal variant OS=Mus mus- culus	K15me2 K13me2 K119me3	K11me2 K13me2 K120me2
H2B subacrosomal variant OS=Mus mus- culus	K44me1 K44me2 K12me2	K21me2 K6me3 K6ac
H2B type 1 OS=Rattus norvegicus	K21me2 K44me1 K5me2 K11me2 K12me2 K16me2 K20me2 K23me2 K34me2	R16me2 R13me2 R20me2 R24me2 R7me2 R7me1 R31me1 R77me1 R78me1
H2B type 1-A OS=Mus musculus	K23me1 K16me1 K17me1 K21me1 K24me1 K29me1 K44me1 K109me1 K121me1 K6me1 K24me2 K28me2 K29me2 K86me2 K109me2 K117me2	R16me2 R24me2 R41me1 R70me1 R50me2 R70me2 R82me2 R93me1 R28me2 R30me2 R32me2 R34me2 R73me2 R100me2 K12ac K16ac K17ac K25me3 K21ac K31me2 K35me2 K24ac K29ac K35ac K117ac
H2B type 1-B OS=Mus musculus	K5me2 K11me2 K12me2 K16me2 K17me2 K21me2 K25me2 K31me2 K6me2 K13me2 K24me2 K28me2 K29me2 K86me2 K109me2 K117me2	K43me2 K43me2 K20me3 K12ac K16ac K21me3 K17me3 K24me3 K25me3 K21ac K109me3 K121me3 K24ac K29ac K35ac K117ac
H2B type 1-H OS=Mus musculus	K12me1 K15me1 K20me1	K23me2 K16me2 K20me2 K30me3
H2B type 1-H OS=Mus musculus	K12me1 K15me1 K16me1 K23me1 K30me1 K11me1	K5me2 K12me2 K15me2 K20me2 K27me2 K30me2 K5me1
H2B type 1-H OS=Mus musculus	K11ac K16ac K20ac K15me3 K20me3 K27me3 K30me3	K11ac K16ac K20ac K28ac K30me3

K77me2	K16me3*	K20ac	R36me2	K8me1	K5me2	K16me3*	K20ac	R39me1	R36me2
	K77me3	K59ac	R55me2	K12me1	K8me2	K77me3	K59ac	R45me1	R55me2
	K44me3	K77ac	R17me2	K16me1	K16me2	K79me3	K77ac	R55me1	R78me2
		K79ac	R45me2		K31me2	K31me3	K79ac	R67me1	R92me2
		K31ac	R78me2		K79me2		K5ac*	R78me1	R95me2
					K91me2			R92me1	
								R95me1	

Apêndice B

Lista de proteínas identificadas nos géis 2D-PAGE dos núcleos das células HC11 SCL e diferenciadas

Protein Name	Accession Number	Protein MW	Protein PI	Peptide Count	Protein Score	Protein Score C.I. %	Biological Process
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	U5S1_MOUSE	109291,2969	4,86	10	334	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HCD2_MOUSE	27401,5961	8,53	3	262	100	metabolism
Actin, cytoplasmic I	ACTB_CRIGR	41710,71094	5,22	5	291	100	structure
Alpha-actinin	ACTZ_RAT	42586,89844	6,19	3	89,09999847	99,99688545	structure
Ankyrin repeat domain-containing protein 5	ANKR5_MOUSE	86848,5625	8,51	6	60,59999847	97,7950678	unknown
Annexin A2	ANXA2_MOUSE	38651,83984	7,55	10	179	100	signal transduction
Annexin A6	ANXA6_MOUSE	75838,42188	5,34	10	59,70000076	97,2873422	signal transduction
Arylamine N-acetyltransferase 2	ARY2_MOUSE	33680,05859	5,63	3	65,30000305	99,2528724	metabolism
Beta-actin-like protein 2	ACTBL_MOUSE	41976,98828	5,3	2	113	100	protein binding/folding
Calmodulin	CALM_RAT	16826,83008	4,09	1	163	100	signal transduction
Casein kinase I isoform gamma-3	KCIG3_MOUSE	48906,73047	9,21	6	61,90000153	98,36546233	signal transduction
Chromobox protein homolog 3	CBX3_MOUSE	20842,33984	5,13	3	242	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Chromobox protein homolog 5	CBX5_MOUSE	22171,99023	5,71	1	89,69999695	99,99728734	DNA/RNA/protein biosynthesis
Cleavage stimulation factor subunit 1	CSF1_RAT	48350,76172	6,12	5	195	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC12_MOUSE	68351,65625	5,16	2	180	100	transport
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC12_MOUSE	68351,65625	5,16	2	180	100	transport
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC12_MOUSE	68351,65625	5,16	2	180	100	transport
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC12_MOUSE	68351,65625	5,16	2	180	100	transport
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC12_MOUSE	68351,65625	5,16	2	180	100	transport
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	RPAB3_MOUSE	17132,44922	4,5	1	131	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_MOUSE	50082,10156	9,1	3	78,69999695	99,96584963	DNA/RNA/protein biosynthesis
Enhancer of rudimentary homolog	ERH_MOUSE	12251	5,63	4	216	100	signal transduction
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_MOUSE	31454,21094	8,76	4	117	100	metabolism
Eukaryotic initiation factor 4A-I	IF4A1_MOUSE	46124,55078	5,32	4	65,5	99,28649818	DNA/RNA/protein biosynthesis
Eukaryotic initiation factor 4A-II	IF4A2_RAT	46372,78125	5,33	4	66,19999695	99,39271103	DNA/RNA/protein biosynthesis
Eukaryotic initiation factor 4A-III	IF4A3_RAT	46811,17188	6,3	15	290	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAZAL_RAT	32889,32813	5,43	3	134	100	structure/protein binding/folding

F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAZA2_RAT	32946.60938	5.57	2	80	99,974684	structure/protein binding/folding
Gelsolin	GELS_RAT	86014.0625	5.76	1	85,19999695	99,99235468	structure/protein binding/folding
Glia1 fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49926.58984	5.35	1	107	100	structure
Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GSP_RAT	35805.16016	8.14	3	365	100	metabolism
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	G3PT_MOUSE	47626.19922	8.14	1	142	100	metabolism
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT	70827.21094	5.37	14	356	100	protein binding/folding
Heat shock protein beta-1	HSPB1_MOUSE	22999.7207	6.12	3	250	100	protein binding/folding
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90A_MOUSE	84734.75781	4.93	1	64,40000153	99,08083192	protein binding/folding
Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_MOUSE	69697.77344	5.58	8	168	100	protein binding/folding
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	ROAA_MOUSE	30812.25	7.68	6	117	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_MOUSE	34175.25	9.27	8	142	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ROA3_RAT	39627.60156	9.1	6	453	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF_RAT	45700.91016	5.31	3	322	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_MOUSE	49168.39844	5.89	2	198	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRH2_RAT	49262.30078	5.89	1	80,30000305	99,97637375	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRPK_RAT	50944.39844	5.39	6	211	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins K	ROA2_MOUSE	37379.71094	8.97	8	535	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRPC_MOUSE	34363.85938	4.92	6	189	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone deacetylase 1	HDAC1_RAT	55057.67969	5.31	1	87,69999695	99,99570072	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone deacetylase 2	HDAC2_MOUSE	55266.75	5.59	1	87,59999847	99,99560058	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone deacetylase complex subunit SAP18	SAP18_MOUSE	17583.96094	9.38	1	146	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A type 1	H2A1_MOUSE	14126.9502	11.05	7	319	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A type 1-E	H2A1E_RAT	14110.9502	11.05	7	158	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A type 1-F	H2A1F_MOUSE	14152.96973	11.05	7	320	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A type 1-H	H2A1H_MOUSE	13941.83008	11.03	6	312	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A type 4	H2A4_RAT	14274.96973	11.02	6	313	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2A.J	H2AJ_RAT	14036.9502	11.05	7	327	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 1	H2B1_RAT	13981.59961	10.36	6	77,59999847	99,95600582	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 1-B	H2B1B_MOUSE	13943.55957	10.31	2	78	99,95987684	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 1-C/E/G	H2B1C_MOUSE	13897.59957	10.31	3	75,69999695	99,93186106	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 1-F/J/L	H2B1F_MOUSE	13927.57031	10.31	5	95.5	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 1-H	H2B1H_MOUSE	13911.57031	10.31	7	87.5	99,99549811	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 2-E	H2B2E_MOUSE	13984.62988	10.31	3	71,90000153	99,83654623	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 3-A	H2B3A_MOUSE	13985.58008	10.37	1	62.5	98,5763767	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H2B type 3-B	H2B3B_MOUSE	13899.54004	10.31	4	83	99,98731194	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H3.1	H31_MUSPA	15394.48047	11.13	8	129	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H3.2	H32_MUSPA	15378.50977	11.27	8	131	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Histone H3.3	H33_RAT	15318.5	11.27	8	132	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Importin subunit beta-1	IMB1_RAT	97062	4.66	1	123	100	transport
Lamin-A	LMNA_RAT	74278.75781	6.54	15	200	100	structure
Lamin-A/C	LMNA_MOUSE	74192.70313	6.54	11	214	100	structure
Lamin-B1	LMNB1_MOUSE	66744.75781	5.11	20	592	100	structure
Myosin light polypeptide 6	MYL6_MOUSE	16919.13086	4.56	3	217	100	structure
Myosin regulatory light chain 12B	ML12B_MOUSE	19766.51953	4.71	1	92,90000153	99,99870164	structure
Myosin regulatory light chain RLC-A	MRLCA_RAT	19882.51953	4.67	1	92,59999847	99,99860878	structure
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60_RAT	60210.76172	5.2	5	169	100	apoptosis/DNA/RNA/protein biosynthesis
Programmed cell death protein 6	PDC6_MOUSE	21853.75977	5.16	2	171	100	apoptosis
Prohibitin	PHB_RAT	29801.90039	5.57	5	474	100	signal transduction
Putative RNA-binding protein 3	RBM3_MOUSE	16594.66016	6.84	5	165	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
RuvB-like 1	RUVB1_RAT	50182.30078	6.02	3	92,90000153	99,99870164	DNA/RNA/protein biosynthesis/signal transduction
Septin-2	SEPT2_MOUSE	41499.26953	6.1	6	150	100	signal transduction
Serine/threonine-protein phosphatase PPI-1-alpha catalytic subunit	PPIA_MOUSE	37515.80859	5.94	11	257	100	signal transduction
Serine/threonine-protein phosphatase PPI-1-beta catalytic subunit	PPIB_RAT	37162.62109	5.84	4	205	100	signal transduction

Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PP1G_RAT	36959.71875	6.13	7	203	100	signal transduction
Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_RAT	284462.25	5.2	7	163	100	protein binding/folding/structure
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3_MOUSE	58805.23047	5.23	9	158	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1_MOUSE	27727.81055	10.37	11	373	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2_RAT	25461.17969	11.86	4	98,40000153	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Splicing factor, arginine/serine-rich 7	SFRS7_MOUSE	30798.83008	11.89	4	155	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Splicing factor, arginine/serine-rich 9	SFRS9_MOUSE	25645.42969	8.74	1	61,40000153	98,16601857	DNA/RNA/protein biosynthesis
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ_MOUSE	75394.27344	9.45	2	201	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_CRIGR	73684.77344	5.87	2	121	100	protein binding/folding
TAR DNA-binding protein 43	TADBP_MOUSE	44519.28906	6.26	10	156	100	apoptosis/DNA/RNA/protein biosynthesis
T-complex protein 1 subunit theta	TCPO_MOUSE	59517.51172	5.44	3	247	100	protein binding/folding
Transformer-2 protein homolog alpha	TRA2A_MOUSE	32296.86914	11.28	3	61,70000076	98,28842864	DNA/RNA/protein biosynthesis
Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B_RAT	33645.55859	11.25	5	237	100	DNA/RNA/protein biosynthesis
tRNA wylbitosine-synthetizing protein 2 homolog	TYW2_RAT	49355.32031	8.5	6	58,40000153	96,34072596	DNA/RNA/protein biosynthesis/signal transduction
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_MOUSE	28450.42969	4.65	12	308	100	structure
Tubulin alpha-1C chain	TBA1C_MOUSE	49877.48047	4.96	1	99,59999847	100	structure
Tubulin beta-2A chain	TBB2A_RAT	49874.96094	4.78	2	81,30000305	99,981233	structure
Tubulin beta-2C chain	TBB2C_RAT	49768.98828	4.79	3	91,90000153	99,99836546	structure
Tubulin beta-3 chain	TBB3_RAT	50386.23828	4.82	1	62,09999847	98,43902754	structure
Tubulin beta-5 chain	TBB5_MOUSE	49638.96875	4.78	4	78,69999695	99,96584963	structure
Vimentin	VIME_MOUSE	53655.05859	5.06	3	90,30000305	99,99763738	structure
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDACL_MOUSE	32331.38086	8.55	4	327	100	transport
V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_MOUSE	68282.54688	5.42	5	286	100	transport